### Alina Kuzminienė

### GERKLŲ PLOKŠČIŲJŲ LĄSTELIŲ KARCINOMOS IR GERKLŲ PAPILOMOS BIOLOGINĖS IŠRAIŠKOS VIŠČIUKO EMBRIONO CHORIOALANTOJINĖJE MEMBRANOJE

Daktaro disertacija Biomedicinos mokslai medicina (06B)

Kaunas, 2016

Disertacija rengta 2010–2015 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Ausų, nosies ir gerklės ligų klinikoje.

#### Mokslinis vadovas

prof. habil. dr. Virgilijus Ulozas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

# Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos medicinos mokslo krypties taryboje:

#### Pirmininkė:

prof. habil. dr. Vaiva Lesauskaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

#### Nariai:

prof. dr. Žilvinas Saladžinskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, medicina – 06B) doc. dr. Saulius Vaikus (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

prof. dr. Janina Tutkuvienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

dr. Osvaldas Pranevičius (W. Cornell universiteto medicinos koledžas (JAV), biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Disertacija ginama viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2016 m. vasario 11 d. 15 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Didžiojoje auditorijoje

Adresas: Eivenių g. 2, LT-50009 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES MEDICAL ACADEMY

Alina Kuzminienė

### BIOLOGICAL FEATURES OF LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND RECURRENT RESPIRATORY PAPILLOMA ON CHICK EMBRYO CHORIOALLANTOIC MEMBRANE

Doctoral Dissertation Biomedical Sciences Medicine (06B)

Kaunas, 2016

Dissertation has been prepared at the Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Department of Otorinolaryngology during the period of 2010–2015.

#### **Scientific Supervisor**

Prof. Dr. Habil. Virgilijus Ulozas (Lituanian university of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

# Dissertation is defended at the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy:

#### Chairman

Prof. Dr. Habil. Vaiva Lesauskaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

#### Members:

Prof. Dr. Žilvinas Saladžinskas (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Medicine – 06B) Assoc. Prof. Dr. Saulius Vaikus (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Medicine – 06B) Prof. Dr. Janina Tutkuvienė (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Dr. Osvaldas Pranevičius (W. Cornell University Medical College (USA), Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Dissertation will be defended at the open session of the Medical Research Council on the 11th of February 2016 at 3 p.m. in the assembly hall named "Didzioji auditorija", Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno Klinikos.

Address: Eivenių 2, LT-50009 Kaunas, Lithuania

### TURINYS

SANTRUMPOS	8
ĮVADAS	9
1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	. 10
<ol> <li>2. LITERATŪROS APŽVALGA</li> <li>2.1. GPLK ir GP paplitimas ir priežastys</li> </ol>	. 12
2.2. GPLK biologinės savybės	. 13
2.3. GP biologinės savybės	. 15
2.4. Visciuko embriono CAM eksperimentiniai modeliai	. 17
2.6. Piktybinių ir nepiktybinių navikų bei naviko ląstelių poveikio	
viščiuko embriono CAM ištyrimo aspektai	. 23
3. DARBO METODIKA	. 28
3.1. Eksperimente dalyvavusių pacientų anketiniai ir klinikiniai duomenys	. 28
3.2. Viščiuko embriono chorioalantojinės membranos	
eksperimentinis modelis	. 30
3.2.1. Kiaušinių inkubavimas ir langelių atidarymas	. 30
embriono CAM	. 31
3.3. Eksperimentinių CAM ir ant jos prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių bei kontrolinių CAM įvertinimas <i>in vivo</i> biomikroskopijos, fluorescencinės stereomikroskopijos, histomorfometriniu ir	
imunohistocheminiais tyrimo metodais	. 33
3.3.1. Eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GPLK ir GP navik	0
stereomikroskopijos ir histologinių tyrimo metodais	33
3.3.2. Eksperimentinių ir kontrolinių CAM hitomorfometrinė	
analizė	. 34
3.3.3. Eksperimentinių ir kontrolinių CAM bei ant CAM	
prigijusių GPLK ir GP gabalėlių imunohistocheminė analizė	. 35
3.3.3.1. Imunohistochemija DMM CK antikūnu	. 36
5.5.5.2. III UNIONISIOCHEMIJA KI 0/, ANU MIMP 9 IF PLBA antikūnais	37
3 3 3 3 Histochemija <i>Sambukus nigra</i> lektinu	.37
3.4. Statistinė duomenų analizė	. 38
•	

PAGRINDINIAI DARBO REZULTATAI	40
4.1. Tyrime dalyvavusių pacientų demografiniai bei klinikiniai	
duomenys	40
4.2. Viščiuko embrionai	41
4.3. Eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GPLK ir GP naviko	
gabalėlių bei kontrolinių CAM in vivo biomikroskopiniai,	
fluorescenciniai stereomikroskopiniai, histomorfometriniai ir	
imunohistocheminiai tyrimai	42
4.3.1. Eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GPLK naviko	
gabalėlių in vivo biomikroskopinio ir histologinio tyrimo	
rezultatai	42
4.3.2. Eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GP naviko	
gabalėlių in vivo	
biomikroskopijos ir histologinio tyrimo rezultatai	45
4.3.3. Eksperimentinių CAM bei ant jų prigijusių GPLK ir GP	
naviko gabalėlių įvertinimas fluorescencinės stereomikroskopijos	
metodu	47
4.3.4. Histomorfometrinis viščiuko embriono CAM įvertinimas	
po GPLK ir GP naviko gabalėlių implantacijos	49
4.3.4.1. CAM pokyčiai po GPLK ir GP naviko gabalėlių	
implantacijos – devinta inkubacijos para	51
4.3.4.2. CAM pokyčiai po GPLK ir GP naviko gabalėlių	
implantacijos – dešimta inkubacijos para	53
4.3.4.3. CAM pokyčiai po GPLK ir GP naviko gabalėlių	
implantacijos – vienuolikta inkubacijos para	55
4.3.4.4. CAM pokyčiai po GPLK ir GP naviko gabalėlių	
implantacijos – dvylikta inkubacijos para	61
4.4. Prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių ir jų poveikio CAM	
imunohistocheminis įvertinimas	66
4.4.1. Imunohistocheminė reakcija į DMM CK ant CAM	
prigijusiuose GPLK ir GP naviko gabalėliuose	66
4.4.2. Imunohistocheminė reakcija į Ki 67 bei PLBA antikūnus	
ant CAM prigijusiuose GPLK ir GP naviko gabalėliuose	68
4.4.3. Imunohistocheminė eksperimentinių CAM reakcija	
į anti MMP 9 antikūną	70
4.4.4. Imunohistocheminė Sambukus nigra lektino raiška	
GPLK ir GP naviko gabalėliuose bei CAM	70
4.5. GPLK ir GP augimo pobūdžio žmogaus organizme ir	
viščiuko embriono CAM palyginimas	72

4.

<ul> <li>4.5.1. GPLK ir GP audinio gabalėlių prigijimo ant viščiuko embriono CAM ryšys su klinikiniais paciento, iš kurio šie audiniai paimti, duomenimis</li></ul>	72
paciento požymiais	74
5. DARBO REZULTATŲ APTARIMAS	76
5.1. Tyrime dalyvavusių pacientų demografinių, epidemiologinių ir klinikinių duomenų analizė	76
5.2. GPLK ir GP naviko gabalėlių augimo ant CAM ir jos	
histomorfometrinių parametrų aptarimas	77
5.3. Histomorfometriniai CAM angiogenezės ypatumai praėjus	
2, 3 ir 4 paroms po GPLK ir GP naviko gabalėlių implantacijos	82
5.4. Imunohistocheminis eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių	05
GPLK IF GP naviko gabalelių įvertinimas Divivi citokeratinu	85
GDI K ir GD naviko gebalėlių ivortinimas Ki 67 ir DCNA reagontais	86
5.6 Imunohistocheminis eksnerimentiniu CAM ir ant ju prigijusiu	80
GPI K ir GP naviko gabalėlių ivertinimas anti MMP 9 reagentų	87
5.7 Histocheminis eksperimentiniu CAM ir ant ju prigijusiu	07
GPLK ir GP	
naviko gabalėlių ivertinimas <i>Sambucus nigra</i> lektinų	87
5.8. GPLK ir GP augimo ant CAM ryšys su klinikine ligos eiga	
žmogaus organizme	88
IŠVADOS	89
LITERATŪROS SĄRAŠAS	90
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	. 100
SUMMARY	. 125
BIOGRAFIJA	. 130
PADĖKA	. 131

### **SANTRUMPOS**

GPLK	<ul> <li>– gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma</li> </ul>
GKPLK	– galvos ir kaklo plokščiųjų ląstelių karcinoma
GP	– gerklų papiloma
CAM	<ul> <li>– chorioalantojinė membrana</li> </ul>
ŽPV	– žmogaus papilomos virusas
DMM CK	<ul> <li>– didelės molekulinės masės citokeratinas</li> </ul>
PLBA	- proliferuojančių ląstelių branduolių antigenas
MMP 9	<ul> <li>matrikso metaloproteinazės</li> </ul>
ŽFP	<ul> <li>– žaliai fluorescuojantis baltymas</li> </ul>
Ki-67	<ul> <li>– ląstelių dauginimosi žymuo</li> </ul>

#### ĮVADAS

Gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma (GPLK) yra antras pagal dažnumą viršutinių kvėpavimo takų piktybinis navikas, kuris kasmet diagnozuojamas dešimčiai iš 100 000 Europoje gyvenančių vyrų. Nustatyta, jog tik 63 proc. šios lokalizacijos vėžiu sergančių pacientų išgyvena 5 metus. Remiantis moksliniais tyrimais, daugelyje šalių, taip pat ir Lietuvoje yra taikomos efektyviausios, įrodymais grįstos GPLK diagnostikos ir gydymo priemonės. Ir vis dėlto šių ligonių vidutinė penkerių metų gyvenimo trukmė per pastaruosius 30 metų neilgėja [1–3].

Gerklų papilomatozė (GP) yra dažniausiai diagnozuojamas nepiktybinis gerklų navikas, kuris nustatomas 4,0–4,3 iš 100 000 vaikų ir 1,8–2,0 iš 100 000 suaugusių per metus [4–6]. Liga pasireiškia nekontroliuojamu gerklų gleivinės epitelio ląstelių dauginimusi, dėl to formuojasi egzofitinės epitelio išaugos, siaurinančios gerklų spindį [7–10]. Dėl šios priežasties GP sergančių pacientų klinikinė eiga yra nenuspėjama. Liga gali recidyvuoti nuo keleto kartų per metus iki keleto kartų per mėnesį ar išplisti už gerklų anatominių ribų [7, 11]. Literatūroje nurodoma, kad GP paveiktose gerklų, trachėjos ar bronchų gleivinės epitelio ląstelėse gali prasidėti piktybiniai procesai, tuomet plokščialąstė papiloma gali virsti plokščiųjų ląstelių karcinoma [12–15].

Nepaisant mokslo pasiekimų ir įdiegiamų modernių diagnostikos ir gydymo naujovių į klinikinę praktiką, GPLK ir GP ligos eigą yra sunku kontroliuoti, kaip ir pagerinti šiomis ligomis sergančių pacientų gyvenimo kokybę ar prailginti jų gyvenimo trukmę [2, 7, 11, 16]. Iki šiol atliktos mokslinės studijos nepajėgė išaiškinti daugelio GPLK ir GP augimo, plitimo ir atsinaujinimo mechanizmų žmogaus organizme. Klinikinėje praktikoje taikomi sprendimai remiasi eksperimentinių *in vitro* [17], epidemiologinių [1] ir kitokio pobūdžio studijų rezultatais, kuriais neįmanoma nustatyti šių navikų tikslių patofiziologinių procesų.

Gyvose *in vivo* terpėse GPLK ir GP navikai dar nepakankamai ištirti, nors tokių tyrimų rezultatai galėtų efektyviausiai atskleisti navikų biologinius veiksnius ir augimo mechanizmus [18–20]. Todėl GPLK ir GP navikų biologinei išraiškai tyrinėti mes sukūrėme eksperimentinį *in vivo* modelį viščiuko embriono chorioalantojinėje membranoje (CAM). Manome, jog tik geresniau suvokiant GPLK ir GP fiziologinius procesus galima kurti naujas, efektyvias šių ligų diagnostikos ir gydymo priemones.

#### 1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

#### **Darbo tikslas**

Sukurti gerklų papilomos bei gerklų plokščiųjų ląstelių karcinomos *in vivo* eksperimentinį modelį, implantuojant šių navikų audinių gabalėlius ant viščiuko embriono chorioalantojinės membranos ir nustatyti joje bei prigijusiuose navikiniuose audiniuose vykstančius pakitimus bei šių pokyčių klinikinę svarbą.

#### Darbo uždaviniai:

- 1. Nustatyti, ar viščiuko embriono chorioalantojinė membrana (CAM) yra tinkama terpė eksperimentiniams *in vivo* tyrimams su gerklų plokščiųjų ląstelių karcinomos (GPLK) ir gerklų papilomos (GP) navikais vykdyti.
- Įvertinti, kokius makroskopinius, histologinius, imunohistocheminius, in vivo biomikroskopija bei fluorescencine stereomikroskopija identifikuojamus eksperimentinės CAM, chorioninio epitelio bei mezodermoje vykstančios kraujotakos pakitimus sukelia ant viščiuko embriono CAM implantuoti GPLK ir GP naviko audiniai. Šiuos pokyčius palyginti su kontrolinės grupės CAM atitinkamais požymiais bei GPLK ir GP grupėse.
- 3. Nustatyti, ar GPLK ir GP naviko implantai, augdami ant CAM, išlaikė savo histologinę struktūrą viso eksperimento metu, bei įvertinti šių navikų augimo ir plitimo ant CAM pobūdį.
- 4. Palyginti GPLK ir GP biologines išraiškas viščiuko embriono CAM su šių navikų klinikinėmis išraiškomis pacientų GPLK ir GP "donorų" organizme.

#### Darbo mokslinis naujumas

GP yra dažniausiai nustatomas nepiktybinis viršutinių kvėpavimo takų navikas [4–6]. Daugeliu atvejų GP, ypač vaikų amžiuje, pasireiškia agresyvia ir sunkiai kontroliuojama eiga, o kartais gali baigtis ir paciento mirtimi [6, 21, 22]. Dėl šios priežasties atliekama vis daugiau mokslinių tyrimų, kuriais tikimasi rasti informacijos, kodėl GP yra tokia kliniškai heterogeniška, kokie pagrindiniai patogenetiniai veiksniai skatina papilomos augimą ir galbūt kokie faktoriai galėtų sustabdyti GP progresavimą.

Tuo tarpu GPLK, kaip ir kitos lokalizacijos vėžinių susirgimų, vystymosi, diagnostikos bei gydymo uždaviniai yra spendžiami jau daugelį metų. Literatūroje galima aptikti įvairių mokslinių tyrimų, siekiančių išsiaiškinti,

kaip būtų galima pagerinti GPLK diagnostiką bei optimizuoti gydymą [23]. Bet vis tiek dar išlieka neatsakytų klausimų, kaip sustabdyti GPLK progresavimą, prognozuoti ligos eigą bei efektyviai gydyti ja sergančius pacientus.

Pastaruoju metu literatūroje pasirodo duomenų apie tai, kad eksperimentinių *in vitro* studijų rezultatai negali būti visiškai tapatinami su klinikiniais duomenimis [24]. Yra žinoma, jog ląstelių kultūroje žmogaus papilomos viruso (ŽPV) replikacija nevyksta. ŽPV kultivuojant audinių kultūrose, viruso DNR išlieka labai jautri aplinkos pokyčiams, taigi, tokių eksperimentų apimtis vis dar lieka ribota [24–26]. Be to, mėgintuvėlyje ir gyvoje terpėje žmogaus naviko ląstelės auga ir vystosi skirtingai. *In vivo* užaugintų naviko ląstelių vystymosi fiziologiniai etapai yra labiau panašūs į tuos, kurie vyksta joms dauginantis žmogaus organizme, palyginti su ląstelių kultūromis, augintomis *in vitro* terpėje [27]. Taigi, žmogaus navikų tyrimuose eksperimentinių *in vivo* studijų mokslinė vertė vis didėja.

Moksliniai žmogaus navikų ląstelių ar jų audinių kultūrų tyrinėjimai yra atliekami pasitelkiant skirtingus gyvūnų modelius [28–32]. Vienas iš jų – viščiuko embriono CAM. Pastaroji gana plačiai naudojama eksperimentinėse studijose su žmogaus navikais [33–36]. Iki šiol nėra atlikta mokslinių studijų, analizuojančių GPLK ir GP poveikį viščiuko embriono CAM [27]. Be to, šie navikai menkai ištirti ir taikant kitus eksperimentinius *in vivo* modelius [18, 19, 28].

Mūsų atliktas eksperimentinis *in vivo* tyrimas yra pirmasis pasaulyje, kuris analizuoja, kaip GPLK ir GP naviko gabalėliai prigyja ir kokiu būdu plinta po jų implantavimo ant viščiuko embriono CAM. Nuodugniai ištyrėme, kokie atsiranda makroskopiniai, histologiniai, imunohistocheminiai pokyčiai, nustatomi *in vivo* biomikroskopine bei fluorescencine stereomikroskopija eksperimentinėse CAM bei prie jų prigijusiuose GPLK ir GP naviko gabalėliuose. Pokyčių patikimumą įrodėme juos palyginę su kontroline grupe.

Be to, prie CAM prigijusiuose GPLK ir GP gabalėliuose ir pačioje CAM atsiradusius pakitimus palyginome su klinikiniais GPLK ir GP požymiais, kai šie audiniai augo žmogaus gerklose. Nustatėme statistiškai patikimas sąsajas tarp šių navikų augimo pobūdžio ant CAM ir žmogaus organizme.

Taigi, galime daryti prielaidą, jog tokį GP ir GPLK morfologinės išraiškos viščiuko embriono CAM modelį galima pritaikyti šių navikų vystymuisi, angiogenezei, invaziškumui ir metastazavimui tirti, o ateityje ir gydymo galimybėms įvertinti.

### 2. LITERATŪROS APŽVALGA

#### 2.1. GPLK ir GP paplitimas ir priežastys

GPLK yra antras pagal dažnumą viršutinių kvėpavimo takų navikas ir šeštas iš dažniausiai diagnozuojamų vėžinių susirgimų pasaulyje [1, 2]. Literatūroje nurodoma, kad GPLK yra labiau paplitęs tarp vyrų ir sudaro 96 proc. visų sergančiųjų GPLK [37]. Remiantis Tarptautinės vėžio tyrimų agentūros registru, 2008 m. Europoje GPLK susirgo 10 iš 100 000 vyrų, kurių standartizuotas mirtingumo rodiklis dėl GPLK sudarė 2,2 iš 100 000 [1].

Šios srities vėžio išsivystymas siejamas su tabako rūkymu. Tiems pacientams, kurie kada nors rūkė tabako cigaretes, Jungtinės Karalystės vėžio tyrimų organizacijos duomenimis, rizika susirgti GPLK padidėjo 8,3 karto, palyginti su tais pacientais, kurie niekada nerūkė. Nustatyta, kad rizika susirgti GPLK tiesiogiai priklauso ir nuo per dieną surūkytų cigarečių skaičiaus. Jam didėjant, GPLK išsivystymo tikimybė taip pat didėja, ir atvirkščiai – nustojus rūkyti, per pirmus metus rizika susirgti gerklų vėžiu sumažėja iki 30 proc., o po 10 metų iki 64 proc. [38]. Tarptautinės vėžinio tyrimų agentūros registre nurodoma, kad pasyvus rūkymas taip pat gali skatinti GPLK išsivystymą [38]. Rizikos grupėje yra tie pacientai, kurie prirūkytose patalpose praleidžia daugiau nei 10 metų [38].

GPLK išsivystymą gali lemti ir nesaikingas alkoholio vartojimas (t. y. daugiau nei 1,5 standartinių alkoholio vienetų per parą), kuris tikimybę susirgti gerklų vėžiu padidina 2,5 karto [38]. Tarptautinės vėžinio tyrimų agentūros registro duomenimis, riziką padidina ir dažnas tiesioginis sąlytis su stipriomis neorganinės kilmės rūgštimis bei asbestu, gausus riebios mėsos vartojimas, būklė po organų transplantacijos, gastroezofaginio refliukso liga, imunodeficito virusas, kitos lokalizacijos galvos ir kaklo vėžys bei žmogaus papilomos viruso infekacija (ŽPV) [1, 2, 38]. Nuomonės dėl ŽPV įtakos GPLK išsivystymui yra kontraversiškos [2, 8, 13, 39].

Nustatyta, kad ŽPV žmogaus viršutiniuose kvėpavimo takuose dažniausiai pasireiškia ryklės ir/ar gerklų srities papilomatoze, kuri gali išryškėti bet kuriame amžiuje [22]. Suaugusiems GP diagnozuojama 2 atvejais iš 100 000, tačiau tarp vaikų GP pasireiškia dažniau – 4 iš 100 000 [8]. Retrospektyvinėse ir prospektyvinėse studijose buvo patvirtinta, kad ŽPV gali būti perduota iš motinos vaisiui gimdymo metu, t. y. vertikalios transmisijos būdu. Literatūroje pateikiami statistiniai duomenys byloja, kad motinos lytinių takų kondilomatozė didina riziką apsikrėsti ŽPV kūdikiui gimstant. Rizika dar labiau padidėja, jei motina yra pirmakartė ir/ar

gimdymas trunka daugiau nei 10 valandų. Yra manoma, kad ŽPV gali būti perduodama ir humorališkai. Tai įrodo klinikinėje praktikoje pasitaikantys reti atvejai, kai gerklų papilomatozė išsivysto vaisiui esant gimdoje, o pirmieji jos požymiai pasireiškia vos gimusiam naujagimiui [6, 14]. Suau-gusiųjų GP yra siejama su orogenitaliniu ŽPV perdavimu. Be to, dažniau diagnozuojama žemesnės socialinės klasės pacientams, kurie turi daugiau nei vieną lytinį partnerį [6, 24].

Iš 120 ŽPV subtipų dažniausiai aptinkami ŽPV-6 ir ŽPV-11 tipai (90 proc. atvejų) [8]. Šių tipų virusai dažniau sukelia vaikų ar juvenilinę gerklų papilomatozę, kuri įprastai pasireiškia iki 5 metų amžiaus. O štai ŽPV-16 ir ŽPV-18 tipai yra kur kas retesni, tačiau pastarieji siejami su dažnesniu GPLK išsivystymu [8, 40]. Remiantis sistemine 55 epidemiologinių tyrimų, atliktų iki 2012 metų apžvalga, pacientams, nešiojantiems ŽPV virusą, tikimybė susirgti GPLK padidėja 5,39 karto (CI, 3.25-8.94), o nešiojantiems ŽPV-16 tipo virusą – netgi 6,07 karto (CI, 3.44-10.70) [40].

#### 2.2. GPLK biologinės savybės

Gerklų vėžys pradeda vystytis plokščiosiose gerklų gleivinės epitelio ląstelėse, veikiant 2.1 skyriuje nurodytiems rizikos faktoriams. Daugeliu atvejų pirmieji mikroskopiniai pakitimai gerklų epitelio ląstelėse yra vertinami kaip *displazija* [41, 42]. Tai tokia gerklų gleivinės būklė, kai epitelio ląstelės nebeturi normalios histologinės sandaros (ląstelių atipija), taip pat stebimas nenormalus ląstelių dalijimosi ciklas (displazija), tačiau jose dar nėra vėžiui būdingų požymių. Ši būklė nebūtinai baigiasi gerklų vėžio išsivystymu, tačiau, ir toliau veikiant rizikos faktoriams, ypač rūkymui, tikimybė, jog gerklų epitelio ląstelių displaziją pakeis kita histologinė būklė – **karcinoma** *in situ*, gerokai padidėja [41, 43].

Karcinoma *in situ* yra anksčiausia gerklų vėžio forma. Ji nustatoma tuomet, kai visuose gerklų epitelio sluoksniuose aptinkama displastiškų ląstelių. Be to, pastarosios jau turi vėžiui būdingų požymių, kaip antai: daugiasluoksnio epitelio ląstelių suplokštėjimas ir jų keratinizacija, aiški ląstelių branduolių atipija, ląstelių apoptozės požymiai su išreikšta cito-plazmine eozinofilija ar be jos [43, 44]. Minėtus pokyčius turinčios ląstelės dar nebūna išplitusios už gerklų gleivinės epitelio pamatinės membranos ribų [41]. Ši gerklų vėžio stadija dažniausiai yra visiškai išgydoma, tačiau laiku jos nediagnozavus ar netaikant reikalingo gydymo, karcinoma *in situ* gali progresuoti iki invazinio gerklų vėžio – GPLK [41].

GPLK yra diagnozuojama tuomet, kai epitelio ląstelės, turinčios vėžiui būdingus požymius, išplinta už gerklų gleivinės epitelio pamatinės memb-

ranos ribų, apima šalia esančius audinius, išplinta į gretimas anatomines sritis ir/ar kitus kūno organus [41]. Literatūroje nurodoma, kad mikroinvazinė GPLK tarp patologų suprantama ir aiškinama skirtingai. Kai kurių autorių duomenimis, invazine GPLK galima vadinti apie 1–2 mm pamatinės membranos pločio apimančią displaziją. Kiti teigia, jog pakitimai turi būti peržengę pamatinės membranos ribas bent keliuose histologiniuose vaizduose, turi būti aiškiai matomos epitelio išaugos, vadinamieji "liežuviai" bei displazijos židinių (lizdų) formavimasis invazijos vietose [42, 43].

Klinikiniam GPLK išplitimui vertinti naudojama tarptautinė TNM klasifikacija, kur T nurodo paties naviko išplitima gerklose ar už ju ribu, N – limfmazgių būklę, M - metastazių buvimą. Tiesioginis naviko peraugimas į regioninius limfinius mazgus taip pat aprašomas kaip metastazė ir taip, kaip ir metastazės į tolimuosius limfinius mazgus už regioninių limfmazgių, priskiriamos M kategorijai. Klinikinėje praktikoje naudojamas ir morfologinis navikinių ląstelių diferenciacijos įvertinimas, kuris apibūdinamas raide G. Navikas, kurio lastelių diferenciacija atitinka G1 laipsni, dažniausiai auga egzofitiškai, jo ląstelės tebeturi pakankamą citoplazmos plotą, geba kaupti keratiną, o mitozių skaičius nėra didelis - tokio naviko metastazinės savybės, manoma, yra menkos. Diferenciacijos laipsniui didėjant, blogėja ir ligos prognozė. Literatūroje nurodoma, jog gerai diferencijuotos (G1) vėžinės lastelės savo morfologine sandara primena gerklų epitelines lasteles, jos auga ir vystosi lėtai. O blogai diferencijuotos ar nediferencijuotos GPLK lastelės yra visiškai praradusios gerklų epiteliui būdinga morfologija, vra netaisvklingu formu ir dažniausiai neturi aiškios struktūros (anaplazija). Šios lastelės auga ir plinta į gretimas sritis greitai ir mažai prognozuojamai, yra siejamos su blogesne GPLK prognoze bei trumpesne paciento gyvenimo trukme [45]. Tos GPLK ląstelės, kurioms nustatytas vidutinis diferenciacijos laipsnis G2, nėra tokios agresyvios kaip G3 ir G4 diferenciacijos laipsnį atitinkančios ląstelės, tačiau pasižymi blogesne ligos prognoze nei G1 lastelės [45].

N. Gale ir bendraautorių duomenimis (2009), veikiant rizikos faktoriui(iams), gerklų gleivinėje vyksta daugybiniai epitelio ląstelių transformacijos procesai. Nurodoma, kad bet kurioje iš tokių pakitusių ląstelių bet kuriuo metu gali prasidėti nekontroliuojamas ląstelės dauginimasis ir taip "užsivesti" karcinogenezės mechanizmas [44]. Manoma, kad šiuos procesus reguliuoja tam tikros žmogaus genų mutacijos. Moksliniais tyrimais nustatyta bent 10 tokių pakitimų gerklų gleivinės epitelio ląstelių chromosomose. Šios genų mutacijos suaktyvina protoonkogenus, o pastarieji stimuliuoja navikinių ląstelių augimą bei stabdo naviko augimą slopinančių genų poveikį. Atitinkamai stabdoma natūrali organizmo apsauga, todėl vėžinės ląstelės gali netrukdomai daugintis [44]. Literatūros duomenimis,

keičiantis gerklų gleivinės epitelio ląstelių histologijai, keičiasi ir pakitusių audinių aprūpinimas krauju. Kaip rodo moksliniai tyrimai, nepiktybiniai gerklų navikai, ikivėžinės gerklų būklės bei gerklų gleivinės displazija yra susijusi su smulkių kraujagyslių skaičiaus padidėjimu, palyginti su sveikų gerklų gleivine. Didėjant ląstelių diferenciacijos laipsniui G, patologinių audinių riboje ne tik didėja kraujagyslių skaičius, bet ir keičiasi jų forma bei dydis, t. y. blogai diferencijuotų ar nediferencijuotų GPLK atveju pažeidimo vietoje aptinkama netaisyklingos formos, netvarkingai išsidėsčiusių įvairaus dydžio ir įvairių formų daugybinių kraujagyslių [46].

Intensyvesnę kraujotaką galvos ir kaklo plokščiųjų ląstelių karcinomos apimtose srityse įrodo ir kitos angiogenezę tyrinėjančios mokslinės studijos. Yra žinoma, kad angiogenezė prasideda nuo jau esamos kraujagyslės sienelės degradacijos, po to naujos endotelio ląstelės migruoja link naviko ir inicijuoja endoteliocitų mitozes. Dėl to formuojasi naujų kraujagyslių sienelės ir jų pamatinės membranos, o aplink jas ima telktis pericitai. Šį procesą reguliuoja tiek naviko, tiek sveikų audinių išskiriamųos molekulės. Pastarosios yra tyrinėjamos daugelyje mokslinių laboratorijų. Šiuo metu jau nustatyta, kad fibroblastų augimo faktorius, kraujagyslių endotelio augimo faktorius, interleukinas-8 ir kiti angiogenezės procesus aktyvina, o trombospondinas-1, angiostatinas ir kt. angiogenezę slopina [47]. G. M. Tse ir bendraautoriai (2007) pastebėjo, kad smarkiau besireiškiantis angiogenezę indukuojančio kraujagyslių endotelio augimo faktorius patologiniuose audiniuose, taigi ir aktyvi angiogenezė, koreliuoja su blogesne GPLK prognoze, labiau išplitusiu naviku ir trumpesne paciento gyvenimo trukme [48].

Ši ir kitos GPLK ir GP vystymosi bei plitimo teorijos vis dar tebėra mokslinių tyrinėjimų objektas. Specialistų nuomonės tiek apie GPLK, tiek apie GP vystymąsi bei plitimo veiksnius žmogaus organizme išsiskiria, o mokslinių tyrinėjimų rezultatai ne tik papildo, bet ir paneigia vieni kitus [49, 50]. Todėl tebeieškoma naujų, informatyvių mokslinių duomenų, kurie paaiškintų GPLK ir GP patofiziologiją, bei kuriami alternatyvūs eksperimentiniai tiriamieji modeliai. Vienas iš jų – viščiuko embriono CAM [27–32].

#### 2.3. GP biologinės savybės

ŽPV yra 55 nm diametro, kapside dengtas onkogeninis DNR virusas, nešantis 8–10 genų infomaciją savo grandinėje. Virusas priklauso *Papo-vaviridae* šeimai ir gali sukelti ne tik gerklų, bet ir odos, genitalijų, išangės bei gimdos kaklelio ligas [24]. Tikslus mechanizmas, kaip ŽPV infekuoja gerklų gleivinės epitelines ląsteles, nėra žinomas. Manoma, kad patekęs į viršutinius žmogaus kvėpavimo takus, ŽPV virusas prisitvirtina prie gerklų

gleivinės epitelinių ląstelių paviršiaus. Dėl ŽPV sudėtyje esančių E 5–7 genų šis virusas yra atpažįstamas, per tarpląstelinius kanalus praleidžiamas į epitelinės ląstelės citoplazmą bei transportuojamas į ląstelės branduolį. Pastarajame ŽPV dekapsuliuojasi ir pradeda savo replikaciją. Taigi, prasideda ir infekuotos žmogaus gerklų epitelio ląstelės nekontroliuojamas dauginimasis [24, 51]. Moksliniais tyrimais nustatyta, kad virusas infekuoja tik pamatiniame epitelio sluoksnyje esančias ląsteles, t. y. tik tas epitelio ląteles, kurios geba aktyviai daugintis [24].

Literatūroje nurodoma, jog pasitaiko atvejų (iki 5 proc.), kai sveikose gerklų gleivinės epitelinėse lastelėse nustatomas ŽPV, tačiau kliniškai jo replikacija ir patologinis epitelio ląstelių dauginimasis nevyksta, taigi liga neprogresuoja [52]. Tačiau pas didžiaja dali pacientu nekontroliuojamai dauginasi gerklų epitelinės lastelės, todėl susiformuoja egzofitinės, netaisyklingos formos, žiedinių kopūstų formą primenančios gleivinės išaugos [51]. Jos gali augti i gerklų spindi, apsiribodamos tik viena anatomine gerklų sritimi (dažniausiai balso klostėmis), tačiau gali pažeisti ir keleta anatominių sričių ar išplisti už gerklų ribų (dažniausiai į trachėją) [51, 53]. Kai kurie pacientai GP suserga vieną kartą gyvenime, t. y. po endolaringinės papilomų rezekcijos šiems pacientams GP niekuomet nesikartoja. Tokia ligos forma dažnesnė tais atvejais, kai GP pasireiškia vyresniems nei 12 metų amžiaus žmonėms [6]. Kitiems pacientams GP po endolaringinės papilomų rezekcijos, atsinaujina keleta kartu per gyvenima ar net 3, 4 ir daugiau kartu per metus [51]. Dažni GP recidyvai yra siejami su ŽPV-6 ir ŽPV-11 tipu, jaunu amžiumi ir žmogaus imuninės sistemos vpatybėmis [51, 52].

Literatūros duomenimis, kai GP pasireiškia ypač ankstyvame amžiuje, t. y. jaunesniems nei 3 metų vaikams, liga pasižymi ne tik dažnais recidyvais bei ir yra linkusi apimti daugiau nei vieną anatominę gerklų sritį. Nustatyta, kad šios grupės pacientai dėl GP operuojami daugiau nei 4 kartus per metus, tai yra 3,6 karto dažniau nei tie, kuriems liga prasideda vyresniame nei 3 metų amžiuje [7]. Kai kuriems pacientams galimos spontaninės remisijos, tačiau daugumai vaikų stebimi dažni atkryčiai, kurie gali varijuoti nuo 1 iki 4 ir daugiau kartų per metus, o 13–48 proc. pacientų yra nustatomas ekstralaringinis papilomų išplitimas [54–58].

Kaip nurodo V. R. Bonagura ir bendraautoriai (2010), dažnus atkryčius ir nekontroliuojamą GP ligos eigą gali veikti paciento imunogenetiniai ypatumai [52]. Autorių duomenimis, tam tikras T ląstelių (CD34-,,*killers*") receptoriaus geno haplotipas gali nulemti imunocitų (T ląstelių subpopuliacijų, makrofagų ir dendritinių ląstelių) bloką, dėl to neatpažįstami ŽPV paviršiaus proteinai. Todėl neišskiriami ir imuninės sistemos moduliatoriai citokinai, ir chemokinai, taigi imuninės T ląstelės nesidiferencijuoja. Dėl to žmogaus epitelinės ląstelės lieka neapsaugotos nuo ŽPV replikacijos. Ma-

noma, jog, esant šiam ydingam imunocitų ciklui, smarkiai padidėja rizika, kad GP atsinaujins ar išplis už gerklų ribų [52].

Papilomoms išplitus į trachėją, ligos eiga tampa sunkiai kontroliuojama ir gali baigtis paciento mirtimi dėl kvėpavimo takų obstrukcijos papilomų masėmis [7].

Tikslus mechanizmas, kaip GP infekuoja plaučių gleivinę, nėra žinomas. Nurodoma, jog, nesant papilomų žmogaus gerklose, izoliuota plaučių ar trachėjos papilomatozė yra nustatoma ypač retai [51]. Remiantis tuo S. S. Kramer ir bendraautoriai (1985) iškėlė hipotezę, kad galbūt, endolaringinės operacijos metu nedidelis GP audinio gabalėlis gali atitrūkti nuo bendros šalinamų papilomų masės ir taip patekti į paciento plaučius. Nusėdęs ant bronchų gleivinės papilomos audinio fragmentas, autorių nuomone, gali prigyti ir sukelti jau plaučių epitelio papilomatozę su jos klinikiniais ir patofiziologiniais požymiais [59]. Šia hipoteze vadovavosi ir kiti autoriai, kurie literatūros apžvalgose nurodė, jog tai iki šiol vienintelis moksliškai paaiškinamas GP išplitimo į plaučius mechanizmas [11, 59, 60].

GP, o ypač ekstralaringinė jos forma, gali metaplazuoti į plokščių ląstelių karcinomą. Pastaroji, literatūros duomenimis, yra siejama su gerokai blogesne klinikine išraiška bei paciento gyvenimo trukmės prognoze [7, 11, 60].

#### 2.4. Viščiuko embriono CAM

Viščiuko embriono vystymasis trunka 21 parą iki jo išsiritimo [33, 35]. Nuo pirmos inkubacijos paros pradeda formuotis keturios ekstra embrioninės viščiuko struktūros – trynio maišas, amnionas, chorionas ir alantojis. Jos viščiuko vystymesi atlieka labai svarbų vaidmenį, tai yra saugo embrioną nuo dehidratacijos, per jas vyksta maisto medžiagų bei elektrolitų absorbcija bei medžiagų apykaitos produktų pašalinimas į ekstra embrioninę terpę. Per šias membranas iš kiaušinio lukšto vyksta kalcio jonų ir bikarbonatų difuzija embrionui tuomet, kai formuojasi viščiuko skeletas.

Viščiuko embrioną supančių membranų pagrindine funkcija yra laikoma deguonies tiekimas besivystančiam vaisiui ir jo apykaitos produkto – anglies dvideginio – pašalinimas. Literatūroje nurodoma, kad skirtingais embriono vystymosi etapais yra skirtingas deguonies poreikis. Pastarąjam didėjant, daugėja kapiliarų skaičius iš jau esančių kraujagyslių tinklo, o pagreitėjus embriono augimui, vyksta kraujagyslių persitvarkymo mezenchimoje procesai. Ši funkcija yra prilyginama viščiuko embriono kvėpavimo sistemai *lungs of embryo* [61].

Trečią viščiuko embriono vystymosi parą prasideda alantojaus vystymasis iš ventralinės endodermos sienelės [35]. Šiuo embriono vystymosi

laikotarpiu alantojaus ir jau išsivysčiusio choriono mezodermoje aptinkama kraujagyslių užuomazgų su besiformuojančiomis sienelėmis bei kraujo forminiais elementais [35, 62]. Iš pradžių kraujagyslės primena netaisyklingos formos, skirtingo dydžio vamzdelius, kurie vystosi kartu su augančiomis membranomis [63]. Ketvirtą inkubacijos parą alantojis pradeda sparčiai didėti, nustumdamas viščiuko embrioną į ekstra embrioninę ertmę [35]. Alantojaus epitelis šiame viščiuko vystymosi etape atlieka selektyviai pralaidaus barjero funkciją, t. y. jo dėka absorbuojami embrionui reikalingi elektrolitai, ir vanduo iš alantojaus skysčio, drauge ir besivystantis vaisius yra apsaugomas nuo toksinių medžiagų apykaitos produktų, nes pastarieji difunduoja iš amniono į alantojaus pūslę [63]. Susidariusi alantojaus pūslė didėja ir per parą laiko jos mezoderma susilieja su choriono (serozos) mezoderma [62]. Šis naujai susiformavęs dvigubas mezodermos sluoksnis yra vadinamas chorioalantojine membrana – CAM [35].

J. Borges ir bandraautorių (2003) duomenimis, besiformuojant viščiuko embriono CAM, prasiseda sparčiausia CAM kraujagyslių vystymosi fazė. Grupelė hamangioblastų jungiasi į tinklus, iš kurių formuojasi pirminis kraujagyslių endotelis, o 4-8-ąją inkubacijos parą susidaro netaisyklingos, beformės kraujagyslės. Jos susideda iš vieno sluoksnio lasteliu endotelio, vėliau pradeda sparčiai augti ir diferencijuotis į CAM kapiliarus, arterioles ir venules [64]. Nurodomi keturi pagrindiniai kraujagysliu formavimosi mechanizmai. Tai – kraujagyslių susidarymas iš pirminių hemangioblastų ir lygiųjų raumenų ląstelių (angl. incorporation). Šis mechanizmas, kuomet kraujagyslės formuojasi *de novo* t. v. nuo pat pradžiu, vra vadinamas vaskulogeneze [65, 66]. Kitas literatūroje aprašomas mechanizmas - invaginacija, kai, susidarius vagelei jau esamos kraujagyslės sienelėje, pastaroji pamažu skyla į dvi naujas kraujagysles. Taip dauginasi CAM kapiliarai. Nurodoma, kad dalis arteriolių, venulių ir kapiliarų gali formuoti ataugas (angl. sprouting) arba ilgėti (angl. elongation), taip užtikrindami reikiamą embriono medžiagų apykaitą [66]. Viščiuko embriono CAM arteriolių, venulių ir kapiliarų daugėjimas besiformuojant naujoms ataugoms (sprouting) arba kraujagyslėms ilgėjant (angl. elongation) yra vadinamas viščiuko embriono CAM angiogeneze [66, 67]. Inkubacijos pradžioje viščiuko embrionas kraujo ląstelėmis ir maisto medžiagomis yra aprūpinamas tik iš trynio maišo. Susiformavus embriono kraujotakai, per alantojaus kojvte embriono kraujagyslės susisiekia su CAM kraujagyslėms [66, 67]. Taigi nuo inkubacijos 6-os paros viščiuko embrioną maisto medžiagomis aprūpina ir dvi chorioalantojinės arterijos, viena cefalinę (galvos) sritį, kita kaudalinę (uodegos) sritį, o medžiagų apykaitos produktai šalinami per viena chorioalantojine vena [35].

Kraujagyslės, kurių diferenciacija baigiasi kapiliarų susiformavimu, 4–6-ąją parą migruoja į mezenchimą ir ten sudaro kapiliarų tinklą [63]. Septintą ir aštuntą embriono vystymosi parą dėl besivystančio embriono didėjančio deguonies poreikio kapiliarai lėtai pardeda migruoti link ektodermos paviršiaus. CAM arteriolės, venulės ir kapiliarų tinklas sparčiai formuojasi iki viščiuko embriono inkubacijos 11-osios paros [68, 69]. Po to kraujagyslių skaičius ir jų dydis išlieka pastovus arba pasikeičia nežymiai, išskyrus jų transpoziciją. T. y. arteriolės ir venulės santykinai leidžiasi žemyn, link ektodermos paviršiaus migruojančių kapiliarų atžvilgiu. Pastarieji ektodermos paviršių pasiekia 14 embriono inkubacijos parą [64]. Dėl tokio kraujagyslių pasiskirstymo skirtingais embriono vystymosi etapais lėtėja kraujo tėkmė embrionui augant ir palengvėja viščiuko embriono dujų apykaita per kiaušinio lukštą [63].

Viščiuko embriono CAM iš dalies subręsta 7-ąją embriono vystymosi parą, kai histologiškai identifikuojami visi trys CAM sluoksniai, turintys gerai diferencijuotas epitelines, mezodermos ląsteles bei kraujagyslių tinklą [63]. Šiame laikotarpyje CAM dengia tik nedidelę dalį embriono. Dešimtą ir vienuoliktą viščiuko embriono inkubacijos parą CAM yra visiškai subrendusi ir apgaubia visą kiaušinyje esantį turinį (2.4.1 pav.). Kaip nurodo E. I. Deriugina (2008), pilnai susiformavusi CAM yra plona, apie 20–100 µm storio struktūra. Jos hematoksilinu ir eozinu dažytuose pjūviuose aiškiai išsiskiria vieno ar dviejų ląstelių sluoksnio ektoderma, mezoderma, kuri yra sudaryta iš stromos ląstelių, kolageno skaidulų ir skirtingo dydžio kraujagyslių tinklo bei vieną ląstelių sluoksni turinti endoderma [68, 69].

Taip užtrukęs CAM epitelio brendimas, į kurį svarbu atsižvelgti planuojant mokslinius eksperimentus ant viščiuko embriono CAM, yra aiškinamas kaip apsauginio barjero formavimas. Nevisiškai diferencijuotos epitelinės ląstelės negeba vykdyti kalcio jonų ir bikarbonatų difuzijos iki viščiuko embriono kaulų formavimosi pradžios, todėl apsaugo besiformuojantį vaisių nuo perteklinių maisto medžiagų [63]. Vis dėlto, inkubacijos 7-osios paros CAM yra nurodoma kaip pakankamai brandi ir tinkama žmogaus naviko audinių ar ląstelių implantacijai ant jos [35].

Viščiuko embrionas, kaip ir kiti stuburiniai, nuo aplinkos faktorių yra saugomas imuninės sistemos. Pastaroji formuojasi tik išsivysčius tam tikriems viščiuko embriono organams, kuriuose vėliau ir formuojasi specifinės imuninės ląstelės – T ir B limfocitai. T limfocitų gamyba pastebima nuo inkubacijos 11-osios paros jo užkrūčio liaukoje, o B limfocitų gamyba prasideda 12-ąją inkubacijos parą Fabricijaus maišelyje [70]. Imuninių ląstelių kiekis nuo viščiuko vystymosi 15-osios paros pradeda didėti, tačiau san-tykinai kliniškai reikšmingą T ir B limfocitų kiekį viščiuko embrionas sukaupia tik 18-ąją inkubacijos parą [70]. Iki to laiko apsauginę funkciją

atlieka nespecifinė imuninė sistema, kurios ląstelės – monicitai, makrofagai ir heterofilai – aptinkami viščiuko embriono trynio maiše, blužnyje, žarnose, čiobrialiaukėje ir kepenyse nuo embriono inkubacijos 10-osios paros [70]. Viščiuko heterofilai yra žinduolių neutrofilų analogas, taip pat ir pagrindinis matrikso metaloproteinazių 9 šaltinis [33]. Nepaisant to, tiek viščiuko embriono, tiek ką tik išsiritusio viščiuko imuninė sistema yra laikoma menkai išsivysčiusia.

Taigi, CAM yra labai heterogeniška skirtingais jos ir viščiuko embriono formavimosi laikotarpiais. CAM morfologiniai ypatumai, pavyzdžiui, nevienodas endotelio ląstelių brandos lygis, kraujagyslių skaičiaus ir jų išsidėstymo skirtumai, ekstraceliulinio matrikso ar tarpląstelinių jungčių pokyčiai, augant embrionui, įpareigoja tyrėjus eksperimentiniams *in vivo* modeliams naudoti ir lyginti tik tos pačios inkubacijos paros embrionus ir jų CAM.



2.4.1 pav. Viščiuko embriono CAM formavimasis – inkubacijos 5-oji ir 10-oji paros

#### 2.5. Viščiuko embriono CAM eksperimentiniai modeliai

Viščiuko embriono CAM dėl tankaus ir anksti susiformuojančio kraujagyslių tinklo literatūroje yra apibūdinama kaip puiki terpė kitų gyvūnų ir/ar žmogaus audinių ar ląstelių implantacijai. CAM geba visiškai aprūpinti implantą maisto medžiagomis ir deguonimi bei pašalinti jo apykaitos produktą anglies dvideginį. Tokiu būdu viščiuko embriono CAM užtikrina ant jos implantuotų ląstelių kultūrų ar audinių augimui reikalingus mitybinius poreikius. Taigi, sudaro sąlygas implantams prigyti, augti ir plisti CAM struktūromis ir/ar metastazuoti į viščiuko embriono organus [33]. Be to, dėl vėlai susiformuojančios ir menkai išsivysčiusios imuninės sistemos yra minimali prigijusių ląstelių kultūrų ar audinių atmetimo reakcijos tikimybė [70]. Moksliniais tyrimais nustatyta, jog tuomet, kai viščiuko embriono imuninė sistema dalinai subręsta (18-ąją inkubacijos parą), jos gynybinis atsakas į implantuotas ant CAM medžiagas būna panašus į tokį, kuris pasireikštų šias medžiagas implantavus žinduolių ar graužikų organizmuose [70].

Palyginus viščiuko, graužikų ir žmogaus genomus nustatyta, kad tiek žmogaus, tiek graužikų genomas yra bent tris kartus didesnis nei vištos. Nepaisant to, jame aptinkama tiek pat genų porų kaip ir žmogaus ar žiurkės genų rinkinyje. Ištyrus vištos ir žmogaus genomus nustatyta, kad 60 proc. vištos genų turi po 1 žmogaus ortologą, t. y. žmogaus ir vištos ortologiniai genai išlaiko 60 proc. sekos panašumą. Be to, vištos genome esama ir tokių genų, kurie aptinkami ir žmogaus genų rinkinyje, bet nerandami graužikų genome, pavyzdžiui, interleukin-26, todėl, tyrinėjant šį imuninės sistemos moduliatorių, vienintelė galima *in vivo* terpė yra višta ar jos embrionas [70]. Taigi, genetiniu požiūriu viščiuko embriono CAM, taip pat kaip ir graužikai, yra tinkama daugeliui *in vivo* studijų su žmogaus ląstelėmis ar audiniais vykdyti.

Europos konvencijoje dėl ekperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (Žin., 2007, Nr. 49-1883) bei Lietuvos Respublikos valstybinės veterinarijos tarnybos direktoriaus 1999 m. sausio 18 d. įsakyme Nr. 4-16 "Dėl laboratorinių gyvūnų naudojimo moksliniams bandymams" (Valstybės žinios. 1999, Nr. 49-1591) yra numatyta, jog moksliniams eksperimentams su vištos embrionais specialaus tarnybos leidimo nereikia. Tačiau šiuose dokumentuose taip pat nurodoma, kad prieš atliekant mokslinius tyrimus su gyvūnų embrionais turi būti griežtai suplanuotas ir kiek įmanoma sumažintas eksperimentui naudojamų embrionų kiekis [71]. Be to, viščiuko embriono CAM modelis yra patvirtintas JAV maisto ir vaistų administracijos (MVA) kaip tinkamas ir informatyvus naudoti prieklinikinėse studijose, siekiant įvertinti vaistų efektyvuma [70].

Šio modelio privalumas – greitai gaunami tyrimo rezultatai. Eksperimentas ant CAM paprastai trunka tik 4–11 parų, o pasitelkus graužikų modelius, pirmi rezultatai gali pasireikšti tiktai po 3–6 savaičių [70]. Implantai ant CAM prigyja greitai, membranos reakcija į juos gali būti monitoruojama kasdien, o pokyčiai įvertinami realiu laiku ir tiesiogiai per langelį kiaušinio lukšte. Tai minimalių materialinių išteklių bei santykinai nedaug laiko sąnaudų reikalaujantis tokio tipo *in vivo* ekperimentinis modelis [33, 70].

Kad viščiuko embriono CAM yra pritaikoma ne tik teoriškai, bet ir praktiškai, įrodo Nobelio premija apdovanoti moksliniai atradimai: pirmo onkogeno [72], nervų sistemos augimo faktoriaus [73] ir viruso įtakos navikinės ląstelės genomui atradimas [74]. Šie moksliniai tyrimai buvo įgyvendinti pasirenkant CAM kaip eksperimentinę terpę.

Nepaisant visų aukščiau išvardintų šio modelio privalumų, aprašomi ir kai kurie jo trūkumai. Pavyzdžiui, trumpa viščiuko embriono inkubacijos trukmė, dėl to ant CAM negali būti atliekami ilgalaikiai moksliniai tyrinėjimai. Eksperimento rezultatų interpretacijai reikalingų viščiuko audinių ir/ar kraujo mėginių kiekis taip pat ribotas. Nemažu šio modelio trūkumu laikomas ir CAM heterogeniškumas, nes eksperimentus reikia atlikti tomis pačiomis inkubacijos paromis ir vertinti tik tos pačios inkubacijos embrionų CAM. Dėl šios priežasties mokslinėje literatūroje pateikiami skirtingi ant CAM atliekamų eksperimentų protokolai [33, 70].

Viščiuko embriono CAM, kaip modelio sistemos, mokslinio *in vivo* tyrimo privalumai ir trūkumai išdėstyti 2.5.1 lentelėje.

C	CAM privalumai		CAM trūkumai
<ol> <li>Tankus k</li> <li>Terpė, ap</li> </ol>	raujagyslių tinklas. rūpinanti implantą visomis	1.	Negali būti atliekami ilgalaikiai stebė- jimo tyrimai.
deguonin	nis maisto medziagomis ir ni.	Ζ.	mėginių kiekis.
<ol><li>Vėlai sus</li></ol>	iformuojanti imuninė sistema.	3.	CAM yra heterogeniška ir per parą tiek
<ol> <li>Nereikali mas eksp</li> </ol>	ngas specialus etikos leidi- erimentui atlikti.		membranos sandara, tiek kraujotakos ypatumai keičiasi.
<ol> <li>Vištos ge niams tyr ar ląsteliu</li> </ol>	nomas yra tinkamas moksli- imams su žinduolių audiniais į kultūromis.	4.	Skiriasi protokolai, aprašantys eksperi- mentus ant CAM.
<ol> <li>Reakcija monitoru</li> </ol>	į implantą gali būti nuolatos ojama.		
7. Reakcija ma realiu	į implantą gali būti įvertina- laiku.		
8. Mažos la	iko sąnaudos.		
9. Minimali	īs eksperimento kaštai.		

2.5.1 lentelė. Viščiuko embriono CAM privalumai ir trūkumai

CAM - chorioalantojinė membrana.

D. Ribatti nurodo, kad iki 2014 metų viščiuko embriono CAM buvo naudojama įvairių navikų ląstelių ir jų audinių tyrinėjimams [33, 34] (2.5.2 lentelė).

Žmogaus navikų ant CAM tyrimai	Ląstelių kultūrų ant CAM tyrimai
Endometriumo adenokarcinoma	Kinų žiurkėno kiaušidės ląstelių agregatas
(D. Ribatti, 1996)	transfekuotas endotelinu–1 (A. Cruz, 2001)
Kiaušidės endometrioma (R. Ria,	Žmogaus dauginės mielomos izoliuotos plazmos
2002)	ląstelės (S.H. Jee, 2004)
Glioblastoma (N. Balčiūnienė, 2009)	Eritroleukemijos ląstelės (S. Pacini, 2008)
Galvos ir kaklo plokščiųjų ląstelių	GM7373 endotelio ląstelės, ekspresuojančios Upa
karcinoma (G.J. Petruzelli, 1993)	(D. Ribatti, 1999)
Hepatoceliulinė karcinoma A. Mar-	Ginekologinių navikų ląstelių linijos (I. Ishiwata,
zullo, 1998)	1998)
Lipoma (E. Luracelli, 1999)	Limfoblastoidinės ląstelės (A. Vacca, 1998)
Limfoma (M Klingenberg, 2014)	Krūtų naviko ląstelės, transfekuotos int-2 onkogenu
B ląstelių ne Hodžkino limfoma	(M. Costa, 1994)
(D. Ribatti, 1990)	Krūtų naviko ląstelės, transfekuotos VEGF (D. Ri-
Meningioma (M. Klagsburn, 1976)	batti, 2001)
Neuroblastoma (D. Ribatti, 2002)	Melanomos ląstelės (R. Auerbach, 1976)
	Pelės B–16 melanomos ląstelės (M. Takigawa,
	1990)
	Neuroblastomos lastelių linija (D. Ribatti, 2002)
	Švano neurofibromos lastelės (S. Sheela, 1990)
	Kasos latako lastelės (B. Movahedi, 2008)
	Šlapimtakių karcinomos lastelės, turinčios žema
	MKP-1 ekspresija (K. Okamura, 1995)
	Walker karcinomos 256 lastelės (M. Klagsburn,
	1976)
	<i>'</i>

**2.5.2 lentelė.** Eksperimentiniai in vivo tyrimai implantuojant žmogaus navikus ar ląstelių kultūras ant viščiuko embriono CAM

CAM – chorioalantojinė membrana.

# 2.6. Piktybinių ir nepiktybinių navikų bei naviko ląstelių poveikio viščiuko embriono CAM ištyrimo aspektai

Viščiuko embrionas moksliniams stebėjimams yra naudojamas nuo antikos laikų. Aristotelis, atvėręs kiaušinio lukštą, vertino ir aprašė embriogenezės etapus [70]. Viščiuko embriono modelis yra naudojamas moksliniams tyrinėjimams iki šiol, o literatūroje galima aptikti įvairius tiek nepiktybinių, tiek piktybinių navikų ląstelių ar jų audinių poveikio CAM ištyrimo protokolus [35, 70].

Literatūroje nurodoma, kad CAM jau nuo inkubacijos 7-osios paros yra pakankamai subrendusi ląstelių kultūrų ir/ar audinių implantacijai, todėl moksliniai eksperimentai dažniausiai pradedami būtent šiuo periodu [63, 75]. Yra nustatyta, kad naviką implantavus iki embriono inkubacijos 10-osios paros (7–10-ąją parą), angiogenezė CAM paspartėja kur kas labiau, nei jį implantuojant 11-ą inkubacijos parą ar vėliau [35, 75]. Manoma, tai vyksta dėl to, kad CAM endotelio ląstelės pasižymi stipriu mitotiniu aktyvumu tik iki 10-os inkubacijos paros, kuris jau 11-ą parą pradeda sparčiai mažėti. Dėl šių CAM savybių, naviko gabalėlius implantuojant ant labiau subrendusios CAM, kaip rodo moksliniai tyrinėjimai, naviko ląstelių kultūros ar audiniai dažnai neprigyja ar tiesiog panyra į alantojį, palikdami membranoje skylę [75]. Taigi, dauguma navikų tyrimo ant CAM protokolų nurodo, jog 7–11-oji viščiukų embrionų inkubacijos paros yra tinkamiausios ir informatyviausios mokslinams eksperimentams vykdyti [33, 35, 76, 77].

Pastebėta, kad CAM reakcija į implantą būna greita, t. y. pirmieji CAM pokyčiai dažniausiai matomi praėjus vos 24 val. po naviko gabalėlio ar ląstelių kultūros implantavimo. Šiame etape stebimas spartus kraujotakos suintensyvėjimas, taip pat membranos bei jos epitelio storėjimas [35]. Remiantis D. Ribatti [35], per pirmasias 24 val. kraujotakos intensvvėjimas turėtų būti interpretuojamas kaip vazodilatacija, ir tik po to, autoriaus teigimu, pradeda daugėti smulkiųjų kraujagyslių. Iki šiol yra diskutuojama, kaip nustatyti, ar procesai, vykstantys CAM po naviko implantavimo, yra naviko lastelių indukuota vaskolugenezė, ar tiesiog naujų kraujagyslių formavimasis iš jau esančiuju (angiogenezė) [62, 78]. Dėl šios priežasties rekomenduojama vertinti ne tik kraujagyslių skaičių CAM mezodermoje po naviko gabalėliu, bet ir išmatuoti atstumą tarp jų, ar tiesiog suskaičiuoti kraujagysles fiksuotame ploto ar ilgio vienete [35, 79]. Daugumoje eksperimentinio viščiuko embriono modelio tyrimo protokolų kraujagyslinę CAM reakciją rekomenduojama vertinti praėjus 48, 72 ir 96 valandoms po naviko implantavimo [34, 35, 80]. D. Ausprunk ir J. Folkman mokslinių studijų rezultatai rodo, kad per 24 val. po navikinio audinio implantacijos vyksta naviko lastelių dezintegracija, o CAM tuo metu pradeda atsirasti naujų smulkiųjų kraujagyslių. Pastarosios tuo pat metu orientuojasi ir nukrypsta naviko gabalėlio link. Ši fazė dažniausiai yra vadinama prieškraujagysline ir trunka vidutiniškai 24–72 val. [33, 34, 75–77, 80].

Praėjus prieškraujagyslinei fazei, kraujagyslės penetruoja navikinį audinį ir aprūpina jo ląsteles viščiuko embriono krauju ir maisto medžiagomis. Taigi, naviko tūrio didėjimas ir navikinių ląstelių metastazavimas ant viščiuko embriono CAM aprašomas tik po šios kapiliarų penetracijos fazės praėjus maždaug 24 valandoms [33, 34, 80]. CAM kraujagyslių reakcija į žmogaus naviko implantą pateikta 2.6.1 pav.



2.6.1 pav. CAM kraujagyslių reakcija į implantuotą naviko gabalėlį

Kraujotakos ypatybės eksperimentinėse viščiuko embriono CAM yra vertinamos skaičiuojant kraujagysles histologiniuose H&E dažytuose prieparatuose bei taikant histochemiją *Sambucus nigra* lektinu. Pastarasis, yra žinoma, jungiasi specifiškai prie viščiuko embriono kraujagyslių endotelio ir nudažo jį ruda spalva. Dėl šios priežasties galima identifikuoti tiek tas embriono kraujagysles, kurių daugėja CAM mezenchimoje, tiek tas, kurios penetravo implantuoto naviko gabalėlį ir šakojasi jame [68]. Be to, aktyvią neoangiogenezę bei vaskulogenezę viščiuko embriono CAM galima patvirtinti ir kitais imunohistocheminiais tyrimo metodais, pavyzdžiui, naudojant reagentą antimatrikso metaloproteinazę 9 (MMP 9). Jos raiška membranoje rodo heterofilų buvimą, o pastarieji, remiantis D. Ribatti (2014),visuomet telkiasi naujų kraujagyslių formavimosi vietose ir yra vienas iš netiesioginių vaskulo ir angiogenezės indikatorių [33].

Eksperimentiniuose angiogenezės tyrimuose vis dažniau atliekama *in vivo* biomikroskopija, naudojant fluorescuojančius proteinus ir/ar be jų [80]. Tokiu būdu siekiama papildyti informaciją apie naujų kraujagyslių formavimąsi, stebint, kaip dienomis ar valandomis keičiasi CAM kraujagyslių skaičius ir jų išsidėstymas po naviko implantavimo. Kraujagyslių vizualizaciją labai palengvina fluorescuojančių proteinų injekcija į stambiausią CAM gyslą. Pasiskirsčius šiai medžiagai po viščiuko embriono kraujotakos tinklą, išryškėja ne tik smulkiosios kraujagyslės, bet ir galima įvertinti, kaip intensyviai implantuotas audinys yra aprūpinamas viščiuko embriono krauju [35, 81].

Tuomet, kai gerai vaskuliarizuoto naviko gabalėlio ląstelės pradeda daugintis, stebimas spartus naviko tūrio didėjimas ir/ar naujų židinių (metastazių) formavimasis [33, 80]. Literatūroje nurodoma, jog šie pokyčiai gali būti įvertinti tiek atliekant *in vivo* biomikroskopiją, kurios metu galima vizualiai stebėti ir sekti šiuos navikinio audinio pokyčius, tiek naudojant specifinius imunohistocheminus reagentus.

Kai implantuotas ant CAM naviko gabalėlis prigyja, tiek po pirmo, tiek po kartotinių jo pasažų ant CAM, jei tokie atliekami, reikalinga patvirtinti, kad naujai augantis darinys nepakeitė savo morfologinės struktūros. Prigijusio ir išplitusio epitelinės kilmės naviko morfologijai patvirtinti naudojamas didelės molekulinės masės Citokeratinas (HMW CK). Šis imunohistocheminis reagentas specifiškai jungiasi prie audinio epitelinių ląstelių ir nudažo jas ruda spalva [82]. Minėtų ląstelių identifikavimas patvirtina, kad ant CAM augantis darinys yra šių ląstelių kilmės navikas, o tai būdingas GPLK bei GP požymis [82].

Daugumoje tokio tipo studijų yra nustatomos ir ant CAM implantuoto audinio ar ląstelių kultūrų proliferacinės savybės [33, 68, 69]. Mitotiškai aktyvios žmogaus naviko ląstelės, kaip nurodoma literatūros šaltiniuose, pasižymi teigiama imunohistochemine raiška į Ki-67 žymenį prieš žmogaus ląsteles. Ki-67 yra monoklininis antikūnis, kuris gautas imunizuojant eksperimentines peles Hodžkino limfomos lastelių kultūros L428 branduoliais [83]. Šis žymuo selektyviai jungiasi prie chromosomos paviršiuje dislokuotų baltymų molekulių, todėl aptinkamas tik žmogaus naviko lastelių branduoliuose [83] ir tik tu lasteliu, kurios vra aktyvioje lastelės gyvavimo stadijoje ( $G_1$ , S,  $G_2$ , ir mitozė). Ląstelės, kurių proliferacinė geba yra menka (ramybės ar G<sub>0</sub> fazė), pasižymi neigiama Ki-67 žymens raiška. Taigi, nustačius ir patvirtinus naviko lastelių branduoliuose aktyvią mitozę, galima teigti, kad tiriamasis navikinis audinys implantuotas ant CAM ne tik prigijo, bet ir dauginasi. Šio reagento raiškos ieškoma ir naujai susiformavusiuose patologinio audinio židiniuose (metastazėse) ant CAM bei naviko invazijos į CAM vietose [33, 50, 68, 69, 84].

Aktyviai besidauginančios ląstelės gali būti identifikuojamos ir naudojant proliferuojančių ląstelių branduolių antigeną (PLBA). Šis baltymas dalyvauja ląstelės cikle kaip DNR replikacijos ar atsistatymo (reparacijos) procesų kofaktorius, todėl kaip ir Ki-67 aptinkamas išimtinai mitotiškai aktyvių ląstelių branduoliuose [85]. Nors PLBA žymuo nurodo ne tik naviko, bet ir viščiuko embriono CAM besidauginančias ląsteles, nustačius visų trijų antikūnų (DMM CK, Ki 67 ir PLBA) teigiamą imunohistocheminę raišką metastaziniuose bei invaziniuose naviko židiniuose, neabejotinai patvirtinamas epitelinės kilmės navikinio audinio gebėjimas augti ant viščiuko embriono CAM ir plisti CAM struktūromis [33, 50, 68, 84].

Taigi, remiantis žiniomis, jog *in vivo* užaugintų naviko ląstelių vystymosi fiziologiniai etapai yra panašesni į vykstančius joms dauginantis žmogaus organizme, nei jas kultivuojant *in vitro* terpėje, pastarasis tyrimo modelis darosi vis mažiau moksliškai svarus, kai tiriami žmogaus navikų fiziologiniai procesai [27]. Atsižvelgiant į visa tai, viščiuko embriono CAM yra ne tik saugus, santykinai greitas ir pigus, bet ir patikimas *in vivo* eksperimentinis modelis, kuris pastaruoju metu vis plačiau naudojamas daugelio rūšių navikų biologiniams mechanizmams tirti, taip pat besiaiškinant įvairių vaistų bei augimo faktorių poveikį pastarųjų genezei [27].

Nepaisant šių mokslinių pasiekimų, GPLK ir GP navikų poveikis viščiuko embriono CAM dar nėra ištirtas. Be to GPLK ir GP navikai yra menkai ištirti ir taikant kitus eksperimentinius *in vivo* modelius [27].

Todėl mes, atsižvelgdami į šios problemos aktualumą, atlikome pirmąjį pasaulyje eksperimentinį *in vivo* tyrimą, išanalizavome GPLK ir GP naviko gabalėlių biologines išraiškas viščiuko embriono CAM ir palyginome jas su klinikine šių navikų išraiška pacientų – GPLK ir GP "donorų" – organizme. Tikimės, kad mūsų studijos rezultatai padės suprasti tam tikrus GPLK ir GP fiziologinius ir klinikinius aspektus, o ateityje galbūt pagelbės vertinant vaistų, skirtų šioms ligoms gydyti, efektyvumą.

#### **3. DARBO METODIKA**

# 3.1. Eksperimente dalyvavusių pacientų anketiniai ir klinikiniai duomenys

Pacientai, kuriems 2010–2011 metais dėl GPLK bei GP LSMU Ausų nosies ir gerklės (ANG) ligų klinikoje bei LSMU filiale Onkologijos ligoninėje buvo atlikta endolaringinė patologinių audinių ir/ar gerklų šalinimo operacija ir 2 pacientai dėl minėtų ligų operuoti 2015 metais, gavus pacientų sutikimą, buvo įtraukti į "Gerklų plokščiųjų ląstelių karcinomos ir gerklų papilomos biologinės išraiškos viščiuko embriono chorioalantojinėje membranoje" tyrimą. Prieš pradedant vykdyti eksperimentą, surinkti jame sutikusių dalyvauti pacientų anketiniai duomenys, t. y. pacientų amžius bei jų lytis.

GPLK ir GP diagnozė pacientams buvo nustatyta iki eksperimento pradžios, t. y. po endolaringinės patologinių audinių biopsijos. Bioptatai buvo ištirti LSMU Patologinės anatomijos klinikoje. Histologiškai patvirtinus GPLK diagnozę, pacientams buvo atliekama gerklų kompiuterinė tomografija ir nustatytas naviko išplitimo lygis. Ligos istorijoje bei tyrimo protokole tai pažymėta T raide pagal TNM klasifikaciją, kur T1 – navikas apėmė tik vieną gerklų aukštą, T2 – navikas apėmė du anatominius gerklų aukštus, T3 – navikas išplito gerklose, tačiau neišplito už jų ribų, T4 – navikas rastas išplitęs už anatominių gerklų ribų. Eksperimente dalyvavusių pacientų GP išplitimas vertintas apskaičiuojant Derkay/Coltrera indeksą (3.1.1 lentelė).

Histologiškai nustatytas ir GPLK diferenciacijos laipsnis G. G1– naviko ląstelės vertintos kaip gerai diferencijuotos, G2 – vidutiniškai diferencijuotos, G3 – blogai diferencijuotos, G4 – nediferencijuotos.

Tyrimo metu taip pat buvo vertinta GPLK ligos eiga praėjus 4,5–5 metams po naviko, gerklų dalies ar visų gerklų pašalinimo. Protokole registruota, kurie ligoniai per minėtą laikotarpį išgyveno, bei pažymėta, kuriems iš jų atsirado atokiųjų GPLK metastazių kituose organuose po pirminio naviko/gerklų šalinimo operacijos. Minėtos klinikinės GPLK ir GP ligos išraiškos buvo palygintos su šių navikų išraiškomis viščiuko embriono CAM.

Atitinkamai vertinti ir protokole pažymėti duomenys apie GP klinikinę eigą, t. y. registruota, kiek endolaringinių GP šalinimo operacijų dėl GP recidyvo buvo atlikta iki eksperimento pradžios ir nuo eksperimento pradžios praėjus 4,5–5 metams. Pastarieji duomenys nevertinti tų studijos dalyvų, kurių GPLK ar GP naviko gabalėliai implantacijai ant CAM paimti 2015 metais.

Derkay/Coltrera indeksas				
Kiekvienoje gerklų anatominėje srityje skaitine verte įvertintas GP išplitimo lygis, atitinkamai: 0 = nėra GP požymių, 1 = GP požymiai gleivinės paviršiuje, 2 = iškilus GP augimas ant gerklų gleivinės, 3 = stambus GP darinys balso plyšyje.				
Antgerklis:				
Liežuvinis paviršius	Gerklinis paviršius			
Vedeginės antgerklio klostės				
Dešinė	Kairė			
Prieangio klostės				
Dešinė	Kairė			
Tikrosios balso klostės				
Dešinė	Kairė			
Priekinė gerklų jungtis				
Dešinė	Kairė			
Užpakalinė gerklų jungtis				
Dešinė	Kairė			
Trachėja:				
Viršutinis trachėjos trečdalis				
Vidurinis trachėjos trečdalis				
Apatinis trachėjos trečdalis				
Bronchai:				
Dešinysis	_ Kairysis			
Tracheostoma				
Kiti organai:				
Nosis				
Gomurys				
Ryklė				
Stemplė				
Plaučiai				
Kiti				
Bendra balų suma				

GP – gerklų papiloma.

Visi eksperimento etapai buvo vykdomi vadovaujantis Biomedicininių tyrimų etikos įstatymu (Žin., 2000, Nr. 44-1247), gavus Kauno regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto pritarimą dėl biomedicininio tyrimo papildymo (Nr. P1-BE-2-34/2007) bei Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos leidimą atlikti asmens duomenų tvarkymo veiksmus (Nr. 2R-5189 (2.6-1)). Atrankos kriterijus atitikę pacientai apie dalyvavimą tyrime informuoti jiems pateikus Kauno regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto ratifikuotą asmens informavimo formą. Savo sutikimą dalyvauti tyrime pacientai patvirtino šią formą pasirašydami. Pacientų duomenys buvo įslaptinti, kiekvienam jų suteiktas asmens identifikavimo kodas, kaip to reikalaujama Valstybinės duomenų apsaugos inspekcijos direktoriaus įsakyme (Nr. 1T-96 (1.12)).

# 3.2. Viščiuko embriono chorioalantojinės membranos eksperimentinis modelis

#### 3.2.1. Kiaušinių inkubavimas ir langelių atidarymas

Tyrimui naudoti apvaisinti Cobb-500 veislės vištų kiaušiniai, gauti iš Dovainonių paukštyno, Lietuva. Kiekvienam planuojamam eksperimentui naudota po 20 kiaušinių, kurie buvo sudedami į inkubatorių (Maino Enrico, Italija) Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (LSMU) Histologijos ir embriologijos katedros laboratorijoje. Inkubavimui pasirinktos literatūroje nurodytos embrionų vystymuisi optimalios sąlygos, t. y. nustatyta 37.7 °C temperatūra, 59-60 proc. santykinė drėgmė bei įjungta kiaušinių vartymo funkcija 24 valandas per parą. Šiose sąlygose besivystantys viščiuko embrionai buvo laikomi 72 val. Praėjus minėtam laiko tarpui, kiaušinių lukštai buvo dezinfekuoti 70 proc. etilo spiritu. Bukasis kiaušinio galas punktuotas steriliu švirkštu, pašalinant apie 2,0 ml jame esančio baltymo. Šiame embriono vystymosi periode kiaušinio baltymas būna skaidrus ir skystas, todėl lengvai išsiurbiamas reikiamas jo kiekis. Atlikus minėtą procedūrą, besivystanti viščiuko embriono CAM nusileidžia apie 0,5 cm žemyn, todėl nebūna prilipusi prie kiaušinio lukšto vidinės pusės. Tokiu būdu embrionas apsaugomas nuo galimo pažeidimo per tolimesnius tyrimo etapus bei vizualizuojama viščiuko embriono CAM. Punkcijos vieta buvo užklijuojama steriliu pleistru. Po to mechaniniu greitaeigiu gražtu kiaušiniu lukštuose išgrežti apie 1,0 cm<sup>2</sup> apvalūs langeliai. Per atidarytus langelius įvertinti besivystantys viščiuko embrionai. Tie, kurie rasti gyvybingi, t. y. gemaliniame diske turėjo plakančią širdį ir besiformuojantį kraujagyslių tinklą, buvo patalpinti atgal i inkubatorių, prieš tai langelius uždengus sterilia, permatoma

plastikine plėvele. Plėvelė išsaugojo reikiamą drėgmę kiaušinio viduje, be to, per ją buvo galima stebėti tolesnius tyrimo etapus. Neapvaisinti vištų kiaušiniai iš eksperimento buvo pašalinti.

Tolesniems tyrimo etapams tinkami ir pagal aprašytą metodiką paruošti besivystantys viščiuko embrionai toliau inkubuoti tomis pačiomis sąlygomis (temperatūra 37.7 °C, santykinė drėgmė 59–60 proc.), tik išjungus kiaušinių vartymo funkciją iki GPLK ir GP gabalėlių implantacijos dienos.

# **3.2.2. GPLK ir GP audinio gabalėlių implantavimas ant viščiuko embriono CAM**

Operacijos metu nuo paciento balso klosčiu pašalinus patologinius GPLK ar GP audinius, nedidelė jų dalis, vidutiniškai 0,5×0,5×0,5 cm<sup>3</sup> dydžio, buvo atpjauta ir patalpinta į indelį su fiziologiniu tirpalu, kurio vidutinė temperatūra siekė 18–20 °C. Šie "švieži" GPLK (N=12) ir GP (N=13) audinio gabalėliai skubiai, t. y. per maždaug 45 minutes po atpjovimo, nugabenti į LSMU Histologijos ir embriologijos katedros laboratorija, kur buvo implantuojami ant eksperimentui paruoštų viščiuko embriono CAM 7-9-ąją jų inkubacijos para. Šiuo embrionu vystymosi periodu, remiantis literatūros duomenimis, viščiuko embriono CAM būna pakankamai subrendusi naviko gabalėlio ir/ar lastelių kultūros implantavimui, nes turi jau susiformavusį kraujagyslių tinklą, bet dar neišsivysčiusią imuninę sistemą, taigi yra pajėgi užtikrinti implantuoto naviko mityba ir augima ant CAM [68, 69]. Kiekvienas GPLK ir GP audinio gabalėlis Petri lėkštelėje su fiziologiniu tirpalu chirurginiu skalpeliu buvo supjaustytas į maždaug 2,0×2,0×2,0 mm<sup>3</sup> dydžio fragmentus. Pastarieji švelniai uždėti ant viščiuko embriono CAM šalia stambiausios CAM kraujagyslės, implantuojant po vieną GPLK ar GP fragmenta vienai CAM per langelį kiaušinio lukšte. Ši metodika aprašyta Cushman ir bendr. ir yra laikoma klasikine [86]. Po vieną GPLK ir GP audinio gabalėlį iš kiekvieno eksperimento buvo palikti neimplantuoti. Jie fiksuoti 4 proc. formalino tirpale ir tolesniuose tyrimo etapuose buvo naudojami kaip kontroliniai GPLK ir GP naviko gabalėliai.

Po naviko implantacijos langelis kiaušinio lukšte buvo vėl užklijuojamas sterilia permatoma plėvele. Kiaušinis su implantuotu GPLK ar GP audinio gabalėliu patalpinamas atgal į inkubatorių, paliekant tas pačias inkubavimo sąlygas. Viščiukų embrionai bei ant jų CAM implantuoti GPLK ar GP audinio gabalėliai stebėti OLYMPUS SZX 16 stereomikroskopu (*Olympus Life Science Europa GMBH, Hamburg,* Vokietija) ir fotografuoti per langelius kiaušinio lukšte OLYMPUS SDF PLFL0.3X skaitmenine fotokamera (*Olympus Opticae co. LTD.,* Japonija) bei Nicon skaitmenine fotokamera D80 (*Nicon Corp.,* Japonija) vieną kartą per parą. Eksperimento metu žuvę

embrionai tuojau pat buvo pašalinami iš inkubatoriaus ir utilizuojami, kaip numato Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (Žin., 2007, Nr. 49-1883). Gyvi embrionai, po 2 embrionus kas 24 val. pradedant nuo 48 val. po naviko implantacijos, buvo numarinami 10 proc. formalino tirpalu. CAM su ant jų prigijusiais GPLK ar GP naviko gabalėliais, maždaug 1,0–1,5 cm spinduliu nuo naviko, buvo išpjaunamos ir fiksuojamos 4 proc. formalino tirpale. Dalis ekperimentinių CAM nuo 5-osios GPLK ir GP augimo ant CAM paros buvo vertinamos fluorescencinės stereomikroskopijos metodu, naudojant OLYMPUS SZX 16 stereo mikroskopą (*Olympus Life Science Europa GMBH, Hamburg*, Vokietija), po to CAM su prigijusiais naviko gabalėliais buvo išpjaunamos ir fiksuojamos pagal jau aprašytą metodiką. Eksperimento metu vykdyti tyrimo etapai pavaizduoti 3.2.2.1 pav.

Dalis viščiuko embrionų buvo inkubuoti tomis pačiomis sąlygomis, tačiau ant jų CAM nebuvo implantuoti naviko gabalėliai. Šių embrionų CAM tolesniuose tyrimo etapuose buvo lyginamos su eksperimentinėmis membranomis kaip kontrolinės grupės membranos.



3.2.2.1. pav. Eksperimento metu vykdyti tyrimo etapai

#### 3.3. Eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių bei kontrolinių CAM įvertinimas *in vivo* biomikroskopijos, fluorescencinės stereomikroskopijos, histomorfometriniu ir imunohistocheminiu tyrimo metodais

# **3.3.1.** Eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių įvertinimas *in vivo* biomikroskopijos, fluorescencinės stereomikroskopijos ir histologiniu tyrimo metodais

Implantavus GPLK ir GP naviko gabalėlius, kas 24 val. eksperimentiniai viščiuko embrionai ir jų CAM buvo vertinami OLYMPUS SZX 16 stereomikroskopu (*Olympus Life Science Europa GMBH, Hamburg*, Vokietija). Nustačius, kad embrionai gyvybingi, OLYMPUS SDF PLFL 0.3X skaitmenine fotokamera (*Olympus Opticae co. LTD.*, Japonija) atliktos jų CAM su prigijusiais GPLK ir GP naviko gabalėliais *in vivo* fotografijos.

Tose viščiuko embrionų CAM, kuriose penktą, šeštą ir septintą para po implantacijos buvo matomi aiškūs GPLK ir GP prigijimo požymiai (t. y. ryški CAM kraujagyslių reakcija į implantą, naviko išsisėjimo, metastazavimo ant CAM požvmiai ir aiškiai sustorėjusi CAM po implantuotu GPLK ir GP gabalėliu), prieš embrionų numarinimą buvo atliekama fluorescencinė in vivo stereomikroskopija. Procedūrai naudotas fluorescuojantis anioninis dekstranas 10,0 µl 20,0 mg/m; 70-kDa (Eugene OR, JAV), kuris buvo sumaišytas su fosfato buferiniu tirpalu (FBT) ir suleistas į stambiausia viščiuko embriono CAM kraujagysle insulininiu švirkštu. Praėjus 5 min. po preparato suleidimo, t. y. tuomet, kai injektuota fluorescuojanti substancija tolygiai pasiskirstė CAM kraujotakos tinkle, embrionų CAM su ant jų prigijusiais GPLK ir GP gabalėliais buvo ištirti OLYMPUS SZX 16 stereomikroskopu (Olvmpus Life Science Europa GMBH, Hamburg, Vokietija), po to viščiuko embrionai numarinti 10 proc. formalino tirpalu. CAM su prigijusiais GPLK ir GP naviko gabalėliais pagal 3.2.2 skyriuje aprašytą metodiką išpjautos ir įdėtos į Petri lėkšteles su 4 proc. formalino tirpalu. Taip paruoštos CAM buvo fotografuojamos OLYMPUS SDF PLFL 0.3X skaitmenine fotokamera (Olympus Opticae co. LTD., Japonija), iš abiejų membranos pusių įjungus fotokonversijos funkciją, t. y. naudojant ultravioletine spinduliuote generuojanti filtra (X-Cite series 120PC O, JAV) kartu su žaliai fluorescuojančio proteino filtru prie stereomikroskopo (ŽFP), taip pat ir dienos šviesoje. Eksperimentinės membranos fotografuotos naudojant 4×, 6× ir 8× didinima. Po to CAM su prigijusiais GPLK ir GP naviko gabalėliais buvo įlietos į parafino blokus ir supjaustytos 3 µm storio pjūviais. Taip paruošti histologiniai preparatai buvo naudojami tolesniems eksperimento etapams pagal ištyrimo protokolą (3.3.1.1 pav.).

Histologiniai ekperimentinių ir kontrolinių CAM preparatai buvo nudažyti hematoksilino ir eozino (H&E) dažais ir peržiūrėti OLYMPUS BX40F4 (*Olympus Opticae co. LTD.*, Japonija) šviesiniu mikroskopu. H&E dažytuose preparatuose vertinti GPLK ir GP navikų prigijimo požymiai: CAM ir jos epitelio sustorėjimas, kraujagyslių skaičius ir jų orientacija naviko link, prigijusių gabalėlių histologija ir jų perfuzija viščiuko embriono krauju – implantuose ieškant viščiuko embriono eritrocitų.

	1	Požymio identifikavimui
Pirminis naviko augimas ant CAM	-	
naudoti tyrimo metodai		H&E
l nauju izrauja gurdiu formanimaci farit		hat
1 naujų kraujagyslių formavimosi taze	$\rightarrow$	
CAM kraujagyslių orientacija į implantuotą GPLK		Sambukus nigra
ir GP naviko gabaliuka	$\rightarrow$	lektinas
CAM Israulagueliu iaugimes i prigilusi CPLV		Fluorescencinà
CAM kraujagysnų jaugimas į prigijusį OPLK		Fluorescencine
ir GP naviko gabalėlį		stereo mikroskopija
Naviko lasteliu dauginimasis, invazija j CAM ir nauju		
GPLK ir GP židiniu formavimasis ant CAM		
OTERT OF ZIGHING FORMATIMASIS and CASH		
CDI K is CD lestellin developments ant CAM		
J GPLK ir GP ląstelių dauginimasis ant CAM		
		Ki 67
Naviko plitimas už CAM pamatinės membranos ribų	$\rightarrow$	DI DA
ir lokali GPLK invazija i CAM mezenchima		PLBA
i tenan or are intraaju j et int interentining		DMM Citokeratinas
		Anti MMP 9
GPLK ir GP plitimas į atokiąsias CAM sritis ir	$\rightarrow$	Sambucus niora
naujų naviko židinių susiformavimas,		Jaktinge
ju revaskuljarizacija	$\rightarrow$	lektinas
/1/-		
		Fluorescenciné
		stereo mikroskopija

3.3.1.1 pav. GPLK ir GP poveikio CAM ištyrimo protokolas

#### 3.3.2. Eksperimentinių ir kontrolinių CAM histomorfometrinė analizė

Atrinkti 4 kiekvienos eksperimentinės ir kontrolinės CAM pjūviai. Kiekvienas atrinktos membranos pjūvis nufotografuotas penkiuose regėjimo laukuose (RL) (1 CAM = 4 pjūviai po 5 RL – iš viso 20 RL, t. y. 20 nuotraukų) elektroninio mikroskopo Olympus skaitmenine fotokamera (*Olympus U-CMAD3*, Filipinai), naudojant 10× didinimą. Regėjimo laukai fotografuoti tokiu principu: centriniu, arba pirmu, RL buvo laikyta CAM sritis tiesiai po prigijusiu GPLK ar GP audinio gabalėliu. Į šonus nuo jos – antras ir ketvirtas, arba šalia esantys RL, toliau nuo jų – trečias ir penktas, arba atokieji RL. Kontrolinėse membranose buvo pasirinkti ir nufotografuoti 5 atsitiktiniai RL (3.3.2.1 pav.).



3.3.2.1 pav. Eksperimentinės CAM regėjimo laukai

Siekiant tiksliai įvertinti CAM pokyčius po GPLK ar GP audinio gabalėlių implantacijos, atlikti morfometriniai matavimai CellSensDimention 1.9 Digital Imaging Software for Research Applications (Olympus Corporation of the Americas, JAV) programa. Kiekvienoje eksperimentinės ir kontrolinės CAM RL nuotraukoje atlikta po 15 membranos ir jos epitelio storio matavimu, apskaičiuoti ju vidutiniai dvdžiai. Centriniu ir šalia esančiu RL nuotraukose apskaičiuotas CAM kraujagyslių skaičius. Kraujagyslėmis laikytos tos membranos struktūros, kurios buvo išklotos endotelio lasteliu sluoksniu su branduolį turinčiais viščiuko eritrocitais savo spindyje. Į skaičiavimus įtrauktos kraujagyslės, kurios buvo didesnio nei 8 µm skersmens ties siauriausia spindžio vieta. Centriniame regejimo lauke po prigijusiu GPLK naviko gabalėliu vertintas CAM epitelio vientisumas, o šalia esančiuose ir tolimuosiuose CAM RL įvertinta, ar nesusiformavę atkokieji – satelitiniai – navikų dariniai. Tais atvejais, kai riba tarp epitelio ir implantuoto GPLK naviko gabalėlio buvo neaiški, ar stebėta tiesioginė naviko invazija į CAM, šie požymiai vertinti kaip infiltratyvus GPLK augimas.

#### **3.3.3. Eksperimentinių ir kontrolinių CAM bei ant CAM prigijusių** GPLK ir GP gabalėlių imunohistocheminė analizė

Į parafino blokus įlietos CAM su GPLK ar GP gabalėliais bei kontrolinės CAM papildomai atpjautos 3 μm storio pjūviais (vidutininškai 9 pjūviai 1 reagentui). Preparatai pašildyti termostate 30 min. 62 °C temperatūroje, prieš pradedant taikyti protokolą imunohistochemijai didelės molekulinės masės monokloninio pelės antikūnu prieš žmogaus antigenus Citokeratino *Clone 34βE12 (Dako, JAV) (DMM CK), monokloniniu pelės antikūnu prieš* žiurkės antigenus Ki-67 *Clone MID-5 (Dako, Danija), pA antimatrikso* metaloproteinazės 9 antikūnu (MMP 9) (*Novusbio, JAV*), antikūnu proliferuojančių ląstelių branduoliams nustatyti (PLBA) (*Thermoscientific, JAV*) ir *Sambucus nigra (Elderly) Bark* lektinu (*Vector, JAV*).

#### 3.3.3.1. Imunohistochemija DMM CK antikūnu

Išėmus eksperimentinių CAM preparatus iš termostato, jie deparafinuoti ksilenu *O-Xylene (Sigma Aldrich*, JAV) 3 kartus – 5 min., 4 min. ir 4 min. perdedant į vis kitas talpas rankiniu būdu.

Po to rehidratuoti užpylus 2,0 ml 99,8 proc. izopropilo alkoholio 2 *Propanol (Merk*, Vokietija).

Po to preparatai paveikti 2,0 ml 96 proc. etilo alkoholiu 2 min., tuomet perdėti į kitą indelį ir užpilti 2,0 ml 96 proc. etilo alkoholiu 2 min., nuplauti tekančiu čiaupo vandeniu 1 min., distiliuotu vandeniu 1 min. ir dar kartą distiliuotu vandeniu 1 min.

Antigeno išlaisvinimui preparatai buvo paveikti 0,01 M natrio citrato buferiu *Target retrival* (pH 9), perdėti į kaitinimo puodą ir kaitinti 3 min. 99–100 °C temperatūroje. Preparatai išimti, ant jų uždėtos dengiančiosios plokštelės *Skandon Coverplate* (*LLG labwear*, Australija), po to praplauti 2,0 ml plovimo buferiu *Dako En Vision Flex* (*Dako*, Danija) 5 min.

Imunohistocheminis preparatų dažymas pradėtas peroksidazės blokavimo tirpalo Peroxidase blocking Dako Real (Dako, Danija) 200,0 µl ekspozicija 10 min., po to preparatai praplauti 2,0 ml plovimo buferio 5 min. Toliau naudotas pirminis antikūnas HMW CK, atskiestas antikūno skiedikliu Dako Antibody Diluent (Dako, Danija) santykiu 1:100 30 min. Preparatai plauti 2,0 ml plovimo buferio 5 min., po to naudotas antrinis antikūnas Flex+ mouse linker (Dako, Danija) 100,0 µl 30 min., praplautas 2,0 ml plovimo buferio 5 min. ir paveiktas antriniu antikūnu Flex HPR (Dako, Danija) 100,0 µl 30 min. Preparatus kartotinai praplovus 2,0 ml plovimo buferiu 5 min., jie paveikti chromogenu Dab+Chromogen atskiestu skiedikliu Substrat buffer Dako (Dako, Danija) santykiu 1:50 2 min., praplauti 2,0 ml plovimo buferio 5 min., ir, užpylus 2,0 ml distiliuoto vandens 5 min, nuimtos dengiančiosios plokštelės, preparatai įstatyti į stovelį, kuris patalpintas į distiliuota vandenį 1 min. Tuomet 3 minutėms užlašintas Majerio hematoksilinas Mayer's Haemalum (GCC Diagnostics, Didžioji Britanija). Preparatus praplovus tekančiu čiaupo vandeniu 1 min., jie paveikti amonio vandeniu 30 sek., po to vėl praplauti tekančiu čiaupo vandeniu 1 min.

Paskui preparatai dehidratuoti 2,0 ml 96 proc. etilo alkoholiu 2 min., perdėti į kitą indelį rankiniu būdu ir vėl paveikti 2,0 ml 96 proc. etilo alkoholiu 2 min., tuomet izopropilo akloholiu 2,0 ml 99,8 proc. 2 min., apdoroti ksilenu 2 kartus po 5 min.

Taip paruošti preparatai uždengti dengiamaisiais klijais *Roti Histoki A II* (*Carl Roth*, Vokietija) ir dengiamaisiais stikleliais (*LLG labwear*, Australija) bei išdžiovinti traukos spintoje per 12 val.
HMW CK nusidažiusios ląstelės vertintos elektroniniu mikroskopu OLYMPUS BX40F4 (*Olympus Opticae co. LTD.*, Japonija), preparatai nufotografuoti elektroninio mikroskopo Olympus skaitmenine fotokamera (*Olympus U-CMAD3*, Filipinai), naudojant 10× didinimą.

Ant CAM prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių raiška į HMW CK buvo lyginta su citokeratino raiška kontroliniuose GPLK ir GP naviko gabalėliuose.

#### 3.3.3.2. Imunohistochemija Ki 67, anti MMP 9 ir PLBA antikūnais

Imunohistochemija Ki-67, anti MMP 9 ir PLBA antikūnais buvo atliekama pagal tą patį imunohistochemijos protokolą, tik pirminį antikūną Ki-67 praskiedus su antikūno skiedikliu santykiu 1:30, o anti MMP 9 ir PLBA santykiu 1:100. Imunohistocheminė Ki-67, anti MMP 9 ir PLBA raiška preparatuose vertinta elektroniniu mikroskopu OLYMPUS BX40F4 (*Olympus Opticae co. LTD.*, Japonija), preparatai fotografuoti elektroninio mikroskopo *Olympus* skaitmenine fotokamera (*Olympus U-CMAD3*, Filipinai), naudojant 10× didinimą.

Prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių raiška į Ki-67 ir PLBA antikūnus buvo lyginta su Ki-67 ir PLBA raiška kontroliniuose GPLK ir GP gabalėliuose.

Prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių raiška į anti MMP 9 antikūną buvo lyginta su šio reagento raiška kontrolinėse membranose.

#### 3.3.3.3. Histochemija Sambukus nigra lektinu

Po kaitinimo termostate eksperimentinių CAM preparatams taikyta standartinė deparafinavimo procedūra ksilenu tris kartus, kaip aprašyta 3.3.3.1 skyriuje.

Po to preparatai praplauti distiliuotu vandeniu 2,0 ml 5 min. ir fosfato buferiniu tirpalu (pH 7,2) 1,0 ml 3 min., tada užlašinti 3 lašai 3 proc. vandenilio peroksido (*Valentis*, Lietuva) 10 min. ir praplauta 1,0 ml fosfato buferiniu tirpalu 3 min. Vėliau užlašinta streptavidino (*Vector*, JAV) tirpalo 2–4 lašai 15 min. ir plauta 1,0 ml fosfato buferiniu tirpalu 3 min., po to užlašinti 2–4 lašai biotino (*Vector*, JAV) 15 min. ir vėl plauta 1,0 ml fosfato buferiniu tirpalu 3 min.

Imunohistocheminis dažymas pradėtas ant preparatų užlašinus peroksidazės blokavimo tirpalo 100,0  $\mu$ l (*Vector*, JAV) + 1,0 ml distiliuoto vandens – ekspozicija 30 min., tuomet preparatai plauti 1,0 ml fosfato buferiniu tirpalu 3 min. ir pradėtas dažymas pirminiu antikūnu – 100  $\mu$ l *Sambukus* 

*nigra* (Elderly) *Bark* lektinu (*Vector*, JAV) 10 min. Preparatai praplauti 1,0 ml natrio citrato buferiniu tirpalu 3 min., užlašinti 3 lašai *Elite* ABC tirpalo (*Elite* ABC tirpalas gaminamas prieš jį naudojant tokiu būdu: 5,0 ml fosfato buferinio tirpalo + 2 lašai A reagento iš rinkinio+ 2 lašai B reagento iš rinkinio) 30 min. Praėjus šiam laiko tarpui, preparatai plauti 1,0 ml natrio citrato buferiniu tirpalu 3 min., perlieti chromogenu *Dab+Chromogen* atskiestu su skiedikliu *Substrat buffer Dako* (*Dako*, Danija) santykiu 1:100 ir iš karto nuplauti 1,0 ml natrio citrato buferiniu tirpalu 3 min., nuimtos dengiančiosios plokštelės, preparatai įstatyti į stovelį, kuris patalpintas į distiliuotą vandenį 1 min. Tuomet 3 min. užlašintas Majerio hematoksilinas *Mayer's Haemalum* (*GCC Diagnostics*, Didžioji Britanija). Preparatus praplovus tekančiu čiaupo vandeniu 1 min., jie paveikti amonio vandeniu 30 sek., po to vėl praplauti tekančiu čiaupo vandeniu 1 min.

Tolesniame etape preparatai dehidratuoti pagal prieš tai aprašytą protokolą ir uždengti dengiamaisiais klijais *Roti Histoki A II (Carl Roth*, Vokietija) su dengiamaisiais stikleliais (*LLG labwear*, Australija) ir džiovinti traukos spintoje 12 val. Histocheminė *Sambukus nigra* lektino raiška eksperimentinėse CAM bei GPLK ir GP gabaliukuose, taip pat kontrolinėse CAM vertinta elektroniniu mikroskopu OLYMPUS BX40F4 (*Olympus Opticae co. LTD.*, Japonija), preparatai fotografuoti elektroninio mikroskopo *Olympus* skaitmenine fotokamera (*Olympus U-CMAD3*, Filipinai), naudojant 10× didinimą.

Prigijusių GPLK ir GP reakcija į lektiną buvo lyginama su lektino raiška kontroliniuose GPLK ir GP gabalėliuose bei kontrolinėse CAM.

#### 3.4. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta panaudojant programinį paketą IBM SPSS *Statistics for Windows, Version* 22,0 (Armonk, NY: IBM Corp.).

Apskaičiuoti kiekybinių kintamųjų (požymių) vidurkiai bei standartinisi nuokrypiai, kokybiniai kintamieji įvertinti procentiniais įverčiais.

Normalumo hipotezei tikrinti buvo taikytas Kolmogorovo-Smirnovo testas. Dviejų grupių vidurkių palyginimui, esant normalumui, buvo taikytas Stjudento *t*-testas dviem nepriklausomoms imtims, nesant – grupių palyginimui taikytas Mano-Vitnio U testas (*Mann-Whitney U test*). Daugiau nei dviejų grupių vidurkių palyginimui buvo taikyta dispersinė analizė ANOVA (esant normalumui) ir neparametrinė dispersinė analizė – Kruskalio-Voliso (*Kruskal-Wallis*) testas (netenkinant normalumo).

Kokybinių duomenų tarpusavio priklausomybė vertinta naudojant chikvadrato ( $\chi^2$ ) testą.

Kiekybinių kintamųjų ryšio stiprumas buvo vertintas Pirsono (*Pearson*) arba Spirmeno koreliacijos koeficienas(esant/nesant normalumui).

Reikšmingumo lygmuo  $\alpha$  tikrinant statistines hipotezes buvo pasirinktas 0,05.

Skirtumo tarp vidurkių didumui nustatyti buvo vertinta II rūšies klaida  $\beta$  ir stebimas testo galingumas (Observed Power), kur Observed Power = 1- $\beta$ . Skirtumo dydis vertintas statistiškai patikimu, jei  $\beta \le 0.2$ , kai  $\alpha = 0.05$ .

### 4. PAGRINDINIAI DARBO REZULTATAI

# 4.1. Tyrime dalyvavusių pacientų demografiniai bei klinikiniai duomenys

2010–2011 metais "Gerklų plokščiųjų ląstelių karcinomos ir gerklų papilomos biologinės išraiškos viščiuko embriono chorioalantojinėje membranoje" eksperimente dalyvavo 11 pacientų, sergančių GPLK ir 12 – GP. 2015 metais į studiją įtrauktas 1 pacientas, kuriam operuotos gerklos dėl GPLK ir 1 dėl GP. Iš jų 12 vyrų sirgo GPLK bei 8 moterys ir 5 vyrai, gydomi dėl GP.

GPLK sergančių pacientų amžiaus vidurkis buvo 54  $\pm$  7, o GP – 34  $\pm$  21 metai.

Iš 12 dėl GPLK operuotų pacientų 4 buvo nustatytas G1 diferenciacijos laipsnis, 6 - G2, 2 - G3. Geros ir vidutinės diferenciacijos (G1 ir G2) GPLK navikai nustatyti dažniau nei G3 ir G4 navikai (p = 0,003). Šių pacientų naviko išplitimo lygis T pagal TNM klasifikaciją operacijos dieną buvo pasiskirstęs taip: 4 pacientams diagnozuotas T1(a, b) GPLK išplitimo lygis, 4 - T2, 0 - T3 ir 4 pacientams – T4. Keturi pacientai iki studijos pabaigos neišgyveno, 5 pacientams diagnozuotas atokiųjų GPLK metastazių susiformavimas kituose organuose (4.1.1 lentelė).

Rodiklis	Pacientų duomenys (N = 12)
Lytis (vyrai/ moterys, proc.)	100/0
Amžius (vidurkis ± SN, m)	54 ± 7
GPLK diferenciacijos laipsnis G1	4
GPLK diferenciacijos laipsnis G2	6
GPLK diferenciacijos laipsnis G3	2
GPLK diferenciacijos laipsnis G4	0
GPLK išplitimo lygis T1	4
GPLK išplitimo lygis T2	4
GPLK išplitimo lygis T3	0
GPLK išplitimo lygis T4	4
Mirusiųjų skaičius, praėjus 4,5–5 m. po pirminio naviko pašalinimo operacijos	4
Pacientai, kuriems buvo nustatytos atokiosios GPLK mts	5

**4.1.1 lentelė.** Pacientų, tyrime dalyvavusių dėl GPLK ligos, demografiniai bei klinikiniai duomenys (vidurkis ± SN)

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma, mts – metastazės,

SN - standartinis nuokrypis.

Dėl GP operuotų pacientų vidutinė Derkay/Coltrera reikšmė buvo nustatyta 7  $\pm$  3. Šešis iš 12 GP sergančius pacientus 4,5–5 metų laikotarpyje teko operuoti pakartotinai dėl GP recidyvų, kurių vidutinis dažnis buvo 2  $\pm$  1. O, tie patys pacientai dėl GP recidyvo iki eksperimento pradžios operuoti vidutiniškai 6  $\pm$  4 karto (4.1.2 lentelė).

**4.1.2 lentelė.** Pacientų, tyrime dalyvavusių dėl GP ligos, demografiniai bei klinikiniai duomenys (vidurkis  $\pm$  SN)

Rodiklis	Pacientų duomenys (N = 13)
Lytis (vyrai/ moterys, proc.)	46/54
Amžius (vidurkis $\pm$ SN, m)	$34 \pm 21$
Derkay/Coltrera indeksas (vidurkis ± SN)	$7\pm3$
Operacijų skaičius dėl GP recidyvo iki eksperimento pradžios (vidurkis ± SN)	$6 \pm 4$
Operacijų skaičius dėl GP recidyvo, praėjus 4,5–5 metams po eksperimento pradžios (vidurkis $\pm$ SN)	2 ± 1

GP - gerklų papiloma, SN - standartinis nuokrypis.

#### 4.2. Viščiuko embrionai

Per visą eksperimentą buvo inkubuota 510 kiaušinių. Iš jų, atidarius langelius kiaušinio lukšte, 45 buvo neapvaisinti. Iki GPLK ar GP implantavimo ant CAM dienos išgyveno 393 embrionai. Iki eksperimento pabaigos išgyveno 284 embrionai (4.2.1 pav.).



4.2.1 pav. Viščiuko embrionų gyvybingumas eksperimento metu

### 4.3. Eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių bei kontrolinių CAM *in vivo* biomikroskopiniai, fluorescenciniai stereomikroskopiniai, histomorfometriniai ir imunohistocheminiai tyrimai

# 4.3.1. Eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GPLK naviko gabalėlių *in vivo* biomikroskopinio ir histologinio tyrimo rezultatai

Septintą–devintą kiaušinių inkubacijos parą ant jau susiformavusių viščiuko embriono CAM buvo implantuota 219 GPLK naviko gabalėlių. Eksperimento metu iš visų GPLK gabalėlių, implantuotų ant CAM, įvertinus makroskopiškai, biomikroskopiškai bei histologiniu tyrimu (pjūviuose, dažytuose H&E) prigijusiais laikyti 149 (68 proc.), neprigijo 12 (5 proc.) GPLK gabalėlių. Prigijusiais laikyti tie naviko gabalėliai, kurie buvo tvirtai prikibę prie viščiuko embriono CAM, – ir tai buvo regima plika akimi bei atliekant *in vivo* biomikroskopiją; kai jie sukėlė CAM kraujagyslių reakciją į implantą, kuri buvo pastebima taikant minėtus tyrimo metodus, ir kai visus šiuos požymius patvirtino nurodytas histologinis tyrimas. Atliekant tyrimą, žuvo 58 (27 proc.) viščiuko embrionai su prigijusiu GPLK naviko gabalėliu ant jų CAM.



4.3.1.1 pav. GPLK naviko gabalėliai ant CAM

Visi GPLK gabalėliai, iki eksperimento pabaigos augę ant viščiuko embriono CAM, makroskopinio stebėjimo bei *in vivo* biomikroskopijos metu atrodė gyvybingi. Histologiniu tyrimo metodu buvo nustatyta, jog implantai išlaikė savo histologinę struktūrą, t. y. jų audinyje stebėtos polimorfiškos atipinės plokščio epitelio ląstelės, turinčios stambų branduolį, vieną ar kelis branduolėlius bei gausią eozinofilišką citoplazmą. Stromoje buvo galima matyti įvairiai išreikštą infiltraciją monomorfonuklearais. Kai kuriuose prigijusiuose GPLK naviko gabalėliuose buvo rasti susiformavę plokščiojo epitelio mazgeliai – vadinamieji "keratino perlai".

Nuo antros GPLK augimo ant viščiuko embriono CAM paros *in vivo* biomikroskopijos metu stebėtas kraujagyslių orientavimosi į GPLK naviko gabalėlį fenomenas. Aplink šias kraujagysles matėsi naujai besiformuojantys smulkūs CAM kapiliarai, o histologiniuose preparatuose – heterofilus primenančios ląstelių sankaupos (4.3.1.2 pav.).





4.3.1.2 pav. Ant CAM prigijusių GPLK naviko gabalėlių histologija
Prigijęs GPLK naviko gabalėlis – in vivo biomikroskopija (a). Prigijęs GPLK gabalėlis
(ilga rodyklė), smulkiosios CAM kraujagyslės ir jų orientacija naviko link (mažos rodyklės)
(b). Prigijusiame GPLK gabalėlyje susiformavę "keratino perlai" (c)

H&E dažytuose preparatuose buvo matoma viščiuko embriono kraujagyslių penetracija į GPLK naviko gabalėlį, augantį ant CAM, bei aptikti embriono ertrocitai implanto audinyje (4.3.1.3 a pav.).

Keturiasdešimt aštuonių CAM *in vivo* biomikroskopiniuose vaizduose bei H&E dažytuose pjūviuose stebėtas infiltratyvus GPLK augimas. Kai kurie iš šių naviko gabalėlių (n = 5) peraugo visas viščiuko embriono CAM morfologines struktūras ir infiltravo viščiuko embriono alantojaus maišą, atitinkamai – 1 GPLK gabalėlis 3-iąją parą, 3 gabalėliai 4-ąją parą ir vienas – 5-ąją parą po GPLK implantacijos. Šie GPLK naviko gabalėliai jau nuo trečios augimo ant CAM dienos pažeidė CAM epitelio pamatines membranas, vietomis suformavo epitelines išaugas, vadinamuosius "epitelinius liežuvius", ir skverbėsi žemyn į viščiuko embriono CAM mezenchimą. Trijose iš šių mezenchimų, infiltratyviai CAM atžvilgiu augančioje GPLK, rastas besiformuojantis plokščiojo epitelio mazgelis "keratino perlas" (4.3.1.3 b pav.).



4.3.1.3 pav. Infiltratyvus GPLK augimas ant CAM
 Viščiuko embriono eritrocitai prigijusio GPLK audinyje (a).
 Viščiuko embriono CAM peraugęs ir infiltratyviai jos atžvilgiu augantis GPLK navikas (b)

Keturiasdešimt aštuoni iš 149 prigijusių GPLK gabalėlių suformavo metastazių židinius, primenančius GPLK struktūrą, augančius ant viščiuko embriono CAM, atokiai nuo pirminio GPLK (naviko gabalėlių, kurie buvo implantuoti ant CAM). Trijose jų rastos daugybinės metastazės, t. y. susiformavę daugiau nei 3 nauji židinukai šalia pirminio GPLK implanto.

Aplink prigijusius GPLK naviko gabalėlius ir jų metastazes makroskopiškai bei *in vivo* biomikroskopijos būdu stebėta ryški CAM kraujagyslių reakcija, t. y. kraujagyslių pritraukimas link naviko ir vadinamojo stipininio ratelio (*spoked-wheel*) susiformavimas. Šio tipo CAM reakcija į GPLK gabalėlį nustatyta nuo 3-iosios paros po tumoro implantacijos (4.3.1.4 pav.).



**4.3.1.4 pav.** GPLK metastazės ant CAM Ilga rodykle pažymėtas implantuotas GPLK gabalėlis ir *spoked-wheel* fenomenas, trumpomis rodyklėmis – daugybiniai metastaziniai GPLK židiniai ir *spoked-wheel* fenomenas (a); histologinis GPLK metastazinio darinio ant CAM vaizdas (b)

# 4.3.2. Eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GP naviko gabalėlių *in vivo* biomikroskopijos ir histologinio tyrimo rezultatai

Ant susiformavusių viščiuko embriono CAM 7–9 inkubacijos parą buvo implantuoti 174 GP naviko gabalėliai. Iš visų ant CAM implantuotų GP gabalėlių, juos įvertinus makroskopiškai, biomikroskopiškai bei atlikus histologinį tyrimą (pjūviuose, dažytuose H&E), laikyti prigijusiais 92 (53 proc.), neprigijo 26 (15 proc.) GP gabalėliai. Tyrimo metu žuvo 56 (32 proc.) viščiuko embrionai su prigijusiu GP naviko gabalėliu ant jų CAM (4.3.2.1 pav.).



4.3.2.1 pav. GP naviko gabalėliai ant CAM

Visi GP naviko gabalėliai, prigiję ant viščiuko embriono CAM, iki eksperimento pabaigos makroskopiškai bei *in vivo* biomikroskopijos metu atrodė gyvybingi, tačiau, palyginti su GPLK navikais, GP gabalėliai nuo antros paros po implantacijos sukėlė žymią CAM edemą.

Histologiniu tyrimu buvo nustatyta, kad implantai išlaikė savo histologinę struktūrą, t. y. stebėtos didelės plokščiojo epitelio ląstelės, grupėmis išsidėsčiusios apie kraujagyslių stiebelį su įvairiai išreikštu stromos kiekiu gabalėliuose (4.3.2.2 a pav.). Ląstelėse atipijos požymių nebuvo stebėta.



4.3.2.2 pav. GP in vivo biomikroskopija ir histologija

Ant CAM prigijusio GP gabalėlio histologinis vaizdas – kraujagyslių stiebelis ir aplink jį išsidėsčiusios plokščiojo epitelio ląstelės (a). Ant CAM prigijęs GP naviko gabalėlis (ilga rodyklė) ir naujai susiformavę GP židiniai (trumpos rodyklės) – *in vivo* biomikroskopija (b). Ant CAM naujai susiformavę GP židiniai (trumpos rodyklės) bei CAM kraujagyslių orientacija GP gabalėlių link su viščiuko heterofilų sankaupomis aplink jas (ilga rodyklė) – histologija (c)

Aplink prigijusius GP gabalėlius nuo trečios paros po implantacijos makroskopiškai bei stereomikroskopu nustatytas paryškėjęs kraujagyslių tinklas bei vadinamasis stipininis ratelis (*spoked-wheel*). Histologiškai CAM mezenchimos kraujagyslės orientavosi į prigijusį GP naviko gabalėlį nuo antros GP augimo ant viščiuko embriono CAM paros. Aplink šias kraujagysles formavosi smulkūs CAM kapiliarai bei heterofilus primenančios ląstelių sankaupos (4.3.2.2 c pav.).

H&E dažytuose preparatuose pastebėta, jog GP taip pat augo formuodamos CAM epitelio išaugas, kurios aptiktos šalia CAM kraujagyslių. Epitelinės išaugos skverbėsi žemyn į CAM mezenchimą, tačiau nė vieno eksperimento metu nepažeidė CAM epitelio pamatinės membranos.

### 4.3.3. Eksperimentinių CAM bei ant jų prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių įvertinimas fluorescencinės stereomikroskopijos metodu

Penktą augimo ant CAM parą GPLK gabalėliai visose tirtose membranose stebėti apsupti įvairaus diametro kraujagyslių, kurios orientavosi – krypo prigijusio GPLK naviko gabalėlio link ir suformavo aiškų vadinamąjį, stipininį ratelį (*spoked-wheel*). Nepaisant į GPLK naviką nukreipto kraujagyslių tinklo, jo perfuzija viščiuko krauju praėjus 5 paroms po GPLK implantacijos, vertinta kaip minimali: stebėti aktyviai švytintys GPLK naviko kraštai, tačiau pats GPLK gabalėlis, palyginti su jį supančiomis ryškiai fluorescuojančiomis kraujagyslėmis, išliko "tamsus" (4.3.3.1 a pav.).



4.3.3.1 pav. Prigijusių GPLK ir GP navikų fluorescuojanti stereomikroskopija – 5 paros po implantacijos ant CAM
 GPLK naviko gabalėlis ant CAM (ilga rodyklė), stipininis ratelis (trumpos rodyklės) (a). GP naviko gabalėlis ant CAM (ilga rodyklė), stipininis ratelis (trumpos rodyklės) (b)

Penkias paras ant viščiuko embriono CAM augę GP naviko gabalėliai buvo apsupti į juos orientuotų viščiuko kraujagyslių tinklo. Tačiau tiek prigijęs GP gabalėlis, tiek naujai susiformavę papilomos židinukai ant CAM, palyginti su juos supančiu kraujagyslių tinklu, išliko minimaliai fluorescuojantys (4.3.3.1 b pav.).

Šešias paras ant viščiuko CAM augantys GPLK naviko gabalėliai buvo apsupti viščiuko embriono CAM kraujagyslių tinklo. Prigijusio GPLK naviko gabalėlio švytėjimas paryškėjo, palyginti su tais GPLK gabalėliais, kurie ant CAM augo 5 dienas, bet nebuvo toks ryškus, kaip jį supančių viščiuko embriono CAM kraujagyslių (4.3.3.2 a pav.).

Šiuo GP naviko gabalėlio augimo ant CAM laikotarpiu stebėta panaši CAM reakcija į GP gabalėlį, kaip ir į GPLK, t. y. matėsi į GP naviką orientuotos kraujagyslės, tačiau jo, kaip ir naujai susiformavusių papilomos židinukų, perfuzija viščiuko krauju išliko nepilna (4.3.3.2 a, b pav.).



4.3.3.2 pav. Prigijusių GPLK ir GP navikų fluorescuojanti stereomikroskopija – 6 paros po implantacijos ant CAM
GPLK naviko gabalėlis ant CAM (ilga rodyklė), stipininis ratelis (trumpos rodyklės) (a). GP naviko gabalėlis ant CAM (ilga rodyklė), stipininis ratelis (trumpos rodyklės) (b)

Septintą augimo ant viščiuko embriono CAM parą visi fluorescuojančiu metodu tirti GPLK naviko gabalėliai buvo apsupti gausaus, įvairaus dydžio kraujagyslių tinklo bei visiškai aprūpinti viščiuko embriono krauju. Tai pavaizduota 4.3.3.3 a paveiksle, kur prigijęs GPLK navikas fluorescuojamai švyti taip pat intensyviai, kaip ir jį supančios kraujagyslės visame gabalėlio plote.

Panašūs pakitimai rasti ir ant viščiuko embriono CAM prigijusiuose GP gabalėliuose. Pastarieji buvo apsupti kur kas smulkesnių kraujagyslių gausaus tinklo. Visi šiuo metodu tirti GP gabalėliai taip pat buvo aprūpinti

viščiuko embriono CAM krauju, lygiai kaip ir tą parą tirti GPLK ant CAM navikai. Be to, rasti ryškiai fluorescuojantys ir naujai susiformavę papilomos židiniai (4.3.3.3 b pav.)



 4.3.3.3 pav. Prigijusių GPLK ir GP navikų fluorescuojanti stereomikroskopija – 7 paros po implantacijos ant CAM
 GPLK naviko gabalėlis ant CAM (ilga rodyklė), stipininis ratelis (trumpos rodyklės) (a).
 GP naviko gabalėlis ant CAM (ilga rodyklė), naujai susiformavę fluorescuojantys GP židiniai ant CAM (trumpos rodyklės) (b)

### 4.3.4. Histomorfometrinis viščiuko embriono CAM įvertinimas po GPLK ir GP naviko gabalėlių implantacijos

Atlikus statistinę duomenų analizę, paaiškėjo, kad ant gyvybingų embrionų CAM GPLK naviko gabalėliai (N = 149) prigijo vidutiniškai 94 proc. dažnumu, kai PI (92,26–94,88 proc.) iš 100 proc. atvejų, o GP (N = 92) – 73 proc. dažnumu, kai PI (68,74–77, 76 proc.) iš 100 proc. atvejų. Šis skirtumas rastas statistiškai reikšmingas (p = 0,001), vadinasi, GPLK naviko gabalėliai ant viščiuko embriono CAM prigijo patikimai dažniau nei GP.

Įvertinome, kaip pasiskirstė skirtingų pacientų GPLK ir GP gabalėlių prigijimo dažnis ant viščiuko embriono CAM, ir jį pateikėme 4.3.4.1 ir 4.3.4.2 lentelėje.

**4.3.4.1 lentelė**. Skirtingų pacientų GPLK gabalėlių prigijimo dažnis ant CAM

GPLK	Proc.
1	100
2	100
3	100
4	83
5	73
6	100
7	100
8	88
9	70
10	100
11	100
12	100
Iš viso 149	94

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma.

4.3.4.2 lentelė. Skirtingų pacientų GP gabalėlių prigijimo dažnis ant CAM

GP	Proc.
1	60
2	62
3	10
4	80
5	67
6	100
7	100
8	100
9	83
10	0
11	24
12	98
13	100
Iš viso 92	72

GP – gerklų papiloma.

## 4.3.4.1. CAM pokyčiai po GP ir GPLK naviko gabalėlių implantacijos – devinta inkubacijos para

Devintą inkubacijos parą ant viščiuko embriono CAM prigijo 20 GPLK audinio gabalėlių ir 15 GP audinio gabalėlių, atitinkamai – 90 proc. ir 57 proc. visų ant CAM 7-ąją inkubacijos parą implantuotų GPLK ir GP audinio gabalėlių. Šiame viščiuko embrionų CAM vystymosi etape GPLK navikai statistiškai patikimai dažniau prigijo po implantacijos ant CAM nei GP gabalėliai (p = 0,001), o 4 proc. visų prigijusių GPLK ir GP audinio gabalėlių išplito į gretimas nuo pirminio naviko CAM sritis (4.3.4.1.1 lentelė).

**4.3.4.1.1 lentelė.** GPLK ir GP naviko gabalėlių prigijimas ant CAM 9-ąją inkubacijos parą

Požymis/Naviko rūšis	<b>GPKL (N = 20)</b>	<b>GP</b> (N = 15)
Prie CAM prigiję naviko gabalėliai (proc.) $p = 0,001$	90	57
Naujai susiformavę naviko židiniai ant CAM (proc.)	4	4

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. GP – gerklų papiloma.

CAM – chorioalantojinė membrana.

Palyginome viščiuko embriono CAM parametrus po implantuotu GP naviko gabalėliu devintą inkubacijos parą su kontroline grupe. Nustatėme, kad praėjus 2 paroms po GP implantacijos, eksperimentinė CAM sustorėjo vidutiniškai 403 proc., o CAM epitelis – 100 proc., palyginti su kontroline CAM ir jos epiteliu (p = 0,001). CAM kraujagyslių kiekis po prigijusiu GP gabalėliu padidėjo vidutiniškai 29 vienetais, o tai yra statistiškai patikimai daugiau nei kontrolinėje grupėje (p = 0,001) (4.3.4.1.2 lentelė).

**4.3.4.1.2 lentelė**. GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 9-ąją inkubacijos parą

GP	GP			l <b>inė</b> ė	Skirtumas			
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	β*
CAM storis, µm	142,3	133,4	28,2	9,1	103,8	403	0,001	0,043
Epitelio storis, µm	14,2	4,1	7,4	1,3	8,1	100	0,001	0,000
Kraujagyslių kiekis	39	38	6	3	28	457	0,001	0,05

\*Skaičiuota, kai  $\alpha = 0.05$ .

GP – gerklų papiloma. CAM – chorioalantojinė membrana.

Šiuo inkubacijos periodu prigiję GPLK naviko gabalėliai taip pat sukėlė statistiškai reikšmingą CAM ir jos epitelio sustorėjimą atitinkamai 203 ir 100 proc., palyginti su kontrolinės grupės CAM atitinkamais parametrais (p = 0,001). Po implantuotu GPLK gabalėliu rasta vidutiniškai 21 kraujagysle daugiau nei kontrolinėse CAM (p = 0,001) (4.3.4.1.3 lentelė).

GPL	К		Kontrol grup	l <b>inė</b> ė	Skirtumas			
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	ß*
CAM storis, µm	85,4	32,8	28,2	9,1	47,2	203	0,001	0,000
Epitelio storis, µm	14,2	3,1	7,4	1,3	7,7	100	0,001	0,000
Kraujagyslių kiekis	32	13	7	3	21	357	0,001	0,000

**4.3.4.1.3 lentelė**. GPLK naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 9-ąją inkubacijos parą

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GPLK - gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. CAM - chorioalantojinė membrana

Nustatėme, kad devintą inkubacijos parą – t. y. praėjus dviem paroms po GPLK implantacijos ant CAM, pastaroji vidutiniškai sustorėjo iki 85 ± 33 µm, o po GP naviko gabalėliu šiuo inkubacijos periodu rasta sustorėjusi iki 142 ± 133 µm, tačiau skirtumas nebuvo statistiškai patikimas (p = 0,076). Viščiuko embriono CAM epitelio sustorėjimas po implantais – atitinkamai iki 14 ± 3 µm po GPLK ir 14 ± 4 µm po GP (p = 0,615) bei kraujagyslių kiekis šiose grupėse (p = 0,168) taip pat reikšmingai nesiskyrė (4.3.4.1.4 lentelė).

**4.3.4.1.4 lentelė**. GPLK ir GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas 9-ąją inkubacijos parą

GPL	GPLK				Skirtumas			
Požymi	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *
CAM storis, µm	85,4	32,8	142,3	133,4	56,7	67	0,076	_
Epitelio storis, µm	14,2	3,1	14,2	4,1	0,4	0	0,615	-
Kraujagyslių kiekis	32	13	39	38	8	22	0,168	Ι

\*Skaičiuota, kai  $\alpha$ =0,05.

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. GP – gerklų papiloma.

CAM – chorioalantojinė membrana

## 4.3.4.2. CAM pokyčiai po GPLK ir GP naviko gabalėlių implantacijos – dešimta inkubacijos para

Dešimtą inkubacijos parą, t.y. praėjus trims paroms po GPLK ir GP naviko implantacijos ant viščiuko embriono CAM, prigijo 27 GPLK ir 16 GP gabalėlių, atitinkamai – 86 proc. ir 79 proc. visų implantuotų GPLK ir GP audinio fragmentų. Šią inkubacijos parą GPLK gabalėliai prigijo statistiškai patikimai dažniau nei GP gabalėliai (p = 0,001). Naujus GPLK ir GP židinius ant viščiuko embrionų CAM suformavo po 2 proc. šių navikų (4.3.4.2.1 lentelė).

**4.3.4.2.1 lentelė.** GPLK ir GP naviko gabalėlių prigijimas ant CAM 10-ąją inkubacijos parą

Požymis/Naviko rūšis	GPKL (N = 27)	GP (N = 16)
Prie CAM prigiję naviko gabalėliai proc. $p = 0,001$	86	79
Naujai susiformavę GP ar GPLK židiniai ant CAM proc.	2	2

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. GP – gerklų papiloma. CAM – chorioalantojinė membrana.

Po implantuotu GP gabalėliu dešimtą inkubacijos parą viščiuko embrionų CAM sustorėjo vidutiniškai 203 proc., o CAM epitelis – 100 proc., palyginti su kontroline grupe (p = 0,001). CAM mezenchimose po GP implantacijos rasta vidutiniškai 21 kraujagysle daugiau nei dešimtos paros kontrolinės grupės CAM (p = 0,001) (Lentelė 4.3.4.2.2).

**4.3.4.2.2 lentelė.***GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 10-ąją inkubacijos parą* 

GP	Kontrolind	Skirtumas						
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	β*
CAM storis, µm	112,2	71,6	37,1	11,4	80,8	203	0,001	0,000
Epitelio storis, µm	12,1	4,3	6,2	1,2	5,4	100	0,001	0,000
Kraujagyslių kiekis	28	12	6	2	21	367	0,001	0,000

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GP – gerklų papiloma. CAM – chorioalantojinė membrana.

Dešimtą inkubacijos parą po GPLK naviko gabalėliais rasta sustorėjusi viščiuko embrionų CAM net iki 478 proc., o jos epitelis vidutiniškai iki 250 proc., palyginti su kontrolinės grupės membranomis (p = 0,001). Kraujagyslių kiekis po implantuotu GPLK gabalėliu rastas 15 vienetų didesnis nei kontrolinėse CAM (p = 0,001) (4.3.5.2.3 lentelė).

GPL	K	Kontrolinė grupė Skirtumas						
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *
CAM storis, µm	213,8	124,1	37,1	11,4	182,6	478	0,001	0,000
Epitelio storis, µm	21,4	10,3	6,2	1,2	15,2	250	0,001	0,000
Kraujagyslių kiekis	28	15	6	2	15	367	0,001	0,000

**4.3.4.2.3 lentelė**. GPLK naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 10-ąją inkubacijos parą

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. CAM – chorioalantojinė membrana.

Šiuo embrionų inkubacijos periodu, praėjus trims paroms po GPLK implantacijos ant CAM, ši vidutiniškai sustorėjo iki  $214 \pm 124 \mu m$ , t. y. statistiškai patikimai daugiau nei po GP gabalėliu ( $112 \pm 71\mu m$ ) (p = 0,002). Viščiuko embriono CAM epitelis po GPLK naviko gabalėliais sustorėjo taip pat labiau ( $21 \pm 10 \mu m$ ) nei po GP navikais ( $12 \pm 4 \mu m$ ) (p = 0,001). Tačiau kraujagyslių skaičius šiose eksperimentinėse grupėse nesiskyrė (p = 0,244) (4.3.4.2.4 lentelė).

**4.3.4.2.4 lentelė**. GPLK ir GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas 10-ąją inkubacijos parą

GPL	Ж		GP		Skirtumas			
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *
CAM storis, µm	213,8	124,1	112,2	71,6	101,8	91	0,001	0,055
Epitelio storis, µm	21,4	10,3	12,1	4,3	9,8	75	0,001	0,004
Kraujagyslių kiekis	28	15	28	12	6	0	0,244	-

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. GP – gerklų papiloma.

CAM - chorioalantojinė membrana.

## 4.3.4.3. CAM pokyčiai po GPLK ir GP naviko gabalėlių implantacijos – vienuolikta inkubacijos para

Vienuoliktą inkubacijos parą ant viščiuko embriono CAM prigijo 93 proc. GPLK gabalėlių (N = 40). GPLK naviko gabalėliai prigijo statistiškai patikimai dažniau nei GP fragmentai (N = 29, 70 proc.) (p = 0,001). Šešios CAM su prigijusiais GP ir 24 su GPLK gabalėliais išpjautos antrą parą, 12 su GP ir 6 su GPLK gabalėliais trečią parą bei 11 su GP ir 10 su GPLK gabalėliais ketvirtą parą po implantacijos ant CAM. Vidutiniškai 2 proc. GPLK ir 2 proc. GP navikų ant viščiuko embriono CAM suformavo atokiuosius naviko darinius, iš kurių 29 proc. GPLK ir 14 proc. GP antrą parą, 14 proc. GPLK ir 29 proc. GP trečią parą ir 57 proc. GPLK ir 57 proc. GP ketvirtą parą po jų implantacijos ant CAM (4.3.4.3.1 lentelė).

Požymis/Naviko rūšis	GP	KL (N =	40)	G	$\mathbf{P}(\mathbf{N}=2$	9)
Prie CAM prigiję naviko gabalėliai proc. p = 0,001		93			70	
Prie CAM prigiję naviko gabalėliai 2, 3 ir 4-ąją parą po implantacijos ant	2 paros	3 paros	4 paros	2 paros	3 paros	4 paros
CAM	24	6	10	6	12	11
Naujai susiformavę GP ar GPLK dariniai ant CAM proc.		2			2	
Naujai susiformavę GP ar GPLK dariniai 2, 3 ir 4-ąją parą po	2 paros	3 paros	4 paros	2 paros	3 paros	4 paros
implantacijos ant CAM, proc.	29	14	57	14	29	57

**4.3.4.3.1 lentelė.** GPLK ir GP naviko gabalėlių prigijimas ant CAM 11-ąją inkubacijos parą

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. GP – gerklų papiloma.

CAM – chorioalantojinė membrana.

Eksperimentinės CAM po GP implantu vienuoliktą inkubacijos parą rastos vidutiniškai 154 proc. storesnės nei kontrolinės grupės membranos, o jų epiteliai – atitinkamai sustorėję 117 proc., palyginti su kontrolinėm CAM (p = 0,001). Kraujagyslių skaičius eksperimentinių CAM mezenchimose beveik 60 proc. viršijo kontrolinėse membranose nustatytąjį, šis skirtumas analizuojamose grupėse skyrėsi statistiškai reikšmingai (p = 0,047) (Lentelė 4.3.4.3.2).

		Kontrolinë	è grupė		Skirt	tumas					
Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	p	<b>β</b> *				
127,3	92,8	50,2	14,1	87,1	154	0,001	0,004				
13,1	6,4	5,8	1,2	6,9	117	0,001	0,000				
8	5	5	2	2	60	0,047	0,487				
	Vidurkis 127,3 13,1 8	Vidurkis         SN           127,3         92,8           13,1         6,4           8         5	Kontrolini           Vidurkis         SN         Vidurkis           127,3         92,8         50,2           13,1         6,4         5,8           8         5         5	Kontrolinė grupė           Vidurkis         SN         Vidurkis         SN           127,3         92,8         50,2         14,1           13,1         6,4         5,8         1,2           8         5         5         2	Kontrolinė grupė           Vidurkis         SN         Vidurkis         SN         μm, N           127,3         92,8         50,2         14,1         87,1           13,1         6,4         5,8         1,2         6,9           8         5         5         2         2	Kontrolinė grupė         Skirt           Vidurkis         SN         Vidurkis         SN         μm, N         Proc.           127,3         92,8         50,2         14,1         87,1         154           13,1         6,4         5,8         1,2         6,9         117           8         5         5         2         2         60	Kontrolinė grupė         Skirtumas           Vidurkis         SN         Vidurkis         SN $\mu$ m, N         Proc.         p           127,3         92,8         50,2         14,1         87,1         154         0,001           13,1         6,4         5,8         1,2         6,9         117         0,001           8         5         5         2         2         60         0,047				

**4.3.4.3.2 lentelė.** GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 11-ąją inkubacijos parą

GP – gerklų papiloma. CAM – chorioalantojinė membrana.

Po GPLK naviko gabalėliais šiuo inkubacijos periodu rasta sustorėjusi viščiuko embrionų CAM vidutiniškai iki 156 proc., o jos epitelis iki 117 proc., palyginti su kontroline grupe (p = 0,001). Kraujagyslių kiekis po prigijusiu GPLK naviku rastas vidutiniškai 8 vienetais didesnis nei kontrolinėse CAM (p = 0,001) (4.3.4.3.3 lentelė).

**4.3.4.3.3 lentelė.** GPLK naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 11-ąją inkubacijos parą

GPI	К		Kontrolinė g	grupė		Skir	tumas	
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *
CAM storis, µm	128,3	109,1	50,2	14,1	80,9	156	0,001	0,03
Epitelio storis, µm	12,9	6,4	5,8	1,2	6,3	117	0,001	0,000
Kraujagyslių kiekis	15	9	5	2	8	200	0,001	0,05

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GPLK - gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. CAM - chorioalantojinė membrana.

Vienuoliktą inkubacijos parą viščiuko embrionų CAM po GPLK implantais sustorėjo iki 128  $\pm$  109  $\mu$ m ir statistiškai nesiskyrė nuo CAM storio po GP gabalėliu (127  $\pm$  93  $\mu$ m) (p = 0,980). CAM epitelis po GPLK ir GP naviko gabalėliais sustorėjo, tačiau analizuojamose grupėse patikimai nesiskyrė (p = 0,836). Tačiau kraujagyslių kiekis šiose eksperimentinėse membranose buvo skirtingas, t. y. vidutiniškai 88 proc. didesnis GPLK grupėje (p = 0,001) (4.3.4.3.4 lentelė).

**4.3.4.3.4 lentelė.** GPLK ir GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas 11-ąją inkubacijos parą

GPL	GPLK				Skirtumas			
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	Р	β
CAM storis, µm	128,3	109,1	127,3	92,8	6,2	0,8	0,980	-
Epitelio storis, µm	12,9	6,4	13,1	6,4	0,6	0	0,836	_
Kraujagyslių kiekis	15	9	8	5	6	88	0,001	0,04*

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. GP – gerklų papiloma.

CAM - chorioalantojinė membrana.

Praėjus dviem paroms po GPLK ir GP audinio gabalėlių implantacijos ant CAM, prigijo visi implantuotieji naviko gabalėliai. Eksperimentinės CAM (p = 0,004) bei jų epitelis (p = 0,003) po GPLK implantais sustorėjo iki 122 ir 117 proc., o CAM mezenchimos kraujagyslių skaičius padidėjo net 200 proc. (p = 0,04), palyginti su kontrolinės grupės CAM (4.3.4.3.5 lentelė)

**4.3.4.3.5 lentelė.** GPLK naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 11-ąją inkubacijos parą, praėjus dviem paroms po implantacijos

GPLK	GPLK			ė grupė		Skir	tumas	
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	$\pmb{\beta}^*$
CAM storis, µm	111,4	110,1	50,2	14,1	54,4	122	0,004	0,063
Epitelio storis, µm	13,2	6,1	5,8	1,2	6,4	117	0,003	0,013
Kraujagyslių kiekis	15	10	5	2	7	200	0,04	0,046

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. CAM – chorioalantojinė membrana.

GP implantai tiriamuoju laikotarpiu sukėlė pačios CAM (p = 0,029) bei jos epitelio (p = 0,014) sustorėjimą iki 226 ir 167 proc., palyginti su kontrolinių CAM atitinkamais parametrais. Kraujagyslių kiekis po GP gabalėliais antrą parą po implantavimo ant CAM rastas didesnis nei kontrolinių membranų mezenchimose, tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas (p = 0,122) (4.3.4.3.6 lentelė).

**4.3.4.3.6 lentelė.** GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 11-ąją inkubacijos parą, praėjus dviem paroms po implantacijos

GP			Kontrolinė g	grupė		Ski	rtumas	
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	β*
CAM storis, µm	163,3	134,1	50,2	14,1	190,7	226	0,029	0,075
Epitelio storis, µm	15,8	10,0	5,8	1,2	16,6	167	0,014	0,002
Kraujagyslių kiekis	10	6	5	2	3	100	0,122	—

GP - gerklų papiloma. CAM - chorioalantojinė membrana.

Lyginant šiuos pokyčius GPLK ir GP grupėse, nustatyta, kad šių navikų gabalėliai vienodai dažnai prigijo po implantavimo ant CAM (p = 0,64), be to, tiriamose grupėse nei pačios CAM (p = 0,214), nei kraujagyslių kiekis CAM mezenchimoje (p = 0,261) statistiškai patikimai nesiskyrė. Tačiau pastebėta, jog reikšmingai skyrėsi CAM epitelio storio vidurkis, jis GP grupėje rastas didesnis (p = 0,002). Pokyčiai pateikti 4.3.4.3.7 lentelė.

**4.3.4.3.7 lentelė.** GPLK ir GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas 11-ąją inkubacijos parą, praėjus dviem paroms po implantacijos

GPL	K		GP			Skirt	tumas	
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *
CAM storis, µm	111,4	110,1	163,3	134,1	96,4	21	0,214	-
Epitelio storis, µm	13,2	6,1	15,8	10,0	10,2	23	0,002	0,12
Kraujagyslių kiekis	15	10	10	6	4	50	0,261	_

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. GP – gerklų papiloma.

CAM - chorioalantojinė membrana.

Praėjus trims paroms po GPLK audinio implantacijos ant CAM, prigijo 90 proc. visų implantuotų naviko gabalėlių. Jie sukėlė statistiškai patikimą CAM (p = 0,001) ir jos epitelio (p = 0,002) sustorėjimą bei reikšmingai padidino kraujagyslių kiekį (p = 0,001), palyginti su kontroline grupe (4.3.4.3.8 lentelė).

**4.3.4.3.8 lentelė.** GPLK naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 11-ąją inkubacijos parą, praėjus trims paroms po implantacijos

GPLK			Kontrolinė g	Skirtumas           μm, N         Proc.         p           62,9         102         0,001				
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	$\pmb{\beta}^*$
CAM storis, µm	101,2	46,4	50,2	14,1	62,9	102	0,001	0,04
Epitelio storis, µm	14,1	4,9	5,8	1,2	6,9	133	0,002	0,057
Kraujagyslių kiekis	6	1	5	2	8	20	0,001	0,04

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. CAM – chorioalantojinė membrana.

GP audinio gabalėliai 3-iąją parą po implantacijos prigijo 87 proc. dažnumu ir sukėlė statistiškai patikimą pačios CAM (p = 0,001) ir jos epitelio (p = 0,001) sustorėjimą bei reikšmingai padidino kraujagyslių kiekį, palyginti su kontrolinėmis membranomis. Šie pokyčiai aprašyti 4.3.4.3.9 lentelėje.

**4.3.4.3.9 lentelė.** GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 11-ąją inkubacijos parą, praėjus trims paroms po implantacijos

		Kontrolin	ė grupė		Skir	Skirtumas		
Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	$\pmb{\beta}^*$	
149,1	112,7	50,2	14,1	110,7	198	0,001	0,205	
14, 2	6,1	5,8	1,2	7,0	133	0,001	0,06	
9	5	5	2	3	80	0,012	0,61	
	Vidurkis 149,1 14, 2 9	Vidurkis         SN           149,1         112,7           14, 2         6,1           9         5	Kontroline           Vidurkis         SN           149,1         112,7           14,2         6,1           9         5	Kontrolinė grupė           Vidurkis         SN         Vidurkis           149,1         112,7         50,2         14,1           14,2         6,1         5,8         1,2           9         5         5         2	Kontrolinė grupė           Vidurkis         SN         Vidurkis         pm, N           149,1         112,7         50,2         14,1         110,7           14,2         6,1         5,8         1,2         7,0           9         5         5         2         3	Kontroline grupé         Skin           Vidurkis         SN         Vidurkis         SN         µm, N         Proc.           149,1         112,7         50,2         14,1         110,7         198           14,2         6,1         5,8         1,2         7,0         133           9         5         5         2         3         80	Kontroline grupė         Skirtumas           Vidurkis         SN         Vidurkis         SN         µm, N         Proc.         p           149,1         112,7         50,2         14,1         110,7         198         0,001           14,2         6,1         5,8         1,2         7,0         133         0,001           9         5         5         2         3         80         0,012	

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GP – gerklų papiloma. CAM – chorioalantojinė membrana.

Pokyčius palyginus GPLK ir GP grupėse, nei pačios CAM (p = 0,989), nei jos epitelio (p = 0,214) storis, nei kraujagyslių kiekis CAM mezenchimose (p = 0,06) statistiškai reikšmingai nesiskyrė (4.3.4.3.10 lentelė).

Įvertinome 4 paras ant viščiuko embriono CAM augusių GPLK gabalėlių poveikį eksperimentinėms CAM. Nustatėme, kad 80 proc. visų implantuotų ant CAM naviko gabalėlių prigijo ir sukėlė reikšmingą jos (p = 0,001) bei chorioninio epitelio (p = 0,001) sustorėjimą. Nustatytas ir statistiškai patikimas CAM kraujagyslių kiekio padidėjimas GPLK grupėje, palyginti su kontrolinės grupės CAM (p = 0,003). Pokyčiai apžvelgti 4.3.4.3.11 lentelėje.

**4.3.4.3.10 lentelė.** GPLK ir GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas 11-ąją inkubacijos parą, praėjus trims paroms po implantacijos

GPL	K		GI			Skir	Skirtumas			
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	β*		
CAM storis, µm	101,2	46,4	149,1	112,7	47,7	48	0,989	_		
Epitelio storis, µm	14,1	4,9	14, 2	6,1	0,03	0	0,214	_		
Kraujagyslių kiekis	6	1	9	5	5	50	0,06	0,52		

 $GPLK-gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. \ GP-gerklų papiloma.$ 

CAM - chorioalantojinė membrana.

**4.3.4.3.11 lentelė.** GPLK naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 11-ąją inkubacijos parą, praėjus keturioms paroms po implantacijos

GPLK	K.		Kontrolin	ė grupė		Skirtumas			
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *	
CAM storis, µm	174,4	120,1	50,2	14,1	134,3	248	0,001	0,12	
Epitelio storis, µm	12,0	4,3	5,8	1,2	6,3	50	0,001	0,056	
Kraujagyslių kiekis	6	1	5	2	8	20	0,003	0,1	

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. CAM – chorioalantojinė membrana.

GP audinio gabalėliai, praėjus 4 paroms po implantacijos ant CAM, taip pat sukėlė reikšmingą pačios CAM (p = 0,02) bei jos epitelio storėjimą, palyginti su kontroline grupe (p = 0,001). Kraujagyslių vidutiniškai padaugėjo iki 60 proc., palyginti su kontrolinėmis CAM (p = 0,015) (4.3.4.3.12 lentelė).

**4.3.4.3.12 lentelė.** GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 11-ąją inkubacijos parą, praėjus keturioms paroms po implantacijos

GP			Kontrolin	ė grupė		Skirt	tumas	
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *
CAM storis, µm	108,1	61,0	50,2	14,1	67,9	116	0,02	0,106
Epitelio storis, µm	16,4	9,8	5,8	1,2	6,0	167	0,001	0,037
Kraujagyslių kiekis	8	4	5	2	2	60	0,015	0,81

\*Skaičiuota, kai α=0,05. GP – gerklų papiloma. CAM – chorioalantojinė membrana.

Ketvirtą parą po GPLK ir GP implantacijos GPLK audinio gabalėliai ant viščiuko embriono CAM prigijo statistiškai patikimai dažniau nei GP navikai (p = 0,001). Po prigijusiais GPLK navikais CAM sustorėjo patikimai daugiau (p = 0.029), o kraujagyslių rasta statistiškai reikšmingai daugiau nei GP grupėje (p = 0,001). Tačiau CAM epitelio storis abiejose tiriamosiose grupėse nesiskyrė, kaip tai parodyta 4.3.4.3.13 lentelėje.

**4.3.4.3.13 lentelė.** GPLK ir GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas 11-ąją inkubacijos parą, praėjus keturioms paroms po implantacijos

GP	GPLK			GP			Skirtumas		
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	$\pmb{\beta}^*$	
CAM storis, µm	174,4	120,1	108,1	61,0	66,3	61	0,029	0,2	
Epitelio storis, µm	12,0	4,3	16,4	9,8	0,3	33	0,798	-	
Kraujagyslių kiekis	6	1	8	4	7	33	0,001	0,074	

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. GP – gerklų papiloma.

CAM – chorioalantojinė membrana.

# 4.3.4.4. CAM pokyčiai po GPLK ir GP naviko gabalėlių implantacijos – dvylikta inkubacijos para

Dvyliktą embrionų inkubacijos parą išpjovus eksperimentines CAM, rasta 100 proc. prigijusių GPLK (N = 40) ir 89 proc. GP (N = 29) audinio gabalėlių. GPLK navikai šiuo inkubacijos periodu prigijo statistiškai patikimai dažniau nei GP gabalėliai (p = 0,001). Iš trečią inkubacijos parą pjautų membranų prigijusiais laikyti 32 GPLK ir 10 GP audinio gabalėlių, ketvirtą parą – 8 GPLK ir 19 GP gabalėlių. Šiose CAM GPLK navikai suformavo naujus naviko židinius 3 proc., o GP – 6 proc. atvejų. Šie duomenys pateikti 4.3.4.4.1 lentelėje.

Įvertinus eksperimentinių CAM storį, nustatyta, jog GPLK grupėje jos sustorėjo net iki 523 proc. (p = 0,001), o CAM epitelis iki 167 proc. (p = 0,001), palyginti su kontrolinėmis CAM. Ant viščiuko embriono CAM prigiję GPLK navikai sukėlė statistiškai reikšmingą CAM mezodermos angiogenezę, joje nustatyta 88 proc. daugiau kraujagyslių nei kontrolinėse CAM (p = 0,001). GPLK implantų poveikis CAM struktūroms matomas 4.3.4.4.2 lentelėje.

**4.3.4.4.1 lentelė.** GPLK ir GP naviko gabalėlių prigijimas ant CAM 12-ąją inkubacijos parą

Požymis/Naviko rūšis	GPKL (	N = 40)	GP (N	= 29)
Prie CAM prigiję naviko gabalėliai proc., $p = 0,001$	10	00	89	)
Prie CAM prigiję naviko gabalėliai 2, 3 ir	3	4	3	4
4-ąją parą po implantacijos ant CAM	paros	paros	paros	paros
	32	8	10	19
Naujai susiformavę GP ar GPLK židiniai ant CAM, proc.	(*)	3	6	
Naujai susiformavę GP ar GPLK židiniai	3	4	3	4
2, 3 ir 4-ąją parą po implantacijos ant CAM,	paros	paros	paros	paros
proc.	0	100	50	50

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. GP – gerklų papiloma.

 $CAM-chorioalantojin {\dot e}\ membrana.$ 

**4.3.4.4.2 lentelė.** GPLK naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 12-ąją inkubacijos parą

GPLK	X		Kontrolin	Skirtumas				
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *
CAM storis, µm	161,6	156,0	26,1	14,2	127,8	523	0,001	0,01
Epitelio storis, µm	16,0	11,2	6,3	2,0	9,3	167	0,001	0,006
Kraujagyslių kiekis	15	2	8	3	16	88	0,001	0,000

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. CAM – chorioalantojinė membrana.

Implantuoti GP audinio gabalėliai taip pat sukėlė statistiškai patikimą pačios CAM (p = 0,001), jos epitelio (p = 0,001) storėjimą bei padidino kraujagyslių kiekį (p = 0,001) lyginant su kontrolinių CAM atitinkamais parametrais (p = 0,001), kurie apžvelgti 4.3.4.4.3 lentelėje.

**4.3.4.4.3 lentelė.** GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 12-ąją inkubacijos parą

GI	2		Kontrolin		Skirtumas			
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *
CAM storis, µm	82,3	39,0	26,1	14,2	47,5	215	0,001	0,000
Epitelio storis, µm	38,1	25,8	6,3	2,0	5,9	533	0,001	0,000
Kraujagyslių kiekis	23	10	8	3	18	188	0,001	0,000

\*Skaičiuota, kai α=0,05. GP – gerklų papiloma. CAM – chorioalantojinė membrana.

Eksperimentinės CAM po GPLK naviko implantais sustorėjo statistiškai reikšmingai daugiau nei po prigijusiais GP audinio gabalėliais (p = 0,012). CAM epitelio sustorėjimas (p = 0,132), kaip ir padidėjęs kraujagyslių kiekis šių grupių membranose (p = 0,593), statistiškai patikimai nesiskyrė. Šie pokyčiai pateikti 4.3.4.4.4 lentelėje.

**4.3.4.4 lentelė.** GPLK ir GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas 12-ąją inkubacijos parą

GPL	Ж		Gl	P	Skirtumas			
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	$\pmb{\beta}^*$
CAM storis, µm	161,6	156,0	82,3	39,0	80,3	98	0,012	0,286
Epitelio storis, µm	16,0	11,2	38,1	25,8	3,3	136	0,132	-
Kraujagyslių kiekis	15	2	23	10	2	53	0,593	-

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. GP – gerklų papiloma.

CAM - chorioalantojinė membrana.

Po trijų GPLK naviko augimo ant CAM parų pastaroji sustorėjo iki 377 proc. (p = 0,005), o jos epitelis iki 117 proc. (p = 0,005), palyginti su kontrolinėmis CAM. GPLK implantai statistiškai reikšmingai padidino CAM mezodermos kraujagyslių kiekį, palyginti su kontroline grupe (p = 0,001), kaip pateikta 4.3.4.4.5 lentelėje.

**4.3.4.5 lentelė.** GPLK naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 12-ąją inkubacijos parą, praėjus trims paroms po implantacijos

GP			Kontrolin	ė grupė	Skirtumas			
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *
CAM storis, µm	124,1	123,0	26,1	14,2	101,6	377	0,005	0,17
Epitelio storis, µm	13,4	7,0	6,3	2,0	6,4	117	0,005	0,15
Kraujagyslių kiekis	19	10	8	3	14	136	0,001	0,002

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GP – gerklų papiloma. CAM – chorioalantojinė membrana.

Atitinkamai trečią parą po GP gabalėlių implantacijos ant CAM statistiškai patikimai sustorėjo pati CAM (p = 0,01) ir jos epitelis (p = 0,005), be to, reikšmingai padaugėjo kraujagyslių CAM mezenchimose (p = 0,001), kaip tai atsispindi 4.3.4.4.6 lentelėje.

**4.3.4.6 lentelė.** GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 12-ąją inkubacijos parą, praėjus trims paroms po implantacijos

GP			Kontrolin		Skirt	tumas		
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	β*
CAM storis, µm	63,4	23,8	26,1	14,2	39,7	142	0,01	0,000
Epitelio storis, µm	10,1	2,4	6,3	2,0	3,0	67	0,005	0,007
Kraujagyslių kiekis	23	7	8	3	18	186	0,001	0,000

GP - gerklų papiloma. CAM - chorioalantojinė membrana.

Palyginome eksperimentinių CAM parametrus GPLK ir GP grupėse trečią parą po šių navikų implantacijos ir pastebėjome, kad abiejų naviko implantų veikiama, tiek pati CAM (p = 0,327), tiek jos epitelis (p = 0,271) storėjo, tačiau tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė. Šie navikai per tris augimo paras ant CAM indukavo didesnį kraujagyslių kiekį, kuris GPLK ir GP grupėse statistiškai patikimai nesiskyrė (p = 0,504) (4.3.4.4.7 lentelė).

**4.3.4.7 lentelė.** GPLK ir GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas 12-ąją inkubacijos parą, praėjus trims paroms po implantacijos

GPLK	X		GP	GP Skirtumas				
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *
CAM storis, µm	124,1	123,0	63,4	23,8	61,8	97	0,327	_
Epitelio storis, µm	13,4	7,0	10,1	2,4	3,3	30	0,271	-
Kraujagyslių kiekis	19	10	23	7	4	21	0,504	-

\*Skaičiuota, kai  $\alpha$ =0,05.

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. GP – gerklų papiloma.

CAM - chorioalantojine membrana.

Praėjus keturioms paroms po GPLK ir GP naviko gabalėlių implantacijos ant CAM, GPLK naviko gabalėliai rasti prigiję 100 proc., o GP – 66 proc. dažnumu. GPLK navikai šiuo inkubacijos periodu taip pat prigijo statistiškai patikimai dažniau nei GP gabalėliai (p = 0,001). Be to, GPLK gabalėliai sukėlė pačios CAM (p = 0,001) ir jos epitelio statistiškai patikimą sustorėjimą (p = 0,007) bei reikšmingai padidino kraujagyslių kiekį (p = 0,002), palyginti su kontrolinės grupės membranomis. Pokyčiai pateikti 4.3.4.4.8 lentelėje.

**4.3.4.4.8 lentelė.** GPLK naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 12-ąją inkubacijos parą, praėjus keturioms paroms po implantacijos

GPLK	GPLK			Kontrolinė grupė			Skirtumas		
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *	
CAM storis, µm	151,0	72,1	26,1	14,2	106,8	481	0,001	0,000	
Epitelio storis, µm	19,4	12,3	6,3	2,0	13,1	217	0,007	0,015	
Kraujagyslių kiekis	36	19	8	3	31	350	0,002	0,03	

\*Skaičiuota, kai  $\alpha$ =0,05.

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. CAM – chorioalantojinė membrana.

GP per keturias augimo ant CAM paras sukėlė statistiškai reikšmingą pačios CAM (p = 0,001) ir jos epitelio (p = 0,001) sustorėjimą, palyginti su kontroline grupe. Kraujagyslių kiekis šiose grupėse taip pat skyrėsi statistiškai patikimai, ekperimentinėse membranose kraujagyslių kiekiui vyraujant (p = 0,001) (4.3.4.4.9 lentelė).

**4.3.4.4.9 lentelė.** GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su kontrolinės grupės CAM 12-ąją inkubacijos parą, praėjus keturioms paroms po implantacijos

GP			Kontrolinė	Skirtumas				
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	β*
CAM storis, µm	92,4	30,0	26,1	14,2	48,3	254	0,001	0,000
Epitelio storis, µm	14,0	3,8	6,3	2,0	8,1	133	0,001	0,000
Kraujagyslių kiekis	25	13	8	3	20	213	0,001	0,000

\*Skaičiuota, kai α=0,05.

GP – gerklų papiloma. CAM – chorioalantojinė membrana.

Nors GPLK per keturias augimo dienas ant viščiuko embriono CAM prigijo kur kas dažniau nei GP naviko gabalėliai, tačiau nei chorioninio epitelio storis (p = 0,233), nei kraujagyslių kiekis šių grupių membranose statistiškai patikimai nesiskyrė (p = 0,397). Nustatyta, kad šiose grupėse skyrėsi tik CAM storis, t. y. GPLK grupėje jis buvo rastas statistiškai reikšmingai storesnis nei membranose po GP naviko gabalėliais (p = 0,035) (4.3.4.4.10 lentelė).

**4.3.4.10 lentelė.** GPLK ir GP naviko gabalėlių poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas 12-ąją inkubacijos parą, praėjus keturioms paroms po implantacijos

GP	LK		GI			Skirtumas		
Požymis	Vidurkis	SN	Vidurkis	SN	μm, N	Proc.	р	<b>β</b> *
CAM storis, µm	151,0	72,1	92,4	30,0	58,8	64	0,035	0,388
Epitelio storis, µm	19,4	12,3	14,0	3,8	5,0	36	0,233	-
Kraujagyslių kiekis	36	19	25	13	12	44	0,397	_

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. GP – gerklų papiloma.

CAM – chorioalantojinė membrana.

### 4.4. Prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių ir jų poveikio CAM imunohistocheminis įvertinimas

# 4.4.1. Imunohistocheminė reakcija į DMM CK ant CAM prigijusiuose GPLK ir GP naviko gabalėliuose

Eksperimento metu nustatyta, kad ant CAM prigiję bei kontroliniai GPLK (4.4.1.1 a pav.) ir GP (4.4.1.1 d pav.) naviko gabalėliai turėjo teigiamą DMM CK raišką. Kadangi DMM CK dažo tik epitelinės kilmės ląsteles, teigiama implantuotų naviko gabalėlių raiška buvo vertinta kaip patvirtinimas, kad ant viščiuko CAM prigiję ir toliau augantys navikai yra tokios pat kilmės kaip ir implantuotieji gabalėliai. Be to, naujai ant CAM susiformavę GPLK (4.4.1.1 b pav.) ir GP (4.4.1.1 e pav.) naviko dariniai bei viščiuko embriono CAM peraugę GPLK navikai (4.4.1.1 c pav.) taip pat dažėsi DMM CK.



**4.4.1.1 pav.** DMM CK raiška GPLK ir GP audinio gabalėliuose Teigiama DMM CK raiška ant CAM prigijusiame GPLK gabalėlyje (a), naujai susiformavusiame židinyje ant CAM (b) bei CAM peraugusiame GPLK navike (c). Teigiama DMM CK raiška ant CAM prigijusiame GP audinio gabalėlyje (d) ir naujai susiformavusiuose GP židiniuose ant CAM (e)

#### 4.4.2. Imunohistocheminė reakcija į Ki 67 bei PLBA antikūnus ant CAM prigijusiuose GPLK ir GP naviko gabalėliuose

Prigiję GPLK naviko gabalėliai (4.4.2.1 a, b pav.), naujai susiformavusios satelitinės GPLK metastazės bei infiltratyviai CAM atžvilgiu augantys GPLK teigiamai reagavo į Ki-67 ir PLBA (4.4.2.1 c pav.) reagentus nuo ketvirtos naviko augimo ant CAM paros.

Ant CAM prigijusiuose GP naviko gabalėliuose (4.4.2.1 d, e pav.) bei naujai susiformavusiuose papilomos židiniuose nuo trečios paros po GP implantavimo taip pat nustatyta teigiama imunohistocheminė reakcija į Ki-67 bei PLBA (4.4.2.1 f pav.) reagentus.

Tose prigijusių GPLK ir GP gabalėlių vietose, kur buvo teigiama Ki 67 reagento raiška, ten pat rasti ir PLBA besidažantys ląstelių branduoliai (4.5.2.1 c pav. ir 4.5.2.2 f pav.).

Šiais reagentais buvo nudažyti ir kontroliniai GPLK ir GP gabalėliai. Ki 67 ir PLBA raiška minėtuose naviko gabalėliuose tai pat buvo vertinta kaip teigiama.



**4.4.2.1 pav.** Prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių raiška į Ki 67 ir PLBA antikūną

Ki-67 raiška prigijusiame GPLK naviko gabalėlyje 10× (a) ir 40× (b), PLBA raiška GPLK gabalėlyje bei infiltratyvus jo augimas CAM atžvilgiu. Ki 67 raiška prigijusiame GP naviko gabalėlyje 10× (c) ir 40× (d) bei PLBA raiška GP gabalėlyje.

#### 4.4.3. Imunohistocheminė eksperimentinių CAM reakcija į anti MMP 9 antikūną

Tiesiai po implantuotu GPLK (4.4.3.1 a pav.) ir GP (4.4.3.1 b pav.) naviko gabalėliu, viščiuko embriono CAM mezenchimoje stebėta teigiama anti MMP 9 raiška. Anti MMP 9 reagentu dažėsi tos CAM ląstelės, kurios H&E dažytuose CAM pjūviuose buvo vertintos kaip heterofilai. Šių ląstelių sankaupos, taip pat ir teigiama anti MMP 9 antikūno raiška stebėta aplink CAM mezenchimos kraujagysles centriniuose ir gretimuose CAM regėjimo laukuose.



**4.4.3.1 pav.** Anti MMP 9 raška viščiuko embriono CAM po GPLK (a) ir GP (b) implantu

CAM mezenchimoje, tiesiai po GPLK metastazėmis ir naujai susiformavusiais GP židinukais bei aplink CAM mezenchimą infiltravusius GPLK navikus taip pat rastos sankaupomis išsidėsčiusios, viščiuko heterofilus primenančios ląstelės, pasižyminčios teigiama anti MMP 9 raiška.

# 4.4.4. Histocheminė *Sambukus nigra* lektino raiška GPLK ir GP naviko gabalėliuose bei CAM

Kontrolinėse viščiuko embriono CAM *Sambukus nigra* lektino raiška rasta CAM endotelio ląstelėse, o ryškiausiai dažėsi CAM kraujagyslių sienelės (4.4.4.1 pav.).



4.4.4.1 pav. Lektino raiška kontrolinės grupės viščiuko embriono CAM

Ištyrus 1 parą ant CAM augusių GPLK ir GP naviko gabalėlių reakciją į lektiną, jo teigiama raiška stebėta tik CAM kraujagyslių endotelio ląstelėse, tačiau nuo trečios GPLK ir GP augimo ant CAM paros teigiama *Sambukus nigra* lektino raiška nustatyta eksperimentinių CAM kraujagyslių endotelio ląstelėse bei prie CAM prigijusių GPLK (4.4.4.2 a pav.) ir GP (4.4.4.2 c pav.) naviko gabalėlių audinyje, juose aptikta ir į viščiuko eritrocitus panašių ląstelių, kurios buvo stebimos ir H&E dažytuose preparatuose.



**4.4.4.2 pav.** Lektino raiška ant CAM prigijusiuose GPLK ir GP audinio gabalėliuose

Sambukus nigra lektino raiška prigijusiame GPLK gabalėlyje matosi lektinu nusidažiusios embriono kraujagyslės GPLK gabalėlio audinyje (a). Teigiama lektino raiška infiltratyviai CAM atžvilgiu augančiame GPLK gabalėlyje (b). Teigiama lektino raiška ir viščiuko eritrocitai prigijusiame GP audinio gabalėlyje (c)

71

Tuose GPLK naviko gabalėlių audiniuose, kurie prasiskverbė į viščiuko embriono CAM bei ją infiltravo, taip pat nustatyta teigiama reakcija į *Sambukus nigra* lektino antikūną (4.4.4.2 b pav.).

#### 4.5. GPLK ir GP augimo pobūdžio žmogaus organizme ir viščiuko embriono CAM palyginimas

### 4.5.1. GPLK ir GP audinio gabalėlių prigijimo ant viščiuko embriono CAM ryšys su klinikiniais paciento, iš kurio šie audiniai paimti, duomenimis

Eksperimento metu GPLK navikai ant viščiuko embriono CAM prigijo vidutiniškai 94 proc. dažnumu (PI 92,26–94,88 proc.), o GP – vidutiniškai 73 proc. dažnumu (PI 68,74–77, 76 proc.) iš 100 proc. GPLK audiniai prigijo statistiškai patikimai dažniau nei GP gabalėliai (p = 0,001).

Nustatyta, kad GPLK audinio prigijimo dažnumas nebuvo susijęs su paciento naviko išplitimo lygiu T (pagal TNM klasifikaciją). T1 navikai ant viščiuko embriono CAM prigijo 99,4 proc. atvejais, t. y. dažniau nei T4 navikai (95 proc.), bet šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas (p = 0,845). T2 navikai prigijo rečiau nei T4 ir T1 (p = 0,001), tačiau šie skirtumai neturi praktinės reikšmės ieškant sąsajų su klinikine GPLK eiga. O tie GPLK navikai, kurių ląstelės buvo mažai diferencijuotos ant CAM prigijo dažniau nei vidutiniškai ar gerai diferencijuoti GPLK navikai, atitinkamai: G1 diferenciacijos laipsnį atitikę GPLK audinio gabalėliai ant viščiuko embriono CAM prigijo rečiau nei G2 ar G3 (p = 0,001). Blogos diferenciacijos GPLK audinio gabalėliai (G3), prigijo dažniau nei vidutinės diferenciacijos (G2) gabalėliai, tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas (p = 0,798) (4.5.1.1 lentelė).
**4.5.1.1 lentelė.** GPLK išplitimo lygio bei diferenciacijos laipsnio žmogaus organizme įtaka GPLK gabalėlių prigijimui ant viščiuko embriono CAM

GPLK išplitimo lygis T	GPLK gabalėlių prigijimo dažnumas proc.	р	GPLK diferenciacijos laipsnis G	GPLK gabalėlių prigijimo dažnumas proc.	р
T1/T2	99/85	0,001	G1/G2	73/97	0,001
T1/T4	99/95	0,845	G1/G3	73/98	0,001
Т3	_	_	G2/G3	97/98	0,798
T2/T4	95/85	0,001	G4	_	_

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. G – naviko diferenciacijos laipsnis. T – naviko išplitimo lygis.

Palyginome GPLK audinio gebėjimą suformuoti naujus židinius ant viščiuko embriono CAM ir jo metastazines savybes žmogaus, iš kurio GPLK audinio gabalėlis paimtas, organizme. Nustatėme, jog tos GPLK, kurios po gerklų dalies ar visų gerklų šalinimo operacijos paciento organizme metastazavo į atokiąsias nuo gerklų sritis, patikimai dažniau plito ir ant viščiuko embriono CAM. Ši tendencija statistiškai reikšmingai pasireiškė ketvirtą parą po GPLK audinio implantacijos ant CAM (p = 0,002) (4.5.1.2 lentelė).

**4.5.1.2 lentelė.** GPLK poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su klinikine GPLK eiga paciento – "donoro" – organizme

Paros po GPLK implantacijos	Atvejų skaičius	Vidutinis GPLK išplitimo ant CAM dažnumas	Vidutinis GPLK išplitimo žmogaus organizme dažnumas po naviko šalinimo operacijos	р
2	30	0,25	0,75	0,398
3	50	0,44	0,56	0,889
4	40	0,47	0,27	0,002

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma. CAM – chorioalantojinė membrana.

Tyrimo metu nustatyta, kad GP gabalėlių prigijimo dažnumas ant viščiuko embriono CAM statistiškai reikšmingai buvo susijęs su GP recidyvų dažnumu iki endolaringinės GP operacijos. Apskaičiuota, jog kuo dažnesni buvo GP recidyvai paciento anamnezėje, tuo didesnis šių gabalėlių prigijimo ant CAM procentas (r = 0.43, p = 0,001). Tačiau, didesnė GP

išplitimo apimtis, vertinant pagal Derkay/Coltrera indeksą, nebuvo susijusi su GP audinio gabalėlių geresniu prigijimu ant CAM (p = 0.49).

Tie GP audinio gabalėliai, kurie "išsisėjo" ant viščiuko embriono CAM paviršiaus, buvo paimti iš pacientų, kuriems iki endolaringinės GP šalinimo operacijos GP recidyvavo vidutiniškai 5,45 kartus. Tai yra vidutiniškai 2,1 epizodu daugiau nei tų GP gabalėlių, kurie po implantacijos ant CAM prigijo, bet nesuformavo naujų židinių (p = 0,001). Šie skirtumai pradėjo ryškėti jau nuo trečios paros po GP implantacijos (p = 0,001), išliko praėjus ir keturioms paroms po implantacijos (p = 0,001) (4.5.1.3 lentelė).

Paros po GP implantacijos	Atvejų skaičius	Vidutinis naujų GP židinių susiformavimo dažnumas ant CAM	Vidutinis GP recidyvų dažnumas iki endolaringinės GP operacijos	р
2	24	0,6	3,6	0,188
3	40	0,7	4,7	0,001
4	16	0,58	5,08	0,001

**4.5.1.3 lentelė.** GP poveikio viščiuko embriono CAM palyginimas su klinikine GPLK eiga paciento – "donoro" – organizme

GP – gerklų papiloma. CAM – chorioalantojinė membrana.

## 4.5.2. Viščiuko embriono CAM kraujotakos pokyčiai po GPLK ir GP audinio gabalėlių implantacijos bei sąsajos su klinikiniais paciento požymiais

Tiek po GPLK, tiek po GP audinio gabalėlių implantacijos ant viščiuko embriono CAM buvo stebėtas statistiškai patikimai padidėjęs kraujagyslių skaičius eksperimentinių CAM mezenchimose, palyginti su kontrolinės grupės mezenchimomis (p = 0.001).

Nustatėme, kad CAM kraujagyslių kiekis neturėjo įtakos GPLK audinio gabalėlių prigijimo dažnumui ant eksperimentinės membranos (p = 0,3). Be to, neradome statistiškai patikimo CAM kraujagyslių skaičiaus skirtumo po T1, T2 ar T3 naviko išplitimo lygio, implantavus GPLK gabalėlius (p = 0,708). Tačiau rastas statistiškai patikimas CAM kraujagyslių kiekio skirtumas implantavus skirtingo diferenciacijos laipsnio GPLK, atitinkamai: blogos diferenciacijos GPLK audinio gabalėliai, palyginti su vidutiniškai ar gerai diferencijuotais GPLK implantais, reikšmingai padidino CAM kraujagyslių kiekį (p = 0.001). Nustatyta, jog implantavus G3 diferenciacijos laipsnio GPLK audinio gabalėlius ant viščiuko embriono CAM, joje rasta

vidutiniškai 13 kraujagyslių daugiau, nei implantavus G2 naviką (p = 0,001) ir 9,3 kraujagyslėmis daugiau nei G1 naviką (p = 0,003) (4.5.2.1 lentelė). Be to, tose eksperimentinėse membranose, kur statistiškai reikšmingiau daugėjo kraujagyslių, patikimai dažniau susiformavo ir atokiosios GPLK metastazės ant CAM (p = 0,003).

**4.5.2.1 lentelė**. Vidutinis CAM kraujagyslių kiekio skirtumas implantavus G1, G2 ir G3 diferenciacijos laipsnio GPLK navikus

GPLK naviko diferenciacijos laipsnis G	Vidutinis CAM kraujagyslių kiekio skirtumas	р
G3/G1	9,3	0,003
G3/ G2	13	0,001

GPLK – gerklų plokščiųjų ląstelių karcinoma.

Nustatėme, jog CAM kraujagyslių kiekis neturėjo įtakos GP audinio gabalėliams prigyjant ant CAM (p = 0.3). Be to, nenustatytos ir reikšmingos koreliacijos tarp kraujagyslių skaičiaus eksperimentinėse CAM ir GP Derkay/Coltrera indekso dydžio (r = 0.03, p = 0.76) bei tarp CAM kraujagyslių kiekio ir naujų GP židinių susidarymo ant CAM (r = 0.06, p = 0.725).

## 5. DARBO REZULTATŲ APTARIMAS

## 5.1. Tyrime dalyvavusių pacientų demografinių, epidemiologinių ir klinikinių duomenų analizė

Kiek mums žinoma, tai pirmasis tokio tipo GP ir GPLK *in vivo* eksperimentinis modelis Lietuvoje ir pasaulyje. Šiuo tyrimu siekėme nustatyti minėtų navikų išraiškas viščiuko embrionų CAM, taip pat GPLK bei GP audinių augimo ant CAM sąsajas su klinikiniais pacientų duomenimis.

Išanalizavome ir nustatėme, kad implantuoti GPLK ir GP naviko gabalėliai buvo paimti iš pacientų, kurių demografiniai, epidemiologiniai ir klinikiniai rodmenys atitiko kitose studijose nurodomus. Pavyzdžiui, visi pacientai, kurių GPLK navikinius audinius naudojome implantacijai ant viščiuko embriono CAM, buvo vyrai. Kaip nurodoma kitų tyrėjų publikacijose, gerklų srities karcinoma vyrai serga vidutiniškai 4 kartus dažniau nei moterys [44, 87]. Be to, mūsų studijoje dalyvavusių pacientų amžiaus vidurkis siekė  $(54 \pm 7 \text{ m})$ , GPLK diagnozės nustatymo metu taip pat atitiko literatūroje nurodomus GPLK pasireiškimo 51,5-63 paciento gyvenimo metus [37, 44, 87]. Daugiau nei pusei mūsų eksperimente dalyvavusių pacientų (66 proc.) buvo nustatytas T1 ir T2 naviko išplitimo lygis, skirtingai, nei nurodo K. Markou ir bendraautoriai (2013). Šių autorių literatūros apžvalgoje teigiama, kad Graikijos rytų regione dažniausiai (52 proc. atvejų) buvo aptinkami iki T3 ir T4 lygio išplitę GPLK [88]. Tačiau tiek minėtoje literatūros apžvalgoje (85 proc.), tiek mūsų klinikoje dėl GPLK operuotiems pacientams (83 proc.) dažniausiai buvo nustatomas G1 ir G2 naviko diferenciacijos laipsnis, o trečdalis studijoje dalyvavusių pacientų, kaip ir kitų studijų duomenimis, neišgyveno 5 metų laikotarpio, progresavus GPLK [87, 88].

Skirtingai nei GPLK, GP sirgusių mūsų ekperimento dalyvių amžius buvo įvairus ( $34 \pm 21$  m), o pasiskirstymas tarp lyčių – panašus, t. y. eksperimente naudoti 7 moterų ir 6 vyrų GP audiniai. Literatūroje aprašoma, kad GP gali pasireikšti tiek jauname, tiek vyresniame amžiuje [8]. Vaikų amžiaus grupėje GP pasireiškia vienodai dažnai berniukams ir mergaitėms, kaip ir suaugusiųjų populiacijoje, kartais nežymiai santykį persveriant vyriškos lyties pacientams [89]. Vertinant pagal Derkay/Coltrera indeksą, mūsų studijoje dalyvavusių pacientų papilomų išplitimas buvo vidutinis, t. y. 7 ± 3 balų, o recidyvų skaičius iki endolaringinės GP šalinimo operacijos taip pat, kaip ir kitų autorių duomenimis, buvo įvairus, t. y. nuo 0 iki 40 kartų [6, 22, 24, 90].

Taigi, eksperimentui naudojome skirtingo amžiaus, lyties ir skirtingos klinikinės eigos, tačiau tipiškų šiomis ligomis sergančių pacientų GPLK ir GP audinius.

## 5.2. GPLK ir GP naviko gabalėlių augimo ant CAM ir jos histomorfometrinių parametrų aptarimas

Daugelyje mokslinių studijų, kur eksperimentine žmogaus navikų augimo terpe pasirinkta viščiuko embriono CAM, tyrimams buvo naudojamos ląstelių kultūros, pavyzdžiui, dauginės mielomos ląstelės [91], melanomos [92], neurobalstomos [93], glioblastomos [94] ir kitos [33]. Literatūroje aptariama, jog, eksperimentui naudojant ląstelių kultūras, jų *in vitro* ir *in vivo* augimo ypatybės gerokai skiriasi nuo žmogaus naviko audinių, kuriuos sudaro heterogeniškos, t. y. tiek navikinės, tiek jungiamojo audinio ląstelės, poveikio eksperimentinei terpei [95]. Yra nustatyta, kad išgrynintos naviko ląstelės skiriasi nuo pirminio naviko ne tik histologine sandara, bet ir genetine sudėtimi [96]. Todėl, atliekant eksperimentus su žmogaus navikų audiniais, galima tikėtis maksimaliai natūralios jų raiškos *in vivo* terpėse, palyginti su tiriamų navikų klinikine eiga pačiame paciento organizme [95].

Dėl šios priežasties savo moksliniams tyrinėjimams naudojome žmogaus GPLK ir GP audinių gabalėlius. Kaip eksperimentinę terpę pasirinkome viščiuko embriono CAM dėl puikios CAM medžiagų apykaitos, geros kraujotakos ir vėlai susiformuojančios imuninės sistemos (18-a inkubacijos para) [70]. Pasirinkti viščiuko embriono CAM mus paskatino ir pakankamai nesudėtingai, palyginti greitai atliekami tokio tipo moksliniai tyrinėjimai, ir santykinai nedideli eksperimento kaštai [69, 70].

Remdamiesi šiais duomenimis bei kitų tyrėjų aprašoma patirtimi, implantavome GPLK ir GP naviko gabalėlius ant viščiuko embriono CAM pagal klasikine laikomą metodiką [86].

Nustatėme, kad dauguma (94 proc.) GPLK naviko gabalėlių buvo rasti prigiję ant viščiuko embrionų CAM, vertinant makroskopiškai, biomikroskopiškai bei histologiniu tyrimu (pjūviuose, dažytuose H&E). Tačiau pastebėjome, kad dalis embrionų (27 proc.) su prigijusiais GPLK implantais ant jų CAM tyrimo metu žuvo. M. Balke (2010), analizuodamas, kaip viščiuko embriono CAM veikia žmogaus osteosarkomos ląstelės, nustatė, jog tos osteosarkomos ląstelių linijos, kurios greitai suformavo solidinius tumorus ant CAM ir/ar plito už pirminio naviko ribų, sukėlė statistiškai reikšmingai dažnesnę embrionų žūtį nei niekuo neimplantuotų kontrolinės grupės CAM embrionų. Autoriai aiškina, kad ant CAM prigiję žmogaus navikai paskatina koaguliaciją viščiuko embriono kraujagyslėse, dėl to

pastarieji žūsta [97]. E. Malik ir bendraautoriai (2000) pastebėjo, kad viščiuko embrionų gyvybingumas priklauso nuo endometriumo gabalėlių implantacijos ant CAM paros, t. y. 8–10-ąją inkubacijos paromis sukėlus eksperimentinę CAM endometriozę, embrionų mirtingumas padidėjo statistiškai reikšmingai [98]. G. J. Petruzzelli ir bendraautoriai (1993) taip pat nustatė, jog dalis embrionų su GKPLK implantais ant jų CAM eksperimento metu žuvo. Tačiau dauguma GKPLK navikų, 30 atvejų (68 proc.) iš 44, prigijo ant gyvybingų embrionų CAM ir/ar infiltravo jos mezodermą [99].

Literatūroje aprašomi ir kiti sėkmingi piktybinės kilmės navikinių audinių, pavyzdžiui, žmogaus hepatoceliulinės karcinomos [78], glioblastomos [94], endometriumo adenokarcinomos [62], nazofaringinės karcinomos [100] prigijimo ant CAM atvejai, kuomet minėti navikiniai audiniai ne tik auga ant CAM, bet ir sukelia jos morfologinius pokyčius.

O piktybinių navikų ląstelių kultūros, inokuliuotos ant viščiuko embriono CAM, remiantis D. Ribatti (2014) duomenimis, praėjus 2–5 dienoms po implantacijos, suformuoja vientiso tumoro konglomeratus, kurie vėliau ant CAM auga jau kaip solidiniai navikai [33]. Pastarieji, kaip nurodo Xue Xiao ir bendraautoriai (2015), sukelia panašius eksperimentinės membranos morfologinius pokyčius, kaip ir tos pačios rūšies ant CAM implantuoti naviko audiniai [100].

Per mūsų atliktą eksperimentą, nepiktybinių gerklų navikų, t. y. GP audinio gabalėliai, taip pat sėkmingai prigijo ant viščiuko embrionų CAM. Dalis embrionų (32 proc.) su prigijusiais GP audinio gabalėliais ant jų CAM, tyrimo metu žuvo. Mes manome, kad embrionai galėjo žūti dėl tų pačių priežasčių kaip ir GPLK grupėje. Tačiau, skirtingai nei piktybinių gerklų navikų (GPLK), GP audinio implantų prigijimo procentas ( $62 \pm 24$ proc.) buvo statistiškai patikimai mažesnis. Mūsų duomenimis, literatūroje nėra aprašytų mokslinių studijų, kuriuose būtų palygintas piktybinių ir nepiktybinių tos pačios anatominės srities navikų ar jų ląstelių kultūrų poveikis viščiuko embriono CAM. Tačiau yra žinoma, kad nepiktybiniai žmogaus navikai, kaip antai lipoma [101], kiaušidės endometrioma [33] ar meningioma [33] ne tik prigyja ir auga ant CAM, bet ir akivaizdžiai suaktyvina angiogenezę jos mezenchimoje [33, 101].

Įdomu tai, jog implantuojant ant CAM nepatologinius, t. y. sveikos žmogaus kiaušidės fragmentus, šie prigyja 92 proc. dažnumu ir nesukelia žymios viščiuko embrionų žūties. Šioje studijoje nėra analizuojamos embrionų gyvybingumo priežastys. Mes manome, kad implantuojant sveikus audinius, pastarieji prigyja ir auga ant CAM, nesužadindami patologinių CAM reakcijų, išskyrus kraujotakos suintensyvėjimą po implantuotu audinio gabalėliu. Šią prielaidą patvirtina faktas, kad sveiki kiaušidės audiniai neplito už CAM ribų ir/ar nesusiformavo nauji kiaušidės dariniai atokiose

nuo implanto vietose [102]. Ir vis dėlto, V. Isachenko ir bendraautoriai (2012) nustatė, kad kiaušidės folikulų morfologinė struktūra išliko nepakitusi net praėjus 5 dienoms po gabalėlių implantacijos [102]. Mūsų studijos metu implantuoti GPLK ir GP naviko gabalėliai ant viščiuko embriono CAM augo nuo 2 iki 7 parų ir taip pat išlaikė savo histologinę struktūrą iki pat eksperimento pabaigos.

Tyrimui pasibaigus, CAM su prigijusiais GPLK ir GP audinio gabalėliais buvo išpjautos, o morfologiniai CAM pokyčiai įvertinti objektyviais tyrimo metodais. Atlikę histomorfometrinius matavimus, pastebėjome, jog tiesiai po prigijusiais GPLK ir GP implantais ir šalia jų esančiose CAM srityse eksperimentinės CAM statistiškai patikimai sustorėjo, palyginti su kontūrolinėmis membranomis. Literatūroje nurodoma, kad intaktinės CAM storis gali varijuoti nuo 20 iki 100 µm [69]. Mūsų duomenimis, vidutinis kontrolinės CAM storis buvo  $37 \pm 6 \mu m$ , t. y. varijavo nuo 11 iki 122  $\mu m$  storio, vadinasi, visiškai atitiko literatūroje nurodomus niekuo nepaveiktos CAM parametrus. Tačiau eksperimentinės CAM storis po GPLK implantais vietomis siekė net 813 µm, o GP grupėje – iki 528 µm. Kadangi viščiuko embriono CAM yra apibūdinama kaip labai heterogeniška in vivo terpė, o jos parametrai, vra žinoma, būna skirtingi embrionui augant [63, 64, 69]. eksperimentinių ir kontrolinių CAM morfometrinius matavimus atlikome skirtingomis embrionų inkubacijos paromis. Mūsų duomenimis, jau devinta inkubacijos para, t. y. praėjus vos 2 paroms po GPLK ir GP audinių implantavimo, tiek pati CAM, tiek jos, epitelis palyginti su kontrolinėmis CAM riekšmingai sustorėjo. Šie pokyčiai buvo matomi ir visas kitas (10–13) inkubacijos paras. Tuomet palyginome tos pačios (11-osios) inkubacijos paros membranas, esant skirtingam implantų ekspozicijos ant jų laikui. Pastebėjome, kad ilgėjant GPLK augimo ant CAM trukmei, storėja pati CAM, o chorionis epitelis išlieka panašaus storio 2, 3 ir 4-aja para po implantacijos. Be to, pati CAM 9, 10 ir 12-ąją inkubacijos paras rasta statistiškai patikimai storesnė GPLK grupėje, palyginti su GP grupe.

Remdamiesi kitų autorių patirtimi, galime numanyti, kad CAM sustorėjo dėl edemos ar nespecifinės uždegiminės viščiuko embriono reakcijos į GPLK ir GP implantą [27]. Literatūroje aptariama, kad CAM mezenchima gali persiorganizuoti veikiama implantuoto naviko gabalėlio ar ląstelių kultūros mechaninės jėgos [103], taip pat dėl implanto ląstelių augimo faktorių poveikio. Pastarieji, kaip yra žinoma, sukelia fibrocitų proliferaciją, podraug ir pačios mezenchimos storėjimą [104]. Mūsų atlikto tyrimo metu GPLK audinio gabalėliai 32 proc. membranų reikšmingai sutankino CAM epitelį bei suformavo epitelines CAM išaugas, literatūroje vadinamas "liežuviais" (*tongues*). Pastarieji yra laikomi tipišku karcinomos požymiu žmogaus gleivinėje ir yra interpretuojami kaip naviko plitimas į gilesnius

gleivinės sluoksnius [105]. Mes pastebėjome, kad dalis GPLK implantų ant viščiuko embriono CAM augo infiltruodami CAM epitelį ir jos mezodermą ar tiesiog ją "peraugo". GPLK navikai, galbūt, dėl tokio infiltruojančio augimo pobūdžio ant CAM, panašiai kaip ir žmogaus gleivinėse suintensyvino augimo faktorius, paskatino membranos persiorganizavimo ir fibrocitų proliferacijos procesus. Panašius GKPLK augimo ant CAM rezultatus aprašo G. J. Petruzzelli su bendraautoriais (1993). Jų atliktame eksperimente dalis naviko implantu taip pat penetravo ir infiltravo CAM mezenchimas, indukavo jų sutankėjima bei žymų CAM kraujotakos suintensyvėjimą [99, 106]. T. Strojnik ir bendraautoriai (2010), atlikę bandymus su piktybinių navikų (glioblastomos) ląstelių kultūromis, pastebėjo, jog, susiformavus solidiniams tumorams ant viščiuko embriono CAM, navikinės glioblastomos lastelės plito į gilesnius CAM sluoksnius pagal stambiausios mezenchimos kraujagyslės sienelę, sukėlė vietinę jungiamojo audinio infiltracija bei nespecifinę uždegiminę reakciją. Taigi, embriono uždegiminės lastelės (limfocitai ir granuliocitai), kaip nurodo autoriai, kaupėsi aplink mezenchimon plintančias glioblastomos naviko lasteles ir CAM kraujagysles [84]. O štai, Min Liu su kolegomis (2013) implantavęs GKPLK ląstelių ant viščiuko embriono CAM pastebėjo, jog šios per 3 augimo ant CAM paras ne tik suformavo vientisus naviko gabalėlius ir pažeidė chorioninio epitelio pamatine membrana, bet ir penetravo embriono kraujagyslės sienelę ir išplito po CAM mezenchimą bei viščiuko embriono vidaus organus [107].

Palyginti su GPLK navikų poveikiu CAM ir jos struktūroms, GP audinio gabalėliai reikšmingiau paveikė chorioninį epitelį, kuris (10-ąją parą) storėjo labiau nei GPLK grupėje. Ilgėjant GP ekspozicijos ant CAM laikui (12-ąją parą), t. y. 4-ąją parą po GP implantacijos, CAM epitelis buvo labiau sustorėjęs nei trečią. Vyraujantis šios grupės membranų požymis – epitelio sutankėjimas ir žymus jos sluoksnių padaugėjimas. GP implantų įtakoje taip pat formavosi epitelinės CAM išaugos, nukreiptos mezenchimos link. Žmogaus gleivinėje tokio tipo ŽPV viruso sukeltas "liežuvėlių" formavimasis yra vadinamas akantoze [108]. Svarbu tai, jog nė vienoje šių membranų nebuvo pažeistas chorioninio epitelio pamatinės membranos sluoks-nis.

Kadangi gerklų papilomos navikai viščiuko embriono CAM anksčiau nebuvo tirti, mūsų tyrimo metu gautų duomenų negalime palyginti su kitų autorių patirtimi. Tačiau studijų, aprašančių nepiktybinių žmogaus navikų, kaip antai lipoma, meningioma ar kiaušidės endometrioma poveikį viščiuko embriono CAM yra. Jose neanalizuojamas šių navikų poveikis CAM epiteliui, tačiau žinoma, jog nė vienas iš minėtų implantų neaugo infiltratyviai ir nepažeidė CAM epitelio pamatinės membranos sluoksnio [33, 101].

Publikacijų apie eksperimentiniuose tyrimuose naudotus kitus gyvūnų modelius GP patofiziologiniams veiksniams išsiaiškinti literatūroje taip pat nėra daug [28]. Tokio tipo tyrimai atliekami su eksperimentinėmis pelėmis [20], triušiais [20] bei šunimis [29, 30]. Tačiau, tik viename iš jų buvo tirtas GP poveikis eksperimentinio gyvūno gleivinei. Studijos metu nustatyta, kad injekavus į gerklų ir skruosto srities pogleivį GP ląstelių suspensiją, injekcijos vietose per šešias savaites susiformuoja papilomos navikai. Autoriai aprašo, kad pastarieji greitai plinta apkrėstos gleivinės lygyje, tačiau neaprašo šuns – GP "recipiento" – gleivinės histomorfologinių ypatumų po GP implantacijos [30].

Taigi, trūkstant žinių apie GP poveikį CAM epiteliui ir/ar gyvūnų gleivinei, pabandėme nubrėžti sasajas tarp GP poveikio viščiuko embriono CAM ir žmogaus organizmo. Moksliniais tyrimais pagristais duomenimis, ŽPV infekuoja tik baziniame epitelio sluoksnyje esančias žmogaus gleivinės ląsteles, t. y. tik tas epitelio ląsteles, kurios geba aktyviai daugintis. Papilomai augant, žmogaus gerklų epitelis storėja. Nesant GP supiktybėjimo požymių, papilomų invazija į gilesnius žmogaus gleivinės sluoksnius nevyksta, t. y. liga pasireiškia tik egzofitiniu naviko augimu [24]. Remdamiesi šiomis žiniomis, mes darome prielaida, kad GP audiniams augant ant viščiuko embriono CAM, nekontroliuojamas ląstelių dauginimasis taip pat vyksta tik chorioninio epitelio lygyje, panašiai kaip ir žmogaus gleivinėse. Be to, eksperimento metu pastebėjome, kad papilomos augo formuodamos specifinę "matrica" (plėvę) aplink GP implanta, kurios padėjo GP lastelėms plisti i gretimas CAM sritis. Kokia šios "matricos" kilmė bei reikšmė GP patogenezėje, paaiškinimo rasti nepavyko literatūroje. Virusologijai skirtuose straipsniuose ir vadovėliuose yra teigiama, jog, daugumai virusų kultūrų augant ant CAM, kultūrų aplikacijos vietoje ir aplink jas formuojasi vadinamasis "raupas" (pock), lydimas chorioninio epitelio ir pačios CAM edemos. Šio "raupo" buvimas, kaip teigiama, yra tipiškas viruso augimo ant viščiuko embriono CAM požymis [109]. Taigi, minėtos plėvės susiformavimas mūsų tyrinėjamose membranose taip pat gali būti ŽPV išraiška viščiuko embriono CAM. Be to, mes manome, kad ši "matrica" ne tik dalyvavo GP plintant ant CAM, bet ir galėjo būti dar viena chorioninio epitelio storėjimo priežastimi. Tačiau minėtoms prielaidoms patvirtinti reikalingos tolesnės implantuotų GP audinių ant CAM studijos.

### 5.3. Histomorfometriniai CAM angiogenezės ypatumai praėjus 2, 3 ir 4 paroms po GPLK ir GP naviko gabalėlių implantacijos

Viščiuko embriono CAM yra žinoma kaip biologinė terpė, kurios gerai išsivystęs kraujagyslių tinklas yra optimali salyga lastelių kultūrų ir/ar naviko audinių implantacijai [68, 69, 110]. Dauguma piktybinių ir nepiktybinių žmogaus navikų ar iš jų gautos ląstelių kultūros yra tyrinėjamos ant CAM būtent angiogeneziniu požiūriu. Mokslininkai vis dar mano, kad navikų formavimosi, augimo ir plitimo potencialas priklauso nuo jo kraujotakos intensyvumo [99]. Vieni pirmųjų CAM vaskuliarizacijos ypatumus po navikų implantacijos tyrinėjo D. Knighton ir bendraautoriai (1977). Jie nustatė, kad viščiuko embriono CAM epitelis iki 10-osios jo inkubacijos paros pasižymi stipriu mitotiniu aktyvumu, todėl, implantavus navikus 8-10-ąją embriono inkubacijos parą, nustatoma aiški CAM kraujagyslių reakcija į implantą. Tačiau, navikus implantavus 11-ają inkubacijos parą ir vėliau, pastarieji neprigyja [77]. Dėl šios priežasties GPLK ir GP naviko gabalėlių implantacijas suplanavome 7–9-ąją embrionų inkubacijos parą. Remdamiesi žiniomis apie skirtingų navikų ar ląstelių kultūrų poveikį viščiuko embriono CAM [33], angiogeninio CAM atsako i GPLK ir GP audinio implantus tikėjomės. Mūsų tikslas buvo išsiaiškinti, ar GPLK ir GP sukelia reikšmingesnę angiogenezę nei kontrolinėje grupėje ir kaip skiriasi abiejų eksperimentinių grupių CAM vaskuliarizacijos intensyvumas.

Nustateme, kad jau nuo antros paros po GPLK ir GP implantacijos ant CAM ju mezenchimose pradėjo statistiškai patikimai daugėti kraujagyslių. kurių spindis buvo didesnis nei 8 µm, palyginti su kontrole. Be to, šios kraujagyslės pradėjo orientuotis naviko implanto augimo kryptimi. Identišką CAM angiogenezės mechanizma savo literatūros apžvalgose aprašo D. Ribatti ir bendraautoriai (2014), kurie teigia, kad pirmasias 24 val. po naviko gabalėlio ar lastelių kultūros implantacijos vyksta intensyvi vazodilatacija [33, 62], po to daugėja smulkiųjų kapiliarų, jie krypsta implanto gabalėlio link [33]. Per kitas 48 val. CAM kraujagyslės penetruoja implantuotą naviko gabalėlį ir aprūpina jį viščiuko krauju [33]. N. Sliwinskos ir bandraautorių teigimu (2015), egzistuoja 2 naviko gabalėlių prigijimo ant CAM mechanizmai. Autorių nuomone, implantavus patologinį audinį ant CAM. formuojasi periferinės anastomozės tarp naviko ir CAM kraujagvsliu. kurios užtikrina prigijusio gabalėlio mitybos funkcijas, arba CAM kraujagyslės jauga į implantą ir taip aprūpina jį embriono krauju ir maisto medžiagomis [36]. Savo moksliniame darbe nesiaiškinome, kuriuo būdu GPLK ir GP implantuose vyksta kraujotakos persiorganizavimas, tačiau nustatėme, kad nuo trečios paros po gabalėlių implantacijos viščiuko kraujagyslės aprūpino prigijusius naviko audinius embriono maisto medžiagomis. Šie

požymiai buvo identifikuoti tuomet, kai ant CAM prigijusiuose GPLK ir GP audiniuose aptikome branduolį turinčių viščiuko eritrocitų. Xue Xiao ir bendraautoriai (2015) taip pat identifikavo branduolėtas kraujo ląsteles prie CAM prigijusiuose nosiaryklės karcinomos gabalėliuose bei solidinius tumorus suformavusiose tos pačios rūšies naviko ląstelių kultūrose. Šiuos požymius autoriai pastebėjo praėjus 72 val. po naviko implantacijos, taigi, tuo pačiu metu kaip ir mes nustatėme savo eksperimente [111].

Įdomu pastebėti, jog 9-ąją, 10-ąją ir 12-ąją inkubacijos paromis (t. y. praėjus 2, 3 ir 4 paroms po gabalėlių implantacijos) CAM kraujagyslių skiekis GPLK ir GP grupėse statistiškai patikimai padidėjo, formavosi aiškus vadinamasis stipininis ratelis (*spoked-wheel*) aplink implantus, tačiau šie pokyčiai nebuvo priklausomi nuo naviko kilmės.

Lyginamaja naviko implantų ant CAM studija atliko D. Auspruk ir bendraautoriai (1975), jie nustatė, jog tiek piktybiniai žiurkės navikai (Walker256 karcinoma), tiek sveiko žiurkės audinio (ruožuotųjų raumenų, širdies, kepenų, inkstų) implantai indukuoja CAM angiogenezę, tačiau pastarieji sukelia statistiškai patikimai mažiau išreikštą CAM kraujagyslių proliferacijos procesą, palygintit su piktybiniais navikais [76]. Literatūroje aprašoma, kad žmogaus melanoma [33], osteosarkoma [97], glioblastoma [94], galvos ir kaklo plokščiujų ląstelių karcinoma [99], nosiaryklės plokščiųjų lastelių karcinoma [111] ir kiti piktybinės kilmės navikai, taip pat nepiktybiniai navikai t. y. kiaušidės endometrioma [33], meningioma [33], lipoma [101] ir sveikos kiaušidės audinio gabalėliai indukuoja CAM angiogenezės procesus [102]. Tačiau nė vienoje šių eksperimentinių studijų nebuvo lygintas tos pačios anatominės srities piktybinio ir nepiktybinio naviko angiogeninis efektas viščiuko embriono CAM. Be to, nebuvo nustatytas ir nepiktybinės kilmės naviko plitimas CAM struktūromis, skirtingai nei mūsų tyrimo metu, kur GP navikai jau nuo trečios augimo ant CAM paros suformavo satelitinius pirminio naviko darinius ant membranos paviršiaus.

Navikų implantavimo ant viščiuko embriono CAM metodikos klasiku laikomas D. Knighton (1977) teigia, kad neoangiogenezės lyginamąsias studijas su prigijusiais naviko gabalėliais efektyviausia atlikti nuo 11-osios inkubacijos paros, kai mitotinis pačios CAM ir jos epitelio aktyvumas yra minimalus. Autoriaus nuomone, šiuo inkubacijos periodu ir vėliau galima aiškiai atskirti, kuris navikas sukelia žymesnį angiogeninį efektą, nes vaskulogenezei nedaro įtakos pačios CAM augimo faktoriai [75]. Mūsų eksperimento rezultatai (iškyrus 11-osios inkubacijos paros) visgi rodo, jog, nepaisant inkubacijos trukmės (9-ąją, 10-ąją ir 12-ąją inkubacijos parą), tiek GPLK, tiek GP audinio implantai sukėlė panašaus lygio angiogenezę viščiuko embriono CAM.

Labai svarbiu mūsų eksperimento rezultatu laikome nustatytą angiogenezės skirtumą tarp membranų, kuriose GPLK metastazavo ant CAM ir nemetastazavo. Mes pastebėjome, kad statistiškai reikšmingai didesnis kraujagyslių skaičius buvo tose CAM (p = 0.003), kur GPLK implantai suformavo atokiąsias MTS, nei tose, kur GPLK nesuformavo MTS ant eksperimentinės CAM. Balke M. ir bendraautoriai (2010) taip pat pastebėjo, jog tos osteosarkomos ląstelių linijos, kurios išplito ant viščiuko embriono CAM, sukėlė labiau išreikštą angiogenezę nei tos, kurios nesuformavo atokiųjų osteosarkomos MTS [97]. M. Cecilia Subauste ir bendraautoriai (2009) nustatė, kad implantavus metastazinio SW620 ir nemetastazinio tipo SW480 storosios žarnos vėžio ląsteles, kraujotakos pokyčiai tarp šių grupių buvo akivaizdūs, t. y. pirmojo tipo ląstelės indukavo statistiškai reikšmingesnę angiogenezę nei SW480 tipo ląstelės [112].

Viščiuko embriono CAM vaskuloproliferacinis atsakas į GPLK ir GP implantus, taip pat naviko gabalėlių ir naujai susiformavusių atokiųjų GPLK ir GP darinių perfuzija viščiuko krauju buvo patvirtinta taikant *in vivo* biomikroskopijos bei fluorescencinės stereomikroskopijos tyrimo metodus. Kadangi viščiuko embriono CAM yra plona, permatoma biologinė struktūra, tyrimai su įvairaus bangos ilgio fluorescuojančiomis medžiagomis gali būti taikomi analizuojant naviko implantų sukeltos angiogenezės ypatumus realiu laiku [36]. Eksperimento metu pastebėjome, kad, praėjus 5 paroms po GPLK ir GP implantacijos, į stambiausią CAM kraujagyslę sušvirkštas fluorescuojantis dekstranas per 5 min. pasiskirstė implantų kraštuose, 6-ąją parą po implantacijos gabalėliai švytėjo intensyviau, o 7-ąją parą nustatyta pilna implantuotų naviko gabalėlių perfuzija viščiuko embriono krauju. Šie naviko gabalėliai ir jų satelitiniai dariniai ant CAM visame savo plote ėmė švytėti tokiu intensyvumu, kaip ir fluoresceinu injekuota CAM kraujagyslė.

Daugumoje mokslinių studijų fluoresceinu žymimos implantuojamo naviko ląstelės ir analizuojamas jų plitimas viščiuko kraujotakos tinkle ar po embriono organus [68, 111]. Tačiau aptikome vieno tyrimo studiją, kai ant viščiuko embriono CAM buvo implantuotos odos epidermoido (HEp3) ir krūties vėžio (MDA-MB435) ląstelių linijos. Tuomet, kai šios navikų ląstelės suformavo solidinius tumorus ant CAM, buvo tyrinėjami kraujotakos pokyčiai prigijusiuose navikuose prieš suleidžiant į CAM kraujotaką angiogenezę veikiančių medžiagų ir po to. Nustatyta, jog epidermoido ir krūties vėžio navikai, kuriems kartu su fluoresceinu buvo injekuota ir minėtos medžiagos, švytėjo žymiai intensyviau ir didesniame naviko plote, nei tie, kuriems injekuotas tik fluoresceinas [113]. Tokių studijų, kuriose būtų vertinama naviko audinių perfuzija viščiuko embriono krauju skirtingomis paromis po navikų implantacijos ant CAM, aptikti nepavyko.

Taigi, mūsų atlikto tyrimo duomenys patvirtina literatūroje išdėstytą teiginį, jog viščiuko embriono CAM su jos gerai išvystytu kraujagyslių tinklu yra tinkama terpė žmogaus navikams kultivuoti. Be to, mūsų rezultatai pagrindžia kitų tyrėjų nuomonę, kad aktyvesnė CAM angiogenezė gali būti susijusi su naviko polinkiu metastazuoti tiek viščiuko embriono CAM, tiek žmogaus organizme [111, 114].

### 5.4. Imunohistocheminis eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių įvertinimas DMM citokeratinu

Savo eksperimentams naudojome epitelinės kilmės GPLK ir GP naviko gabalėlius. Pacientams iš kurių buvo imami patologiniai audiniai, GPLK ir GP diagnozė buvo patvirtinta dar iki eksperimento pradžios, todėl DMM CK raiška šiuose naviko gabalėliuose dar iki jų implantavimo ant CAM buvo teigiama. Kai nustatėme, jog implantuoti navikai prigijo, tiek histologiškai, tiek imunohistocheminiu metodu turėjome pagrįsti, kad pastarieji, augdami ant CAM, nepakeitė savo pirminės struktūros.

Įvertinę prigijusių GPLK gabalėlių histologinius ypatumus, visuose nustatėme karcinomai būdingus požymius, t. y. atipiškas, polimorfiškas, daugiabranduoles ląsteles su gausia eozinofiliška citoplazma, o vietomis identifikavome susiformavusius plokščiojo epitelio mazgelius – "keratino perlus". Kaip ir GPLK, GP implantų histologinė struktūra buvo panaši į tą, kurią stebėjome kontroliniuose GP gabalėliuose, t. y. didelės, be atipijos požymių ląstelės, kurios buvo išsidėsčiusios aplink kraujagyslių stiebelį. Histologinis prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių tapatumas išliko iki eksperimento pabaigos, t. y. 7 paras po jų implantavimo ant CAM.

Literatūroje nurodoma, kad eksperimentuose su kitais epitelinės kilmės navikais – nosiaryklės ir kiaušidės karcinoma, DMM CK buvo taikomas šiai prigijusių navikų epitelinei kilmei identifikuoti. Nustatę jo raišką ant CAM augusiuose navikuose, autoriai teigė taip patvirtinę implanto tapatumą [111, 115].

Todėl, tolesnei implantų diagnostikai ir mes naudojome DMM CK. Mūsų atlikto eksperimento metu prigijusiuose GPLK ir GP gabalėliuose šio reagento raiška taip pat buvo nustatyta. Minėti rezultatai, kaip ir tikėjomės, patvirtino epitelinę prigijusių navikų kilmę. Be to, pastebėjome, kad naujai susiformavę satelitiniai GPLK ir GP (mts) navikai ant CAM bei ją penetravę GPLK gabalėliai taip pat pasižymėjo teigiama raiška į DMM citokeratiną, vadinasi, buvo implantuoto naviko dariniai.

### 5.5. Imunohistocheminis eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių įvertinimas Ki-67 ir PCNA reagentais

Šio eksperimento metu ant viščiuko embriono CAM prigiję GPLK ir GP audinio gabalėliai, kaip jau išsiaiškinome, išlaikė savo histologinę struktūrą ir sukėlė statistiškai patikimą CAM ir jos epitelio sustorėjimą bei angiogenezę. Taigi, kitame tyrimo etape siekėme išsiaiškinti, ar šie navikai išlaikė savo proliferacines savybes augdami ant eksperimentinės membranos ir kuriuo inkubacijos periodu jos pasireiškė.

Literatūroje nurodoma, kad daugumos piktybinių navikų metastazinės savybės yra susijusios su jų proliferacine geba, o gerklų navikuose ją geriausiai atspindi Ki-67 ir PLBA žymenys [50].

Mūsu eksperimento rezultatai parodė, kad ant CAM prigijusiuose GPLK ir GP naviko gabalėliuose buvo proliferuojančių šių navikų ląstelių. Jų raiška į Ki-67 reagentą buvo teigiama. T. Strojnik ir bendraautoriai (2010) visuose ant CAM prigijusiuose glioblastomos navikuose taip pat nustatė teigiamą Ki-67 antigeno raišką, tačiau ji buvo kur kas silpniau išreikšta nei pelės paodyje prigijusiuose tos pačios rūšies navikuose [84]. O štai M. Klingenberg ir bendraautoriai (2014), implantave ant viščiuko embriono CAM Burkito limfomos BL2B95 lasteles, pastebėjo, jog Ki-67 indeksas jose buvo didesnis nei 90 proc. Tačiau autoriai taip pat nurodė, kad šio tipo navikai tiek žmogaus organizme, tiek ant CAM auga greitai ir agresyviai. Per šį tyrima nustatyta, kad atokiosios naviko metastazės formavosi jau antra para po lasteliu kultūros implantavimo ant CAM [116]. Kitoje studijoje analizuota Ki-67 raiška ant CAM implantuotoje akies kraujagyslių dangalo melanomoje ir nustatyta, kad šio reagento raiška minėto naviko implante buvo labai didelė. Bet šio naviko lastelės kaip ir Burkito limfomos BL2B95, greitai išplito ant CAM ir po viščiuko embriono vidaus organus [117].

Teigiama GPLK naviko ląstelių raiška į Ki-67 reagentą identifikuota praėjus 4 paroms, o GP gabalėliuose – nuo trečios paros po pirminio naviko implantavimo. Šiuos rezultatus interpretuojame kaip atspindinčius mūsų tiriamų navikų patogenetinius ypatumus. Gali būti, kad GPLK proliferacinės savybės yra mažesnės nei prieš tai tirtų navikų. Be to, prigijusiuose GP audiniuose Ki-67 raiška nustatyta anksčiau nei prigijusiuose GPLK navikuose. Gali būti, tai irgi susiję su prieš tai pateiktais duomenimis, t. y. GP ant CAM išplito suformuodama ne pavienius kaip GPLK, o daugybinius satelitinius darinius, kuriuose šio reagento raiška taip pat buvo nustatyta.

Proliferacines mūsų tiriamų navikų savybes patvirtinome naudodami dar vieną besidauginančių ląstelių žymenį – PLBA: jo raiška tose vietose, kurios dažėsi Ki-67 antigenu, taip pat buvo teigiama. Šio imunohistocheminio

žymens svarbą tiriant kitus ant CAM implantuotus navikus patvirtina ir literatūroje aprašyti moksliniai tyrimai [118].

# 5.6. Imunohistocheminis eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių įvertinimas anti MMP 9 reagentu

Po prigijusiais GPLK ir GP audinio gabalėliais, kuriuose buvo nustatyta Ki-67 ir PLBA raiška, CAM mezenchimoje pastebėjome heterofilus. Literatūroje nurodoma, jog, dar neesant susiformavusiai viščiuko embriono imuninei sistemai, apsauginę funkciją atlieka nespecifinė imuninė sistema, kurios ląstelės – monocitai, makrofagai ir heterofilai. Pastarieji yra žinduolių neutrofilų analogas, taip pat ir pagrindinis matrikso metaloproteinazių 9 šaltinis [33]. Kaip rodo kitų autorių patirtis, jie telkiasi būtent tose CAM vietose, kur vyksta mezenchimos persiorganizavimo procesai ir aktyvi angiogenezė [33, 36, 68].

Remiantis šiais duomenimis, tiriamosioms membranoms pritaikėme imunohistocheminį dažymą anti MMP 9 žymeniu, kuris nudažo heterofilus ruda spalva. Nustatėme, kad anti MMP 9 pažymėti heterofilai telkėsi po implantuotais GPLK ir GP audinio gabalėliais ir po naujai susiformavusiais atokiaisiais jų dariniais, t. y. tose vietose, kur mes identifikavome aktyvią angiogenezę.

# 5.7. Histocheminis eksperimentinių CAM ir ant jų prigijusių GPLK ir GP naviko gabalėlių įvertinimas *Sambucus nigra* lektinu

Kaip jau minėjome 5.3 tyrimo rezultatų aptarimo skyriuje, histologiniuose H&E dažytuose eksperimentiniuose CAM preparatuose, t. y. ant CAM prigijusiuose GPLK ir GP audiniuose, radome branduolius turinčių viščiuko embriono eritrocitų. Siekdami patvirtinti mūsų nustatyto požymio patikimumą, atlikome imunohistocheminį šių membranų dažymą *Sambucus nigra* lektinu. Pastarasis yra žinomas kaip specifinis žymuo, kuris jungiasi tik prie viščiuko embriono endotelinių ląstelių ir jas nudažo ruda spalva. Literatūroje nurodoma, kad šis reagentas yra naudojamas viščiuko embriono kraujagyslių buvimui implantuoto naviko audinyje nustatyti [33, 68, 119].

Mūsų eksperimento rezultatai parodė, jog tiek GPLK, tiek GP audinio gabalėliuose buvo stebėta teigiama *Sambucus nigra* lektino raiška. Vadinasi, ir histologiniuose H&E dažytuose preparatuose, ir fluorescuojančia stereomikroskopija nustatyti šių audinių perfuzijos viščiuko embriono krauju požymiai buvo patvirtinti ir pastaruoju metodu.

### 5.8. GPLK ir GP augimo ant CAM ryšys su klinikine ligos eiga žmogaus organizme

Tokių studijų, kurios analizuotų ant viščiuko embriono CAM prigijusių žmogaus navikų sąsajas su klinikine paciento ligos eiga, literatūroje nėra.

Mūsų eksperimento metu išryškėjo tam tikros paralelės tarp implantuotų GPLK ir GP navikų ir tam tikrų paciento, iš kurio šie audiniai buvo paimti, klinikinių rodmenų. Visų pirma, ant viščiuko embriono CAM patikimai dažniau prigijo gerklų piktybinių navikų audiniai. Kaip nurodo E. Rouslahti, žmogaus vėžys gali metastazuoti ir kontaktiniu keliu, t. y. naviko masės, pasiekusios gretimą anatominę sritį, ant jos gali prigyti tiesiog kontakto būdu [120]. Apie GP išplitimą kontakto būdu literatūroje taip pat yra duomenų. Pavyzdžiui, papilomų išsisėjimas į žmogaus plaučius po endolaringinės gerklų operacijos, manoma, vyksta būtent tokiu būdu, tačiau tai vis dar išlieka moksline prielaida [11].

Šią hipotezę galbūt pagrindžia ir kitas mūsų pastebėjimas, jog ne tik nepikybiniai, bet ir piktybiniai, tačiau geresnį diferenciacijos laipsnį atitikę GPLK navikai ant eksperimentinių membranų prigijo patikimai rečiau nei vidutiniškai ar blogai diferencijuoti navikai. Be to, šie navikai ne tik žmogaus organizme, bet ir viščiuko embriono CAM metastazavo į atokiąsias CAM sritis nuo pirminio židinio patikimai dažniau už tuos navikus, kurie paciento organizme nemetastazavo. Be to, kuo blogesnis buvo implantuoto naviko diferenciacijos laipsnis G, tuo daugiau buvo rasta kraujagyslių CAM mezenchimoje.

Įvertinę šiuos požymius GP grupėje, taip pat pastebėjome, jog kuo dažnesni GP recidyvai buvo paciento organizme, tuo geriau šių navikų gabalėliai prigijo ant viščiuko embriono CAM ir patikimai dažniau plito į atokiąsias CAM sritis, nei tų pacientų, kurių ligos recidyvai buvo reti.

88

## IŠVADOS

- 1. Viščiuko embriono CAM yra tinkama terpė eksperimentiniams GPLK ir GP modeliams kurti. Implantuoti navikai, prigiję ant CAM, sukelia jos charakteringus makroskopinius pokyčius bei sudaro sąlygas mikroskopiniam, morfologiniam bei morfometriniam eksperimentinių navikų tyrimui.
- 2. GPLK ir GP navikų implantai, prigiję ant viščiuko embriono CAM, sukėlė statistiškai reikšmingą pačios CAM, jos chorioninio epitelio sustorėjimą bei mezenchimos kraujagyslių su heterofilų sankaupomis apie jas padidėjimą. Šie pokyčiai buvo matomi tiesiai po prigijusio naviko implantu bei šalia esančiose CAM srityse.
- 3. GPLK ir GP implantuose, prigijusiuose ant viščiuko embriono CAM viso eksperimento metu, stebėta išlikusi šiems navikams būdinga histologinė struktūra su aiškiais GPLK ir GP ląstelių proliferacijos požymiais jų parenchimoje. GPLK naviko gabalėliai augo labiau infiltratyviai CAM atžvilgiu bei formavo pavienes, epiteliniam navikui būdingas CAM metastazes. GP navikai augo CAM paviršiuje be įaugimo į CAM mezenchimą požymių bei formavo daugybinius epitelinės struktūros židinius ant CAM, atokiau nuo implantuoto GP gabalėlio.
- 4. Blogesnės diferenciacijos (G 2–3) GPLK implantai ant viščiuko embriono CAM prigijo statistiškai patikimai dažniau ir reikšmingai padidino CAM kraujagyslių kiekį nei geresnės diferenciacijos GPLK navikai. Pacientų organizme metastazavę GPLK navikai statistiškai reikšmingai dažniau išplito ir ant CAM. GP implantų prigijimo dažnis bei plitimas ant CAM buvo tiesiogiai susijęs su šių navikų recidyvų dažnumu pacientų organizme.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- 1. Rudolph E, Dyckhoff G, Becher H, Dietz A, Ramroth H: Effects of tumour stage, comorbidity and therapy on survival of laryngeal cancer patients: a systematic review and a meta-analysis. Eur Arch Otorhinolaryngol 2011, 268(2):165-179.
- 2. Xu Y, Liu S, Yi H, Wang J, Dong P, Li X, Yin S: Human papillomavirus infection in 674 Chinese patients with laryngeal squamous cell carcinoma. PLoS One 2014, 9(12):e115914.
- Rudzianskas V, Juozaityte E, Inciura A, Vaitkus S, Padervinskis E, Jurkiene N, Saltonaite L, Suipyte J: Galvos ir kaklo navikų spindulinė terapija: taikinio tūrio apibrėžimo rekomendacijos, taikant trimatę konforminę ir moduliuojamo intensyvumo spindulinę terapiją: Kaunas: Kauko laiptai; 2015.
- 4. Goon P, Sonnex C, Jani P, Stanley M, Sudhoff H: Reccurent respiratory papillomatosis: an overview of current thinking and treatment. Eur Arch Otorhinolaryngol 2008, 265:147–151.
- 5. Campisi P, Hawkes M, Simpson K: The epidemiology of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis derived from a population level national database. Laryngoscope 2010, 120:1233–1245.
- 6. Larson DA, Derkay CS: Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. APMIS 2010, 118(450–454).
- 7. Silverman DA, Pitman MJ: Current diagnostic and management trends for recurrent respiratory papillomatosis. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2004, 12:532-537.
- 8. Katsenos S, Becker HD: Recurrent respiratory papillomatosis: a rare chronic disease, difficult to treat, with potential to lung cancer transformation: apropos of two cases and a brief literature review. Case Rep Oncol 2011, 4:162-171.
- 9. Avelino MAG, Gutzman RL, Fujita RR, Pignatari S, Weckx LLM, Pontes P: Cidofovir effects on recurrent laryngeal papillomatosis in children: preliminary report. Rev Bras Otorrinolaringol 2004, 70: 734-8.
- 10. Kelly Ugarte LR, Munoz-San Julian C: Laryngeal papillomatosis. Anesthesiology 2014, 121(5):1092.
- 11. Gelinas JF, Manoukian J, Cote A: Lung involvement in juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review of the literature. Int J Pediatr Otorhi 2008, 72:433-452.
- 12. Uloza V: The course of laryngeal papillomatosis treated by endolaryngeal microsurgery. Eur Arch Otorhinolaryngol 2000, 257:498–501.

- 13. Hobbs CGL, Birchall MA: Human papillomavirus infection in the etiology of laryngeal carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg 2004, 12:88–92.
- 14. Derkay C: Task force on Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995, (121, 1386-91).
- 15. Lin HW, Richmon JD, Emerick KS, de Venecia RK, Zeitels SM, Faquin WC, Lin DT: Malignant transformation of a highly aggressive human papillomavirus type 11-associated recurrent respiratory papillomatosis. Am J Otolaryngol 2010, 31:291–296.
- 16. Carifi M, Napolitano D, Morandi M, Dall'Olio D: Recurrent respiratory papillomatosis: current and future perspectives. Ther Clin Risk Manag 2015, 11:731-738.
- Ying XJ, Jin B, Chen XW, Xie J, Xu HM, Dong P: Oxymatrine downregulates HPV16E7 expression and inhibits cell proliferation in laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells in vitro. Biomed Res Int 2015, 2015:150390.
- Easty DM, Easty GC, Baici A, Carter RL, Cederholm-Williams SA, Felix H, Gusterson B, Haemmerli G, Hauser-Urfer I, Heizmann CW: Biological studies of ten human squamous carcinoma cell lines: an overview. Eur J Cancer Clin Oncol 1986, 22(6):617-634.
- 19. Sano D, Fooshee DR, Zhao M, Andrews GA, Frederick MJ, Galer C, Milas ZL, Morrow PK, Myers JN: Targeted molecular therapy of head and neck squamous cell carcinoma with the tyrosine kinase inhibitor vandetanib in a mouse model. Head Neck 2011, 33(3):349-358.
- 20. Ahn J, Bishop JA, Akpeng B, Pai SI, Best SR: Xenograft model for therapeutic drug testing in recurrent respiratory papillomatosis. Ann Otol Rhinol Laryngo 2015, 124(2):110-5.
- 21. Gallagher TQ, Derkay CS: Recurrent respiratory papillomatosis: update 2008. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2008, 16:536–542.
- 22. Adebola SO, Dunmade AD: Impediments to clinical diagnosis and management of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis inIlorin, Nigeria. OJPed 2013, 3:127-132.
- 23. Mendenhall WM, Takes RP, Shah JP, Bradley PJ, Beitler JJ, Strojan P, Suarez C, Rodrigo JP, Saba NF, Rinaldo A, Werner JA, Ferlito A: Current treatment of T1N0 squamous cell carcinoma of the glottic larynx. Eur Arch Otorhinolaryngol 2015, 272(8):1821-1824.
- 24. Aaltonen LM: Laryngeal human papillomavirus infection. 1999; http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.375.9181&re p=rep1&type=pdf



- 25. Aaltonen LM, Hiltunen-Back E, Paavonen J: Papilloma viruses on the mucous membranes. Duodecim 2002, 118(13):1388-1396.
- 26. Aaltonen LM, Rihkanen H, Vaheri A: Human papillomavirus in larynx. Laryngoscope 2002, 112(4):700-707.
- 27. Uloza V, Kuzminiene A, Salomskaite-Davalgiene S, Palubinskiene J, Balnyte I, Uloziene I, Saferis V, Valanciute A: Effect of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Tissue Implantation on the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane: Morphometric Measurements and Vascularity. Biomed Res Int 2015, 2015:629754.
- 28. Ahn J, Bishop JA, Akpeng B, Pai SI, Best SR: Xenograft model for therapeutic drug testing in recurrent respiratory papillomatosis. Ann Otol Rhinol Laryngol 2015, 124(2):110-115.
- 29. Chhetri DK, Jahan-Parwar B, Hart SD, Bhuta SM, Berke GS, Shapiro NL: Local and systemic effects of intralaryngeal injection of cidofovir in a canine model. Laryngoscope 2003, 113(11):1922-1926.
- 30. Jahan-Parwar B, Chhetri DK, Hart S, Bhuta S, Berke GS: Development of a canine model for recurrent respiratory papillomatosis. Ann Otol Rhinol Laryngol 2003, 112(12):1011-1013.
- Hu J, Cladel NM, Budgeon LR, Christensen ND: Characterization of three rabbit oral papillomavirus oncogenes. Virology 2004, 325(1):48-55.
- 32. Hu J, Peng X, Cladel NM, Pickel MD, Christensen ND: Large cutaneous rabbit papillomas that persist during cyclosporin A treatment can regress spontaneously after cessation of immunosuppression. J Gen Virol 2005, 86(Pt 1):55-63.
- 33. Ribatti D: The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. Exp Cell Res 2014, .
- 34. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A: The history of the angiogenic switch concept . Leukemia 2007, 21:44–52.
- 35. Ribatti D.: *The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of angiogenesis and metastasis.* : 41-43.: London: Springer Science + Business Media B. V.; 2010.
- 36. Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML: The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. Angiogenesis 2014, 17(4):779-804.
- Menach OP, Patel A, Oburra HO: Demography and histologic pattern of laryngeal squamous cell carcinoma in kenya. Int J Otolaryngol 2014, 2014:507189.
- 38. Laryngeal (larynx) cancer incidence statistics. <u>http://www.cancerresear</u> <u>chuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-</u> <u>type/laryngeal-cancer/incidence#heading-Zero</u>

- 39. Gelinas JF, Manoukian J, Cote A: Lung involvement in juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis: a systematic review of the literature. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2008, 72(4):433-452.
- 40. Li X, Gao L, Li H, Gao J, Yang Y, Zhou F, Gao C, Li M, Jin Q: Human papillomavirus infection and laryngeal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. J Infect Dis 2013, 207(3):479-488.
- 41. Laryngeal and hypopharyngeal cancer. <u>http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003108-pdf.pdf</u>
- 42. Wenig BM: Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: precursors and problematic variants. Mod Pathol 2002, 15(3):229-254.
- 43. Wenig BM: *Atlas of Head and Neck pathology:* Third ed. China: Elsevier Health Sciences; 2015.
- 44. Gale N, Michaels L, Luzar B, Poljak M, Zidar N, Fischinger J, Cardesa A: Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. Histopathology 2009, 54(6):639-656.
- 45. Jogi A, Vaapil M, Johansson M, Pahlman S: Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. Ups J Med Sci 2012, 117(2):217-224.
- 46. Laitakari J, Nayha V, Stenback F: Size, shape, structure, and direction of angiogenesis in laryngeal tumour development. J Clin Pathol 2004, 57(4):394-401.
- 47. Tae K, Naggar EAK, Yoo E, Feng L, Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Shin DM: Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. Clin Cancer Res 2000, 6(7):2821-8.
- 48. Tse GM, Chan AW, Yu KH, King AD, Wong KT, Chen GG, Tsang RK, Chan AB: Strong immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor predicts overall survival in head and neck squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol 2007, 14(12):3558-3565.
- 49. Bonhin RG, Rocha VB, de Carvalho GM, Guimaraes AC, Crespo AN, Chone CT, Amstalden EM: Correlation between vascular endothelial growth factor expression and presence of lymph node metastasis in advanced squamous cell carcinoma of the larynx. Braz J Otorhinolaryngol 2015, 81(1):58-62.
- 50. Lukits J, Timar J, Juhasz A, Dome B, Paku S, Repassy G: Progression difference between cancers of the larynx and hypopharynx is not due to tumor size and vascularization. Otolaryngol Head Neck Surg 2001, 125(1):18-22.
- 51. Xue Q, Wang H, Wang J: Recurrent respiratory papillomatosis: an overview. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010, 29:1051–1054.



- Bonagura VR, Hatam LJ, Rosenthal DW, de Voti JA, Lam F, Steinberg BM, Abramson AL: Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11. APMIS 2010, 118(6-7):455-470.
- 53. Schraff S, Derkay CS, Burke B, Lawson L: American Society of Pediatric Otolaryngology members' experience with recurrent respiratory papillomatosis and the use of adjuvant therapy. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2004, 130(9):1039-1042.
- 54. Aggunlu L, Erbas G: Recurrent respiratory papillomatosis with lung involvement. Diagn Interv Radiol 2009, 15(2):93-95.
- 55. Ruan SY, Chen KY, Yang PC: Recurrent respiratory papillomatosis with pulmonary involvement: a case report and review of the literature. Respirology 2009, 14(1):137-140.
- 56. Shiau EL, Li MF, Hsu JH, Wu MT: Recurrent respiratory papillomatosis with lung involvement and malignant transformation. Thorax 2014, 69(3):302-303.
- 57. Soldatski IL, Onufrieva EK, Steklov AM, Schepin NV: Tracheal, bronchial, and pulmonary papillomatosis in children. Laryngoscope 2005, 115(10):1848-1854.
- Tatci E, Gokcek A, Unsal E, Cimen F, Demirag F, Yazici S, Ozmen O: FDG PET/CT Findings of Recurrent Respiratory Papillomatosis With Malignant Degeneration in the Lung. Clin Nucl Med 2015, 40(10):802-804.
- 59. Kramer SS, Wehunt WD, Stocker JT, Kashima H: Pulmonary manifestations of juvenile laryngotracheal papillomatosis. AJR Am J Roentgenol 1985, 144(4):687-694.
- 60. Abe K., Tanaka Y., Takahashi M., Kosuda S., Hayashi K., Tanabe T., Iwasaki Y., Aida S., Kawauchi T., Yamamoto M., Kita T., Kaji T.: Pulmonary spread of laryngeal papillomatosis: radiological findings. Radiat Med 2006, 24:297-301.
- 61. Schlatter P, Konig MF, Karlsson LM, Burri PH: Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo. Microvasc Res 1997, 54(1):65-73.
- 62. Ribatti D, Vacca A, Gasparini G, Loverro G, Divagno G, Iurlaro M, Lotesoriere C, Roncali L, Selvaggi L: Endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma induce a vasoproliferative response in the chick embryo chorioallantoic membrane. Int J Oncol 1996, 8(6):1149-1153.
- 63. Gabrielli MG, Accili D: The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transportelial ion transport and barrier function during embryonic development. J Biomed Biotechnol 2010, 2010:940741.

- 64. Borges J, Tegtmeier FT, Padron NT, Mueller MC, Lang EM, Stark GB: Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. Tissue Eng 2003, 9:441-50.
- 65. Luttun A, Carmeliet P: De novo vasculogenesis in the heart. Cardiovasc Res 2003, 58(2):378-389.
- 66. Verhoelst E: Sructural analysis of the angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. 2011; https://lirias.kuleuven.be/bitstream/123456789/293316/1/doctoraatsteks t+Eva+Verhoelst.pdf
- 67. Romanoff AL: The extraembryonic membranes. In: The avian embryo: Structural and functional development: New York: MacMillan; 1960.
- 68. Deryugina EI, Quigley JP: Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. Histochem Cell Biol 2008, 130:1119-1130.
- 69. Deryugina EI, Quigley JP: CHAPTER TWO: Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Models to Quantify Angiogenesis Induced by Inflammatory and Tumor Cells or Purified Effector Molecules. Methods Enzymol 2008, 444:21–41.
- 70. Vargas A, Zeisser-Labouebe M, Lange N, Gurny R, Delie F: The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. Adv Drug Deliv Rev 2007, 59: 1162-1176.
- 71. Dėl laboratorinių gyvūnų naudojimo moksliniams bandymams, 2007; https://www.e-

tar.lt/acc/legalAct.html?documentId=TAR.8BEA5116A1B8

- 72. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK: DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature 1976, 260(5547):170-173.
- 73. Vergara MN, Canto-Soler MV: Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. Neural Dev 2012, 7:22-8104-7-22.
- 74. Temin HM: The Participation of Dna in Rous Sarcoma Virus Production. Virology 1964, 23:486-494.
- 75. Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, Folkman J: Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo. Br J Cancer 1977, 35:347-356.
- 76. Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J: Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Am. J. Pathol 1975, 79:597-610.
- 77. Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, Folkman J: Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. Br J Cancer 1977, 35(3):347-356.



- 78. Marzullo A, Vacca A, Roncali L, Pollice L, Ribatti D: Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: an experimental study in the chick embryo chorioallantoic membrane. Int J Oncol 1998, 13(1):17-21.
- 79. Russ JC, Dehoff RT: *Practical stereology:* New York: Plenum Press; 2001.
- 80. Ribati D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F: The chick embryo chorioalantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. Int J Dev Biol 1996, 40:1189-1197.
- 81. Hoffman RM: Fluorescent angiogenesis models using gelfoam(R) implanted in transgenic mice expressing fluorescent proteins. Methods Mol Biol 2014, 1135:213-222.
- Scarpatetti M, Tsybrovskyy O, Popper HH: Cytokeratin typing as an aid in the differential diagnosis of primary versus metastatic lung carcinomas, and comparison with normal lung. Virchows Arch 2002, 440(1):70-76.
- 83. Full specifications for Ki 67 Rabbit Monoclonal Antibody Rabbit Monoclonal Antibody. http://www.thermoscientific.com/en/product/ki-67-rabbit-monoclonal-antibody.html
- 84. Strojnik T, Kavalar R, Barone TA, Plunkett RJ: Experimental model and Immunohistochemical comparison of U87 human glioblastoma cell xenografts on the chicken chorioallantoic membrane and in rat brains. Anticancer Res 2010, 30:4851-60.
- 85. PCNA proliferating cell nuclear antigen *Homo sapiens* (human). 2015. http://www.uniprot.org/uniprot/P12004
- 86. Cushman RA, Wahl CM, Fortune JE: Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. Hum Reprod 2002, 17:48-54.
- 87. American Joint Committee on Cancer: *AJCC Cancer Staging Manual:* 7th ed. ed. New York, NY: Springer; 2010.
- Markou K, Christoforidou A, Karasmanis I, Tsiropoulos G, Triaridis S, Constantinidis I, Vital V, Nikolaou A: Laryngeal cancer: epidermiological data from Nuorthern Greece and review of the literature. Hippokratia 2013, 17(4):313-318.
- 89. Correia S, Dionisio J, da Costa JD: Recurrent respiratory papillomatosis of the airway: The experience of an endoscopic unit. Rev Port Pneumol (2006) 2015, 21(2):82-89.
- 90. Verguts MM, Genbrugge E, de Jong FI: Treatment results in adultonset recurrent respiratory papillomatosis. B-ENT 2009, 5(3):137-141.
- 91. Martowicz A, Kern J, Gunsilius E, Untergasser G: Establishment of a human multiple myeloma xenograft model in the chicken to study

tumor growth, invasion and angiogenesis. J Vis Exp 2015, (99):e52665. doi(99):e52665.

- 92. Ribatti D, Nico B, Cimpean AM, Raica M, Crivellato E, Ruggieri S, Vacca A: B16-F10 melanoma cells contribute to the new formation of blood vessels in the chick embryo chorioallantoic membrane through vasculogenic mimicry. Clin Exp Med 2013, 13(2):143-147.
- 93. Ribatti D, Nico B, Pezzolo A, Vacca A, Meazza R, Cinti R, Carlini B, Parodi F, Pistoia V, Corrias MV: Angiogenesis in a human neuroblastoma xenograft model: mechanisms and inhibition by tumourderived interferon-gamma. Br J Cancer 2006, 94(12):1845-1852.
- 94. Balciuniene N, Tamasauskas A, Valanciute A, Deltuva V, Vaitiekaitis G, Gudinaviciene I, Weis J, von Keyserlingk DG: Histology of human glioblastoma transplanted on chicken chorioallantoic membrane. Medicina (Kaunas) 2009, 45(2):123-131.
- 95. Sys G, Van Bockstal M, Forsyth R, Balke M, Poffyn B, Uyttendaele D, Bracke M, De Wever O: Tumor grafts derived from sarcoma patients retain tumor morphology, viability, and invasion potential and indicate disease outcomes in the chick chorioallantoic membrane model. Cancer Lett 2012, 326(1):69-78.
- 96. de Bono JS, Ashworth A: Translating cancer research into targeted therapeutics. Nature 2010, 467(7315):543-549.
- Balke M, Neumann A, Kersting C, Agelopoulos K, Gebert C, Gosheger G, Buerger H, Hagedorn M: Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. BMC Research Notes 2010, 3(1):58.
- Malik E, Meyhofer-Malik A, Berg C, Bohm W, Kunzi-Rapp K, Diedrich K, Ruck A: Fluorescence diagnosis on the chorioallantoic membrane usin 5-aminolaevulinic acid. Human Reproduction 2000, 15:584-588.
- 99. Petruzzelli GJ, Snyderman CH, Johnson JT, Myers EN: Angiogenesis induced by head and neck squamous cell carcinoma xenografts in the chick embryo chorioallantoic membrane model. Ann Otol Rhinol Laryngol 1993, 102:215-21.
- 100. Xiao X, Zhou X, Ming H, Zhang J, Huang G, Zhang Z, Li P: Chick Chorioallantoic Membrane Assay: A 3D Animal Model for Study of Human Nasopharyngeal Carcinoma. PLoS One 2015, 10(6): e0130935.
- 101. Lucarelli E, Sangiorgi L, Benassi S, Donati D, Gobbi GA, Picci P, Vacca A, Ribatti D: Angiogenesis in lipoma: An experimental study in the chick embryo chorioallantoic membrane. Int J Mol Med 1999, 4(6):593-596.
  - 97

- 102. Isachenko V, Mallmann P, Petrunkina AM, Rahimi G, Nawroth F, Hancke K, Felberbaum R, Genze F, Damjanoski I, Isachenko E: Comparison of in vitro- and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue. PLoS One 2012, 7(3):e32549.
- 103. Baum O, Suter F, Gerber B, Tschanz SA, Buergy R, Blank F, Hlushchuk R, Djonov V: VEGF-A promotes intussusceptive angiogenesis in the developing chicken chorioallantoic membrane. Microcirculation 2010, 17(6):447-457.
- 104. Wilting J, Christ B, Weich HA: The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF<sub>165</sub> and PDGF-BB. Anat Embryol 1992, 186:251-37.
- 105. Michaels L, Henrik B: Ear, Nose and Throat Histopathology: second edition ed. Hellquist; 2001.
- 106. Petruzzelli GJ: Tumor angiogenesis. Head Neck 1996, 18(3):283-91.
- 107. Liu M, Scanlon CS, Banerjee R, Russo N, Inglehart RC, Willis AL, Weiss SJ, D'Silva NJ: The Histone Methyltransferase EZH2 Mediates Tumor Progression on the Chick Chorioallantoic Membrane Assay, a Novel Model of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Transl Oncol 2013, 6(3):273-281.
- 108. Dos Reis HL, Rabelo PC, de Santana MR, Ferreira DC, Filho AC: Oral squamous papilloma and condyloma acuminatum as manifestations of buccal-genital infection by human papillomavirus. Indian J Sex Transm Dis 2009, 30(1):40-42.
- 109. Akter T, Tabassum S, Jahan M, Nessa A, Islam MN, Giasuddin M: Isolation of herpes simplex viruses by chick embryo culture. Mymensingh Med J 2013, 22(2):365-369.
- 110. Valdes TI, Kreutzer D, Moussy F: The chick chorioallantoic membrane as a novel *in vivo* model for the testing of biomaterials. J Biomed Mater Res A 2002, 62:273-282.
- 111. Xiao X, Zhou X, Ming H, Zhang J, Huang G, Zhang Z, Li P: Chick Chorioallantoic Membrane Assay: A 3D Animal Model for Study of Human Nasopharyngeal Carcinoma. PLoS ONE 2015, 10(6): e0130935.
- 112. Subauste MC, Kupriyanova TA, Conn EM, Ardi VC, Quigley JP, Deryugina EI: Evaluation of metastatic and angiogenic potentials of human colon carcinoma cells in chick embryo model systems. Clin Exp Metastasis 2009, 26:1033-1047.
- 113. Pink DB, Schulte W, Parseghian MH, Zijlstra A, Lewis JD: Real-time visualization and quantitation of vascular permeability in vivo: implications for drug delivery. PLoS One 2012, 7(3):e33760.

- 114. Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, Klein-Szanto A, Litwin S, Herlyn M: Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. Clin Cancer Res 1999, 5:775.
- 115. Lokman NA, Elder AS, Ricciardelli C, Oehler MK: Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. Int J Mol Sci 2012, 13(8):9959-9970.
- 116. Klingenberg M, Becker J, Eberth S, Kube D, Wilting J: The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma. BMC Cancer 2014, 14:339-2407-14-339.
- 117. Kalirai H, Shahidipour H, Coupland SE, Luyten GPM: Use of the Chick Embryo Model in Uveal Melanoma. Ocul Oncol Pathol 2015, 1:133–140.
- 118. Yuan JH, Gao JS, Zhan ZF, Liu HW, Jin WJ, Li ZD: Developmentpromoting effect of chicken embryo membrane on chicken ovarian cortical pieces of different age. Poult Sci 2009, 88(11):2415-2421.
- 119. Brand M, Lamande N, Larger E, Corvol P, Gasc JM: Angiotensinogen impairs angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. J Mol Med (Berl) 2007, 85(5):451-460.
- 120. Ruoslahti E: How cancer spreads. Sci Am 1996, 275(3):72-7.

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

## Straipsniai leidiniuose, referuojamuose Mokslinės informacijos instituto duomenų bazėje ir turinčiuose citavimo rodiklį:

1. Uloza V, Kuzminienė A, Šalomskaitė-Davalgienė S, Palubinskienė J, Balnytė I, Ulozienė I, Šaferis V, Valančiūtė A. Effect of laryngeal squamous cell carcinoma tissue implantation on the chick embryo chorioallantoic membrane: morphometric measurements and vascularity. BioMed research international. 2015;1-10. (IF: 1.579).

# Straipsniai recenzuojamuose mokslo leidiniuose, referuojamuose kitose duomenų bazėse:

 Kuzminienė A, Šalomskaitė-Davalgienė S, Balnytė I, Palubinskienė J, Valančiūtė A, Uloza V. Evaluation of the chicken embryo chorioallantoic membrane model for laryngeal tumor transplantation. Papers in anthropology: 6th Baltic Conference of Morphology in Tartu. 2011, 20:229-240.

## Konferencijų tezės:

- Kuzminienė A, Uloza V, Valančiūtė A, Balnytė I, Šalomskaitė-Davalgienė S, Palubinskienė J, Ulozienė I. Chick embryo chorioallantoic membrane laryngeal squamous cell carcinoma model to quantify tumor growth and angiogenesis. 3rd Polish-Lithuanian ENT Congress (3rd POLLIT ENT). Mokslinės tezės. Augustów, Poland. September 24-26, 2015. 4:1-1.
- Kuzminienė A, Uloza V, Valančiūtė A, Palubinskienė J, Šalomskaitė-Davalgienė S, Balnytė I. Gerklų papilomatozės morfologinės išraiškos viščiuko embriono chorioalantojinėje membranoje. VIII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija "Mokslas – sveikatai". Kaunas, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. Balandžio 07 d., 2015:20-21.
- 3. Uloza V, Kuzminienė A, Ulozienė I, Valančiūtė A, Balnytė I, Šalomskaitė-Davalgienė S, Palubinskienė J. Histomorphometric analysis and vascularity of the chick embryo chorioallantoic membraine after laryngeal squamous cell carcinoma tumor tissue transplantation. 3rd Congress of European ORL-HNS: 6th Czech-Slovak Congress of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery 77th Congress of the Czech Society of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery 62nd Congress of the Slovak Society of Otorhinolaryngology and Head

and Neck Surgery. Mokslinės tezės. Prague, Czech Republic. June 7-11, 2015. P-516:166.

- Kuzminienė A, Uloza V, Valančiūtė A, Palubinskienė J, Šalomskaitė-Davalgienė S, Ulozienė I, Balnytė I. Gerklų plokščių ląstelių karcinomos morfologinės išraiškos viščiuko embriono chorioalantojinėje membranoje. VII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija "Mokslas – sveikatai". Kaunas, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas. Balandžio 09 d., 2014: 36-37, Nr. 4.
- Kuzminienė A, Uloza V, Valančiūtė A, Balnytė I, Šalomskaitė-Davalgienė S, Palubinskienė J, Ulozienė I. Morphometric measurements of the chick embryo chorioallantoic membraine affected by Laryngeal Squamous Cell Carcinoma tumor tissue transplantation. 6th Baltic ENT Congress. Mokslinės tezės. Kaunas, Lithuania. 22nd-24th May, 2014: 78.
- Kuzminienė A, Uloza V, Valančiūtė A, Balnytė I, Šalomskaitė-Davalgienė S, Palubinskienė J. Evaluation of Chichen embryo chorioallantoic membrane model for laryngeal squamous cell carcinoma transplantation. The 2nd Lithuanian Polish ENT Congress. Mokslinės tezės. Druskininkai, Lithuania. September 6-8, 2013:38.
- Kuzminienė A, Uloza V, Valančiūtė A, Balnytė I, Šalomskaitė-Davalgienė S, Palubinskienė J. Evaluation of chicken embryo chorioallantoic membrane model for laryngeal squamous cell carcinoma transplantation. Baltic Morphology VII Scientific Conference "Morphological Sciences in the Experimental and Clinical Medicine". Mokslniės tezės. Rīga, Latvia. November 7-9, 2013:21.
- Kuzminienė A, Šalomskaitė-Davalgienė S, Balnytė I, Palubinskienė J, Valančiūtė A, Uloza V. Morphological changes of chicken chorioallantoic membrane with different laryngeal tumor onplants. Anatomische Gesellschaft : 107th Annual Meeting. Mokslinės tezės. Frankfurt am Main, Germany. March 23 – 26, 2012: (Poster) P65.
- Kuzminienė A, Šalomskaitė-Davalgienė S, Balnytė I, Palubinskienė J, Valančiūtė A, Uloza V. Evaluation of chicken embryo chorioallantoic membrane model for laryngeal tumor transplantation. Baltic Morphology VI. Mokslinės tezės. Tartu, Estonia. September 22-23, 2011:37.

### **Kitos publikacijos:**

1. Pribuišienė R, Šarauskas V, Kuzminienė A, Uloza V. Correlation between throat-related symptoms and histological examination in adults with chronic tonsillitis. Medicina. 2015, 51(5):286-290.

2. Pribuišienė R, Kuzminienė A, Šarauskas V, Šaferis V, Pribuišis K, Rastenienė I. The Most important throat-related symptoms suggestive of chronic tonsillitis as the main indication for adult tonsillectomy. Medicina. 2013, 49(5):219-222.

## EVALUATION OF THE CHICKEN EMBRYO CHORIOALLANTOIC MEMBRANE MODEL FOR LARYNGEAL TUMOR TRANSPLANTATION

Alina Kuzminienė<sup>2</sup>, Sonata Šalomskaitė-Davalgienė<sup>1</sup>, Ingrida Balnyte<sup>1</sup>, Jolita Palubinskienė<sup>1</sup>, Angelija Valančiūtė<sup>1</sup>, Virgilijus Ulozas<sup>2</sup>

> <sup>1</sup> Department of Histology and Embryology <sup>2</sup> Department of Otorhinolaryngology, Lithuanian University of Health Sciences

### ABSTRACT

The laryngeal squamous cell carcinoma is the second common malignant tumor of the respiratory tract and together with recurrent respiratory papillomas represents the most common tumors of the larynx. Many experimental models are used to study the morphology of malignant tumors. The chicken chorioallantoic membrane (CAM) model is one of them. The CAM has all the nutrition needed for the piece of the transplanted tumor to survive. The aim of this study was to investigate whether the laryngeal papilloma and the laryngeal squamous cell carcinoma tissues transplanted on the chick CAM survive with their main histological features, and to determine the morphological changes of the CAM with different transplants. For the preparation of the CAM, fertilized hen eggs were put into an incubator for 3 days. Then the windows in the shell were opened. The fresh samples of tumors were transplanted on the CAM on the 7th day of incubation. After 3 days after transplantation the CAM with onplants were excised and fixed in the 10% formalin solution. Morphological changes in the control CAM and in the CAM with tumor onplants were observed using the digital camera on the OLYMPUS microscope. The results showed that the CAM with the laryngeal squamous cell carcinoma onplant was distinctly thicker than that of the control group and than the CAM with the papilloma onplant; the chorionic epithelium was thickened and appeared stratified of up to 5-6 layers and in some locations squamous keratinized; the mesenchymal cells were densely arranged under the tumor transplants. We observed that morphological changes in the thickness of the CAM and the chorionic epithelium were more obvious in the CAM under the

carcinoma transplants. After 72 hours of the tumor tissue transfer onto the membrane, the tumor cells retained their vitality and also their influence on the CAM tissues could be observed.

Key words: chorioallantoic membrane, chicken embryo, laryngeal squamous cell carcinoma, laryngeal papilloma.

### INTRODUCTION

Recurrent respiratory papillomas (RRP) represent the most common benign tumor of the larynx, in adults it constitutes about 10% of all the laryngeal tumors or about 87% of all the benign laryngeal tumors [19]. RRP manifest as mucosal, exophytic and benign neoplasms, usually consisting of irregular, multiple and cauliflower-like clusters, which have an intact basement membrane [11, 19]. The patients with RRP experience a different course of the disease. In some cases after the first presentation papillomatosis never recurs. Sometimes it presents with a mild course that recurs rarely. Others experience a severe disease causing outspread papillomas into the trachea and lungs with a possible lethal outcome [3, 9]. Moreover, RRP are associated with some risk (3– 12%) of malignant transformation [19]. It is known that human papilloma virus type 11-positive patients show a more frequent incidence of malignisation. The majority of the malignant lesions are laryngeal squamous cell carcinomas (LSCC) [3, 11].

Laryngeal cancer is the second most common cancer of the respiratory tract with an estimated incidence rate of 5.1/100,000 in males worldwide in the year 2008 [15]. The behavior of the tumor and the survival rate in LSSC patients are different. The 5-year overall survival ranges from 0 to 100%, depending on the T- and N- category, the management approach, the tumor location and comorbidities. It is discussed what conditions, tumor characteristics or certain treatment approaches are responsible for the higher survival rates [15].

Consequently, different research models and *in vivo* assays for studying the behavior of laryngeal papilloma and laryngeal cancer tumors are performed. The classical assays for studying angiogenesis *in vivo* include the rabbit ear chamber, the mouse dorsal skin and the air sac, the chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM), the iris and the avascular cornea of the rodent eye and the zebrafish [14]. The most

preferable these days are cottontail rabbit and nude mice models to investigate laryngeal papilloma and laryngeal cancer tumors [4, 5].

Nevertheless, the chicken embryo CAM is appropriate and a wellestablished model to study the behavior of different tumors [1, 2, 8], laryngeal as well. It offers the advantage of being a well vascularized and easily accessible medium, which serves as a gas and nourishment exchange surface. The main advantage of the CAM is quick, economical and a good matrix for the screening of the tumor growth [2, 14, 18]. The system of the CAM provides the cells with an approximately physiological support of nutrients, cytokines, hormones and vascularization as the natural tissue site [1, 8].

The aim of this study was to investigate whether the laryngeal papilloma and laryngeal squamous cell carcinoma tissues transplanted on the chick CAM survive with their main histological features, and to determine the morphological changes of the CAM with different transplants.

### MATERIALS AND METHODS

Tissue samples. Fresh laryngeal papillomas (two cases) and two LSCC tissue samples were obtained from the operated patients in the Lithuanian University of Health Sciences Kaunas Clinic. These patients had clinical, histological and/or radiological diagnosis of laryngeal papillomatosis or LSSC. The fresh tumor tissue samples were carried to the laboratory in the isotonic saline solution. They were transplanted onto the chicken CAM in the period of 160 to 168 hours of the egg incubation within 45–60 minutes after the samples were obtained.

#### Chorioallantoic membrane model

Fertilized hen eggs (*Cobb-500*) were obtained from local the hatchery (Dovainoniu paukstynas, Lithuania) and kept in an incubator at 37.7°C and 59–60% humidity, with continuous ventilation and while being rotated to and fro. On the third embryonic day (approximately 72 hours of incubation) 20 eggs' shells for each experimental line were sterilized with the 70% ethanol solution and the air chamber was punctured. After drilling the shells with a high speed drill above the yolk with embryo, the oval windows of about 1 cm<sup>2</sup> on the top of the shells were opened and covered with a transparent sterile tape to prevent dehydration and to

permit the observation of embryos. Then eggs were placed back into the incubator without rotation. On the 7<sup>th</sup> day of incubation the tumor tissue obtained directly from the operation theatre was sliced into approximately 1x2x2 mm pieces and each piece of tumor was transplanted onto the CAM, which was gently traumatized by laying a sterile strip onto the surface of the epithelium and then removing it immediately. After 72 hours after transplantation 2 to 4 eggs were opened. Embryos, if alive, were live-fixed in the 4% formalin solution. The CAMs with the adhering tumor were excised and fixed in the 10% formalin. The eggs incubated under the same conditions and the embryos processed according to the same protocol but without tumor onplants served as controls. After fixation a piece of the CAM with the tumor tissue was cut and embedded into paraffin, sliced 5µm thick and stained with hematoxylin and eosin.

Histological slides were evaluated histologically, and the morphometrical determination of changes in the CAM and the chorionic epithelium thickness was performed using the digital camera on the OLYMPUS microscope and the CellSense Dimentions softwear.

#### Statistical analysis

Data are given as means  $\pm$ SD and were analyzed with the MS Excell and SPSS software. The normal distribution of parametrical variables was tested using the Student's *t* test. Results were considered significant at p<0.05.

### RESULTS

Different types of laryngeal tumors were tested on the chicken CAM. The tumor tissue vitality was evaluated in the histological slides by observing the cells with nuclei and the appearance of the cytoplasm. After 72 hours of the tumor tissue transfer onto the membrane, the tumor cells retained their vitality and also their influence on the CAM tissues could be observed.

#### Tumor tissue histology

The papilloma consisted of multiple fragile clumps, with a thin and well-vascularized connective tissue core, a thick stratified squamous

<sup>106</sup> 

epithelium and a continuous basement membrane. The underlying connective tissue had several mononuclear cells. We observed the mentioned structures in the tumor onplants after 72 hours of transplantation, but the mononuclear cells were located among the epithelial cells, close to the CAM and the tissue sample interface. Some loss of intercellular junctions in the papilloma epithelium, which may also be responsible for the tissue fragility, was observed as well. The fragility of the papilloma tissue could cause the detachment of the onplant from the CAM thus papilloma tissue pieces did not adhere to the CAM several times and were lost during the experiments.

The carcinomas consisted of the solid pieces of polymorphous atypical squamous epithelial cells with a large nucleus, prominent one or several nucleoli, abundant acidophilic cytoplasm. The transferred carcinoma tissue samples on the CAM never flowed away and firmly adhered to the membrane.

### Morphological characteristics of CAM

The CAM under the onplanted carcinoma tissue was thickened due to the thickening of the chorionic epithelium and the mesenchymal layer under it. The chorionic epithelium was thickened and it appeared stratified of up to 5–6 layers and in some locations squamous keratinized (Figure 1 a, b). The thickness of the chorionic epithelium under carcinoma and papilloma onplants was  $43.5\pm20.2$  µm and  $15.3\pm9.7$  µm, in the neighboring sites –  $30.9\pm12.7$  µm and  $8.9\pm2.6$  µm, respectively; and even in distant from tumor sites the chorionic epithelium differed from the control CAM epithelium (p<0.005). In our investigation the control CAM epithelium thickness on day 10 was  $5.14\pm0.79$ µm.

The thickness of the CAM under the tumor onplants of carcinoma and papilloma was 696.6±92.9  $\mu$ m and 50.9±3.9  $\mu$ m, at the neighboring sites 429.1±125.4  $\mu$ m and 51.7±7.1  $\mu$ m, respectively, p<0.005. The thickness of the CAM under the papilloma onplants did not differ significantly from the control CAM, but they were thicker in the neighboring and distant sites from the onplants (p<0.005, Figure 2).

234 A. Kuzminienė et. al.



Figure 1. Densely arranged mesenchymal cells (a) and the thickened chorionic epithelium (b) of the CAM with LSCC onplant. The control CAM and its epithelium (c, d). Cells of LSCC (e) and papilloma (f) posses nuclei and vary in size and shape, i.e., retained their vitality after 72 hours of transplantation. a, c - scale bar 200 µm, original magnification 4x; b, d, e, f – scale bar 50 µm, original magnification 10x.

108


Figure 2. The thickness of the chorioallantoic membrane (CAM) with the onplants of laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and papilloma (\*p<0.005 compared to the control CAM).

The capillary network under the chorionic epithelium in the onplanted tumor region (both carcinomas and papillomas) was very rarely distributed, but in the distant sites it appeared normally dense. The large vessels appeared similarly distributed in the experimental and the control CAMs.

We noticed the difference in the arrangement of the CAM mesenchymal cells under the tumor onplants. The mesenchymal cells were densely arranged in the CAM situated under the transplanted papilloma tissue and in the neighboring sites, but in the distant locations did not differ from the control CAM mesenchyme density. Under the carcinoma onplants the mesenchyme was both loosely and densely arranged (see Figure 1a), but in distant from tumor sites it did not differ from the control.

#### DISCUSSION

A biological model that reflects the physiologic conditions of a solid tumor is needed for effective investigations in the cancer research. Three-dimensional in vitro models include cultured biopsies, and multilayer cultures such as cell clusters and spheroids [10].

The chick chorioallantoic membrane is a very simple extraembryonic membrane which consists of the chorionic epithelium (of ectodermal origin), the mesenchymal layer with capillaries and larger blood vessels

and the allantoic epithelium (of endodermal origin), facing the allantois cavity. By the 10<sup>th</sup> day of incubation, the CAM comprises the fully developed capillary plexus. Having a rich capillary network just under the chorionic epithelium surface, it provides the developing embryo with oxygen and calcium, and also has been employed as a model to characterize tumor growth because it can provide the transferred cells or onplanted tumor pieces necessary nutrients. The advantages of the chick embryo CAM model include the facts that: embryos can be obtained as pathogen free; until the 18<sup>th</sup> day of the incubation of tumor with host tissue is not complicated by the reactions of the host's immune system; the ability of tumor cells to traverse the chorionic epithelium and establish contact with the mesoderm beneath can be used as a convenient and easily scored end point for invasion [1].

In this series of experiments we tested a possibility to use a chicken CAM model for laryngeal tumor investigation. The results of this experiment show that both papilloma and carcinoma tumors may survive on the CAM and have an influence on the CAM itself (see Figure 1 e, f). The cells from tumor cell lines are easily transfected to the CAM, but their characteristics as tissue components are already changed, as they lack their natural interaction with one another and with other tissue components. We transplanted the pieces of tumors and observed their vitality after three days of transplantation. This shows that the CAM is able to provide enough nutrition to the tumor tissue that it remains alive. It is known that the local infiltration of the normal tissue by tumor cells and their dissemination to distant sites involve migration through the stroma of the connective tissue as well as the penetration of natural barriers, such as the basement membrane [13]. P.B. Amstrong (1982) noticed that the untraumatized chorionic epithelium is a nearly impenetrable barrier to the cells of invasive tumor lines [1]. Therefore it is very important if the CAM is damaged or not. The papilloma pieces had a tendency not to adhere to the CAM, while the pieces of carcinoma merely adhered to the CAM surface and by 72 hours already performed the influence on the CAM and induced morphological changes. A. Moscona (1959) described keratogenic metaplasia in the chorionic epithelium, which manifested itself by the alteration into the squamous stratified highly keratinized epithelium [12], but this metaplasia was due to the environmental exposure. We observed the keratogenic metaplasia in the chorionic epithelium just

beneath the onplanted carcinoma, but not the papilloma tissue pieces, and this was not observed in the control membranes or distant from the carcinoma onplant sites.

We observed the increased density of mesenchymal cells in the CAM below the tumor onplants. This may indicate that the growth stimuli, coming from the transplanted tumor tissue, can induce the proliferation and accumulation (or grouping) of mesenchymal cells. Although the thickness of the CAM was not much increased in the papilloma experiment, the increased density of mesenchymal cells was observed nearly in the whole thickness of the CAM under the papilloma onplant. We suppose that the increased density of mesenchyme cells and the thickening of the CAM and of the chorionic epithelium is the result of the CAM response to the factors coming from the onplanted tumors; and the differences in the changes of the CAMs with different tumors may depend upon the different behavior of benign and malignant tumors. Further more, each case is unique, and often the laryngeal cancer of the same differentiation and stage takes a completely different clinical progress route. That is why we could observe the different thickness of the CAM and the chorionic epithelium in carcinoma and papilloma experiments. Further investigations have to be performed to determine the factors which are derived from different tumors and their significance for the thickening of the CAM itself and for the thickening of the chorionic epithelium.

The CAM is a highly vascular extraembryonic membrane, which functions as an oxygen and calcium supplying structure; in the chicken embryo it initially appears on day 5 of incubation. From days 5 to 10, the CAM vessels progressively differentiate into capillaries, arterioles, and venules. The future capillaries' cells migrate to a position beneath the ectodermal layer of the CAM (the chorionic epithelium) and form a dense plexus of small vessels. On about day 7, the capillaries begin to migrate outward between the ectodermal cells [7]. According to the data of B.E. Dunn et al, on 10 days of incubation an electron-lucent squamous cell layer covers much of the chorionic epithelium. Intraepithelial capillaries are separated from the chorionic surface by a relatively thick (>5-µm) cytoplasmic layer [6].

Vascular network density in the CAM chorionic epithelium remains unchanged during the incubation. We did not notice an evident increase in the major or minor blood vessel density in the CAM in proximity of

the transplants – neither the papilloma, nor the LSCC tumor. On the contrary – this kind of carcinoma might have suppressed the appearance of new capillaries under it in the chorionic epithelium during the first 3 days of transplantation. This may also depend upon the tumor tissue expression of certain genes, which influence the new blood vessel formation and different types of cancers may express different factors; e.g. glioblastoma C6 line cells placed on the CAM in only one day attracted a dense network of blood vessels (our unpublished observation) as well as glioblastoma tissue pieces' onplants induced angiogenesis in the CAM [2].

The results of this investigation allow us to continue the research of different laryngeal tumors and to compare their invasiveness, their developmental behavior in longer experiments, the further influence on the changes of the CAM and its blood vessels. Perhaps it is not worth to prove once again that the intact epithelium is an impenetrable barrier for tumor invasion [1]. As not all papillomas gain a developmental character of a malignant tumor, it would be interesting to investigate the behavior of papilloma tumors and their invasiveness on the CAM, as well as to determine their relation to papilloma virus types, which may be responsible for recurrent laryngeal papillomatosis.

#### REFERENCES

- Amstrong P.B., Quigley J.P., Sidebottom E. (1982) Transepithelial invasion and intramesenchymal infiltration of the chick embryo chorioallantois by tumor cell lines. Cancer research, 42, 1826–1837.
- Balčiūnienė N., Tamašauskas A., Valančiūtė A., Deltuva V., Vaitiekaitis G., Gudinavičienė I., Weis J., Keyserlingk D. (2009) Histology of human glioblastoma transplanted on chicken chorioallantoic membrane. Medicina, 45, 2, 123–131.
- Bonagura V.R., Hatam L.J., Rosenthal D.W., DeVoti J.A., Lam F., Steinberg B.M., Abramson A.L. (2010) Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus- 6 and -11. APMIS, 118, 455–470.
- Christensen Neil D. (2005) Cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) model system to test antiviral and immunotherapeutic strategies. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 16, 283–294.
- Daisuke S., Myers Jeffrey N. (2009) Xenograft models of head and neck cancers. Head Neck Oncol, 1, 32.

- Dunn B.E., Fitzharris T.P. (1979) Differentiation of the chorionic epithelium of chick embryos maintained in shell-less culture. Dev Biol, 71, 2, 216–227.
- Gabrielli M.G., Accili D. (2010) The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. J Biomed Biotechnol, Article ID 940741, 1–12.
- Gronau S., Thess B., Riechelmann H., Fisher Y., Schmitt A., Schmitt M. (2006) An autologous system for culturing head and neck squamous cell carcinomas for the assessment of cellular therapies on the chorioallantois membrane. Eur Arch Otorhinolaryngol, 263, 308–312.
- Larson D.A., Derkay C.S. (2010) Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. APMIS, 118, 450–454.
- De Magalha<sup>~</sup>es N., Liaw L.H. L., Berns M. (2010) An instruction on the in vivo shell-less chorioallantoic membrane 3-dimensional tumor spheroid model. Cytotechnology 62, 279–283.
- Marchiori E., Cameron R. (2010) Recurrent respiratory papillomatosis with malignant transformation. Respirology, 15, 726–728.
- Moscona A. (1959) Squamous metaplasia and keratinization of chorionic epithelium of the chick embryo in egg and in culture. Dev Biol, 1, 1, 1–23.
- Ossowski L. (1988) In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound urokinase. The Journal of Cell Biology, 107, 6, 2437–2445.
- Ribatti D. (2010) The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo assay to study antiangiogenesis. Pharmaceuticals, 3, 482–513.
- Rudolph E., Dyckhoff G., Becher H., Dietz A., Ramroth H. (2010) Effects of tumor stage, comorbidity and therapy on survival of laryngeal cancer patients: a systematic review and a meta-analysis. Otolaryngol, 268, 165–179.
- Seidlitz E., Korbie D., Marien L., Richardson M., Singh G. (2004) Quantification of anti-angiogenesis using capillaries of the chick chorioallantoic membrane demonstrates that the effect of human angiostatin is age-dependent. Microvascular Research, 67, 105–116.
- Strojnik T., Kavalar R., Barone A.T., Plunkett R.J. (2010) Experimental model and immunohistochemical comparison of U87 human glioblastoma cell xenografts on the chicken chorioallantoic membrane and in rat brains. Anticancer Research, 30, 4851–4860.
- Teresevičiūtė N., Tamašauskas A., Valančiūtė A., Deltuva V., Graf von Keyserlingk D. (2007) Evaluation of morphological issues of central

nervous system glioblastoma on chicken embryo chorioallantoic membrane. Polish Journal of Veterinary Sciences, 10, 3, 173–178.

 Ulozas V., Liutkevičius V., Pangonytė D., Šaferis V., Lesauskaitė V. (2011) Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in recurrent respiratory papillomas and laryngeal carcinoma: clinical and morphological parallels. Otolaryngol, 10.1007/s00405-011-1494-1.

#### Address for correspondence:

Jolita Palubinskienė,

Lithuanian University of Health Sciences,

A. Mickevičiaus g. 9, Kaunas LT-44307, Lithuania,

E-mail: jolipalu@itc.kmu.lt



### Research Article

# Effect of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Tissue Implantation on the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane: Morphometric Measurements and Vascularity

#### Virgilijus Uloza,<sup>1</sup> Alina Kuzminienė,<sup>1</sup> Sonata Šalomskaitė-Davalgienė,<sup>2</sup> Jolita Palubinskienė,<sup>2</sup> Ingrida Balnytė,<sup>2</sup> Ingrida Ulozienė,<sup>1</sup> Viktoras Šaferis,<sup>3</sup> and Angelija Valančiūtė<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-50009 Kaunas, Lithuania
<sup>2</sup>Department of Histology and Embryology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-50009 Kaunas, Lithuania
<sup>3</sup>Department of Physics, Mathematics and Biophysics, Lithuanian University of Health Sciences, LT-50009 Kaunas, Lithuania

Correspondence should be addressed to Alina Kuzminiene; alinakuzminiene@gmail.com

Received 10 July 2015; Revised 9 September 2015; Accepted 10 September 2015

Academic Editor: Monica Cantile

Copyright © 2015 Virgilijus Ulota et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. The aim of this study was to develop chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model of laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and to evaluate the morphological and morphometric characteristics and angiogenic features of it. Methods. Fresh LSCC tissue samples obtained from 6 patients were implanted onto 15 chick embryo CAMs. Morphological, morphometric, and angiogenic changes in the CAM and chorionic epithelium were evaluated up to 4 days after the turnor implantation. Immunohistochemical analysis (34, $\beta$ E12, CD30, and Ki67 staining) was performed to detect cytokeratins and turnor endothelial cells and to evaluate the proliferative capacity of the turnor before and after implantation on the CAM. *Results*. The implanted LSCC tissue samples survived on the CAM in all the experiments and retained the essential morphologic characteristics and proliferative capacity of the original turnor. Implants induced thickening of both the CAM (103–417%, p = 0.0001) and the chorionic epithelium (70–140%, p = 0.0001) and increase in number of blood vessels (75–448%, p = 0.0001) in the CAM. *Conclusions*. This study clarifies that chick embryo CAM is a relevant assay for implanting LSCC tissue and provides the first morphological and morphometric characterization of the LSCC CAM model that copens new perspectives to study this disease.

#### 1. Introduction

Laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) is one of the most common malignant tumors of the respiratory tract with an estimated incidence rate of 10/100000 cases in males in Europe [1]. The overall 5-year survival of patients with this carcinoma localization in Europe was 63% in the period of 1995 to 2003. Despite the up-to-date treatment using advanced chemoradiation therapy and modern surgical techniques, the survival rate is not increasing remarkably within the last 30 years [1].

A better understanding of the biological mechanisms that control progression of LSCC would provide new and more successful strategies for tumor management. However, current *in vivo* models for human LSCC investigation do not simulate enough tumorigenic phenotypes of cancer and data about experimental evaluation of carcinogenesis, angiogenesis, and metastatic potential of LSCC in a live medium are insufficient [2, 3]. Therefore, we suggest establishing chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay for this type of tumor as a medium that reveals numerous unique properties and advantages [4, 5].

Because the chick embryo CAM model has been used for scientific purposes for decades, the system is quite well described in the literature and some evident benefits of the CAM assay are emphasized [6, 7]. The immatureness of the chick embryo immune system allows using different cell types and cells from different tissues and species. Consequently,

the chick embryo CAM assay is considered as simple, rapid, and cost effective, if compared with most in vivo models [4].

Therefore, we propose that the chick embryo CAM model can be successfully used to characterize LSCC morphology, invasion, angiogenic response *in vivo*, and metastatic properties. Remarkable proof is the evidence that the chick embryo CAM model has substantially contributed to several Nobel Prize laureates' scientific discoveries including the first known oncogene [8], neural growth factor based on effects of mouse tumor transplantation [9], and the interaction between tumor viruses and the genetic material of the cell [10].

The chick embryo develops 21 days until hatching out. The CAM is formed on days 4 to 5 of incubation as a consequence of fusion of mesodermal layers of outgrowing allantois and the chorion. The newly formed membrane is composed of chorionic and endodermal epithelia with an intricate plexus of arteries, veins, and capillaries. The highly vascularized nature of this assay is a considerable advantage which greatly stimulates the growth of the xenogeneic tumor and facilitates the analysis of angiogenic effect of implanted tumor on the CAM [11]. This feature determines the use of the CAM as a perfect medium for tumor implanting, studying carcinoma behavior and development. It is probably the most widely used *in vivo* assay for studying angiogenesis [4, 11, 12].

One of the greatest features of chick embryo CAM assay is an incomplete lymphoid system which is not fully developed until the late stages of incubation. The chick embryo may serve as a naturally immunodeficient host that is efficient for maintaining implanted tumor tissues without species-specific restrictions [11]. It is known that after the chick embryo becomes immunocompetent (the 18th day of incubation) both acute and chronic inflammatory responses of the CAM to biomaterials become similar to those of mammalian ones [4]. Data of the literature show that chick genes have a single human orthologue with an accuracy of about 60%. Chick and human orthologous genes reveal lower sequence conservation (75.3%) than rodent and human do (88%) [4]. Therefore, the avian model can be used for research in more fields of investigation compared to rodent ones. Moreover, no special permission from the Animal Rights Protection Committee is needed to perform the experimentation with chick embryo in both the European Union and USA. A great support to perform this type of investigation is approbation obtained from the US Food and Drug Administration and the Communication Department of the European Commission (2006) for the products that are preclinically evaluated using this assay [4].

Most of the avian experimental models such as human osteosarcoma, human colon carcinoma, and others used cells from the tumor cell lines implanted in the chick embryo CAM [11, 13, 14]. However, it can be presumed that this type of experiment while implanting cultivated tumor cells loses most of the natural physiological and histological features of the original tumor. Several *in vitro* models have been developed in the last few decades to investigate the oncogenic phenotypes of different malignant tumors. However, most of these models employed monolayer cell cultures, making these assays difficult to translate to clinical applications [6]. Following the experience obtained from glioblastoma tumor implantation on the chick embryo CAM [15], we suggested implanting fresh laryngeal tumor samples onto the chick embryo CAM [16], expecting that the tumor will retain its physiological properties and will show analogous behavior as in its natural environment. We demonstrated that fresh LSCC tissue samples remain viable with their main histological features up to 4 days after implantation onto the chick embryo CAM.

The aim of this study was to evaluate the morphological and morphometric characteristics and angiogenic features of the chick embryo CAM LSCC model. In this study, we used the chick embryo CAM for the first time to investigate the angiogenic effect of LSCC and to provide the morphometric characteristics of the CAM LSCC model. The implanted tumor induced considerable morphological changes of the CAM structures and demonstrated significant instigated vascularization of the bost membrane.

#### 2. Materials and Methods

2.1. Incubation and Egg Opening. Fertilized hen eggs (Cobb-500) were obtained from the local hatchery (Dovainonių Paukštymas, Lithuania) and were incubated at 37.7° C temperature and 59-60% relative humidity with permanent ventilation and rotation. On the third embryonic day (approximately 72 hours of incubation) eggs' shells were sterilized with 70% ethanol solution. The blunt part of the egg was punctured searching for the air chamber. Two milliliters of albumen was removed in order to set down the developing embryo. Then, an oval window of about 1.0 cm<sup>2</sup> on the top of the shell of each egg was opened using a high speed drill. All embryos were examined for possible malformations or signs of local bleeding. Those embryos that did not satisfy the study requirements were discarded.

In order to prevent embryos from dehydration and to capacitate the continuity of the experiment the shell windows were covered with transparent sterile tape. After this procedure, the prepared eggs were placed back into the incubator and kept under the same conditions without rotation for 4 to 6 days until implantation of the LSCC tissue.

2.2. LSCC Tissue Samples. Fresh LSCC tissue samples (N = 6) of at least about 0.5 × 1.0 × 0.5 cm in size were obtained from 6 patients at the Department of Otorhinolaryngology during laryngeal surgery. Diagnosis of the LSCC was proved at the Department of Pathology. The LSCC tissue samples were transported to the laboratory of the Department of Histology and Embryology in isotonic saline solution at ambient temperature (I8–20°C) and then implanted onto the chick embryo CAM within 45–60 minutes.

Investigations in the present study were performed in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki and approved by Kaunas Regional Bioethics Committee (PI-BE-2-34/2007). Histologically confirmed LSCC tissue samples were acquired in accordance with the protocol approved by the Institutional Review Board of LUHS. Written Informed Consent was obtained from the patients before

#### BioMed Research International

surgery and patients' identifiers were removed to ensure anonymity.

2.3. LSCC Tissue Implantation onto the CAM. LSCC implantation was performed on the 7th, 8th, or 9th day of eggs' incubation when the CAM is already formed. Each LSCC tissue sample obtained directly from the operating room was sliced into approximately 8 mm<sup>3</sup> pieces. Each piece of the tumor (1 piece per egg) was gently placed on the outer surface of the CAM near the biggest apparent vessel of the membrane, that is, using classical technique as it is described by Cushman et al. [17]. On the 11th day of eggs' incubation, that is, after 48, 72, and 96 hours of tumor implantation, two eggs were reopened and live-fixed in the 10% formalin solution. CAMs with the adhering tumors were excised and fixed in formalin for 5 days. Eight control CAMs were obtained on the 11th day from eggs that were incubated and proceeded under the same protocol, except the LSCC tissue implantation.

2.4. Tissue Sampling and Histology: Formalin-fixed and paraffin-embedded samples of approximately 0.5 × 2.5 cm in size from each CAM with LSCC implant were sliced into 3 μm thick sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological and morphometric evaluation. Histological evaluation of the samples was performed with the cold light microscope OLYMPUS BX40F4 (Olympus Optical Co. Ltd., Japan) under 10x magnification using CellSens Dimension 1.9 Digital Imaging Software for Research Applications (Olympus Corporation of the Americas, USA).

2.5 Immunohistochemistry. For immunohistochemical examination, the 3 µm thick slices of paraffin-embedded CAMs with LSCC implants as well as original tumor tissue slices were mounted on poly-L-lysine coated glass slides. After deparaffinization with xylene and rehydration the sections were pretreated with antigen-retrieval solution (0.01 mol/L of citrate buffer, pH 6) in a pressure-cooker and then incubated: (1) with cytokeratin monoclonal antibodies (clone 34ßE12, dilution 1:50) for identification of high molecular weight cytokeratin (HMW CK), because previous studies have shown squamous cell carcinomas being positive for these antibodies [18], (2) with monoclonal mouse anti-human CD31 (endothelial cell clone JC70A, dilution 1:40) for detection of vascular endothelial cells in tumor tissue [19, 20], and (3) with monoclonal mouse anti-human antibody for Ki67 (clone MIB-1, dilution 1:50) to identify nuclei of proliferating tumor cells [21].

All antibodies were purchased from Dako A/S (Glostrup, Denmark). Antibodies' detection using commercially available kit EnVision Plus-HRP, Dako A/S, was performed following the protocols of the provider. Sections were counterstained in weak Mayer's hematoxylin, dehydrated, cleared, and mounted for the light microscopy.

2.6. Histochemistry of Mesodermal CAM Vessels. For visualization of CAM blood vessels, paraffin-embedded tissue samples were sliced in 3 μm thick slices and mounted on poly-L-lysine coated glass slides. Sections were rehydrated as previously described and pretreated with streptavidin/biotin blocking kit (Vector, USA). In order to highlight endothelium of blood vessels in chick embryo CAM, slices were stained with 10 µg/mL biotinylated Sambucus nigra bark lectin (Vector, USA) [22]. The VECTASTAIN Elite ABC kit was used (Vector, USA) to detect biotinylated molecules. Enzyme activity sites were visualized using DAB chromogen solution (Dako, Denmark). Sections were counterstained in Mayer's hematoxylin, dehydrated, cleared, and mounted. Sambucus nigra lectin specifically binds to chick endothelium; therefore, the blood vessels were seen brown under the light microscope (Figures 1(c) and 1(d)).

2.7. Histomorphometric Analysis. Histomorphometric evaluation of the CAM parameters was performed on the images obtained with Olympus digital camera (Olympus U-CMAD3, Philippines). To perform accurate morphometric analysis each CAM section was divided into 5 sight fields (SFs) (Figure 1(a)). The central location directly under the implanted tumor was defined as the first SF, the 2nd and 4th SFs were defined as neighboring sites, and the 3rd and 5th SFs were defined as distant SFs, respectively. The thicknesses of both the CAM and the chorionic epithelium were measured in all SFs. The parameters measured only in central and neighboring SFs (the 1st, 2nd, and 4th) were as follows: (1) number of blood vessels with the smallest diameter of not less than 8 µm per constant length of the CAM section and (2) mean area of the counted blood vessels' cross-section. The latter were identified following the endothelial cells and erythrocytes inside the lumen of blood vessels in Sambucus nigra lectin (Figures 1(c) and 1(d)) and H&E stained sections, according to the systematic sampling approach of Russ and Dehoff [23]. Eight control CAMs were processed under the same conditions, except that measurements of each parameter were performed in five random SFs (Figures 1(b)-1(d)).

2.8. Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0 (Armonk, NY: IBM Corporation Software). Data were presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Student's *t*test was used to test hypothesis with respect to equality of means. The size of the differences among the mean values of the groups was evaluated by estimation of type I and type II errors ( $\alpha$  and  $\beta$ ) of the tests. The difference was considered to be significant if  $\beta \le 0.2$  and  $\alpha = 0.05$ . The correlations among the number of blood vessels and the thickness of the CAM and the thickness of epithelium of the CAM were evaluated using Pearson's correlation coefficient (r). The level of statistical significance for testing statistical hypothesis was 0.05.

#### 3. Results

The laryngeal squamous cell carcinoma tissue samples (N = 6) were tested on chick embryo CAMs (N = 120). In this paper we evaluate the effect of LSCC for those CAMs that were cut off on the 11th incubation day, that is, 2, 3, and 4 days after tumor tissue implantation (N = 15). All 15 CAMs



FIGURE 1: Histological appearance of the control and experimental CAM and LSCC tissue. (a) Sight fields of CAM with LSCC implant; original magnification 4x. (b-d) The control CAMs: stained in H&E (b); CAM's blood vessels revealed with Sambucus nigra lectin (c, d). (e) Moderately differentiated squarmous cell carcinoma of the larynx. Accumulation of atypical cells with concentrically arranged keratinized cells ("carcinoma pearls": long arrows) was observed in the original LSCC tissue. (f) Thickened CAM and chorionic epithelium of experimental group with LSCC implant: invasion through epithelium (short arrows). (g) Increased vacularity under the LSCC implant. (h, c, e, f, and g) Bars 50 µm; original magnification 10%; (d) bar 20 µm; original magnification 40x.

were evaluated morphologically in numerous sections and morphometric parameters were obtained in 5 SFs of 4 nonserial sections (Figure 1(a)). Three hundred SFs were measured accordingly. CAMs (N = 8) without implants served as controls.

CAMs (N = 8) without implants served as controls. Measurements of control CAMs were made in 160 SFs using the same methods (Figures 1(b)–1(d)).

The original LSCC tissue was evaluated histologically. Typical signs of the tumor were observed: the parenchyma consisted of atypical epithelial cells with irregular nuclei and increased number of nucleoli. Accumulation of atypical cells with concentrically arranged keratinized cells ("carcinoma pearls") was observed (Figure I(e)). The surrounding stroma was composed of loose connective tissue showing different level of infiltration by monomorphonuclear cells.

3.1. Histological and Immunohistochemical Characteristics of Implanted LSCC Tissue. The implanted LSCC tissue samples consisted of solid pieces of polymorphous atypical squamous epithelial cells with large irregular nuclei and increased mitosis, while observing one or several prominent nucleoli and abandant acidophilic cytoplasm. The tumor cells retained their vitality in 2, 3, and 4 days after implantation and the apparent influence of the LSCC on the CAM was observed (Figures 1(f) and 1(g)). The implanted tumor tissues on the chick embryo CAM in all the cases were visibly adhered to the bost CAM and never flowed away.

The HMW CK (CK34βE12) was expressed in the cytoplasm of the original LSCC epithelial cells. Epithelial cells of the LSCC implanted on the CAM also showed high positivity for the HMW CK. Endothelial cells of the blood vessels were positive for CD31 in both the original and implanted LSCC tissues. Cellular marker for proliferation Ki67 was positive in the nuclei of the original tumor cells (Figure 2(a) and 2(c)) also showing positivity for HMW CK (Figure 2(b)). Expression of CD31 in implanted LSCC blood



FIGURE 2: An immunohistochemical study of LSCC tissue before and after implantation on CAM. (a, c) The original tumor cells, which showed high positivity for the Ki87 (long arrows). (b) The original tumor cells (the same site as in (a)) were also positive for HMW CK (short arrows). (d) Endothelial cells of implanted tumor blood vessels were positive for CD3E. (e, f) Ki87 positive nuclei of implanted LSCC cells. (a, b, d, and e) Bars 50 µm; original magnification 10s; (c, f) Bars 20 µm; original magnification 40s.

vessels (Figure 2(d)) and Ki67 in its epithelial cells (Figures 2(e) and 2(f)) indicated that the implanted tissue retained features of the original tumor and preserved proliferative capacity even after 96 hours after the implantation.

3.2. Morphometric and Morphologic Characteristics of the CAM. The morphological features of the CAMs' reaction induced by the LSCC implants were similar in all specimens of the experimental group. Thus, there were no significant differences between morphological features of the different CAMs with implants obtained from the same patient as well. Results of the morphometric analysis of the CAMs in experimental and control groups are presented in Table L. The mean thickness of the CAM under the implanted LSCC in the experimental group was statistically significantly (p = 0.0001) increased in all 5 SFs comparing to that of the control group. The largest difference between the thickness of the experimental and the control CAMs was found in the central SF (1st SF) and reached 417%. However, in the distant SFs (3rd and 5th SFs) the difference was less and reached 103–109%, respectively. Furthermore, in the experimental group the host CAM in the central SF was statistically significantly thicker than in the neighboring and the distant SFs, respectively (p < 0.05).

Table 2 shows the mean thickness of the CAMs in both experimental and control groups 2, 3, and 4 days after

TABLE 1: Mean thickness of the CAM: es	perimental group versus control group.
--	--

LSCC group			Control group			Difference			
Sight fields	Mean µm	SD	Mean µm	SD	$\mu m$	%	P	β	
1st SF	204.9	143.9			167.9	417	0.0001	< 0.01*	
2nd SF	132.7	101.6			95.6	235	0.0001	< 0.01"	
3rd SF	83.0	71.5	37.1	16.4	45.9	109	0.0001	< 0.01"	
4th SF	124.7	98.9			87.7	214	0.0001	< 0.01"	
5th SF	80.7	79.3			43.7	103	0.0001	< 0.01"	

<sup>8</sup>Statistically significant difference between the groups, computed using a = 0.05.

TABLE 2: Mean thickness of the CAM 2, 3, and 4 days after the LSCC tumor implanting: experimental group versus control group.

	LSCC group		Control	group		Dif	ference	
Days after LSCC implantation	Mean µm	SD	Mean µm	SD	μm	%	P	β
2nd day	102.8	97.1			66.8	177	0.001	< 0.01"
3rd day	104.9	52.8	37.1	16.4	67.9	183	0.001	< 0.01"
4th day	185.8	137.6			148.7	401	0.001	< 0.01"

"Statistically significant difference between the groups, computed using  $\alpha = 0.05$ .

the LSCC tumor implantation (i.e., totally 11 days of incubation). The mean thickness of the CAM was statistically significantly higher (p = 0.001) in the experimental group versus control group already 2 days after the tumor implantation reaching 177%. Of note, on the 4th day after the LSCC tumor implantation that difference reached 401%. There was no positivity for the HMW CK in the mesenchymal layer or endodermal epithelium of the CAM. Expression of CD34 and Ki67 was not detected in the CAM as well.

3.3. Morphometric and Morphologic Characteristics of the CAM Epithelium. The chorionic epithelium in the experimental group was found to be thickened in comparison with the control group (Table 3) and it appeared squamous and stratified, consisting of 5-6 layers. The mean thickness of the epithelium under the LSCC implant was statistically significantly (p = 0.0001) higher as compared with the control group. The highest difference was found in the 1st SF (140%) while in the distant SFs these differences reached 70 and 75%, respectively.

All implanted tumors induced similar morphometric characteristics of the CAM epithelium under the LSCC implants. No significant differences were found in the morphometric characteristics of the epithelium after implanting the same patient's tumor on different CAMs (p > 0.05). However, there were certain regions of the CAM under the LSCC implants with thinned and even discontinuous epithelium (Figure 1(f)) and signs of tumor cells' invasion. Adjacent mesenchyme showed a dense accumulation of blood vessels immediately below the implant (Figure 1(g)).

The keratogenic metaplasia in the chorionic epithelium just beneath the implanted LSCC was detected by positive immunostaining with HMW CK. However, keratogenic metaplasia has never been found in the distant SFs of the experimental CAMs, as well as in the CAM epithelium of the control group.

3.4. Histomorphological Characteristics of the Vascularity of the CAM. Histomorphometric evaluation revealed a statistically significant difference of the mean number of CAM blood vessels between the experimental and control groups (p = 0.0001) (Table 4). The experimental group had much higher mean number of blood vessels per constant length of the CAM, thus demonstrating measurable evidence of increased vascularity. The highest difference from the control CAM was in the lst SF reaching 148%, however, in neighboring SFs the difference was less: 92% and 75%, respectively.

The mean number of blood vessels under the LSCC tissue implant (the 1st SF) was found to be significantly higher in comparison with the neighboring sites (p < 0.05) of the experimental CAM.

The statistically significant (p < 0.05) moderate positive correlations between the number of blood vessels and the thickness of the CAM (r = 0.65), as well as the thickness of epithelium of the CAM (r = 0.37), were revealed in the experimental group.

As shown in Table 5, the mean area of blood vessels' lumen in the experimental group was statistically significantly larger in all SFs if compared with that of the control group. In the lst SF the difference between the experimental and control groups reached 155%, in the neighboring SFs, 106% and 82%, respectively.

#### 4. Discussion

The chick embryo CAM model has long been used for the investigation of angiogenesis, oncogenesis, and tumor metastasis [24–26]. This model provides a naturally immunodeficient host that accepts implantation from various tissues

LSCC group			Control group			Difference		
Sight fields	Mean µm	SD	Mean µm	SD	$\mu m$	%	P	β
1st SF	14.9	5.6			8.7	140	0.0001	< 0.01*
2nd SF	12.9	7.2			6.78	107	0.0001	<0.01*
Jed SF	10.9	5.5	6.22	1.2	4.7	75	0.0001	< 0.01"
4th SF	11.9	4.7			5.7	91	0.0001	< 0.01*
5th SF	10.6	6.2			4.5	70	0.0001	< 0.01*

\*Statistically significant difference between the groups, computed using  $\alpha = 0.05$ .

TABLE 4: Mean number of blood vessels per constant length of the CAM section: experimental group versus control group.

1	SCC group		Contro	l group		Diff	erence	
Sight fields	Mean	SD	Mean	SD	Absolute	%	P	β
Ist SF	15.9	10.8			9.5	148	0.0001	<0.01*
2nd SF	12.3	5.5	6.4	2.9	5.9	92	0.0001	<0.01*
4th SF	11.2	5.8			4.9	75	0.0001	<0.01*
*Statistically sign	nificant difference	between the gro	sups, computed usi	$ng \alpha = 0.05$ .				

TABLE 5: Mean area of the CAM blood vessel lumen: experimental group versus control group.

LSCC group			Control group			Difference		
Sight fields	Mean µm <sup>2</sup>	SD	Mean µm <sup>2</sup>	SD	$\mu m^2$	%	Р	β
1st SF	169.3	119.5			102.9	155	0.0001	< 0.01*
2nd SF	138.9	127.9	66.4	42.8	72.4	109	0.0001	< 0.01*
4th SF	121.0	79.7			54.6	82	0.0001	<0.05*

\*Statistically significant difference between the groups, computed using  $\alpha = 0.05$ .

and species and therefore can be used for xenoimplantation of different types of cells. The extraembryonic membranes that are connected to the embryo through a continuous extraembryonic vessel system are readily accessible for experimental manipulation and observations [27]. Despite the evident advantages of the CAM assay and its natural immunodeficient environment, the chick embryo CAM model is still relatively rarely used for implanting of human tumors. Nevertheless, there are several reports about the employment of the CAM assay as a reliable model to study various human tumors, namely, melanoma [28], prostatic cancer [29], glioblastoma [15, 30], human colon carcinoma [13], giant cell tumor of bone [14], sarcoma [31], and head and neck squamous cell carcinoma [6].

However, there are only sporadic reports in the literature about the use of the CAM assay for biological studies of human laryngeal tissue: for establishment of LSCC cell lines [2] and for CAM analysis of cellular laryngeal scaffolds showing induction of a strong *in vivo* angiogenic response [24].

On the other hand, most experiments with chick embryo CAM reported in the literature used tumor cell lines that did not represent the natural physiological features of a solid tumor. Experiments with cell lines might not fully reflect the wide heterogeneity of human malignancies, because of poor correlation between the behavior of single cell lines in vitro and tumors encountered in patients. Deparated cancer cell lines differ genetically from the original cancers in patients, because these cells have a phenotype adapted to culturing on plastic substrates that are commonly employed in xenograft experiments [31]. Positive performance of an exploratory drug in experimental xenografts of different human cancer cell lines is not predictive enough of compound efficacy in the clinical setting [32]. The use of fresh tumor samples for the CAM assay

The use of fresh tumor samples for the CAM assay preserves the original tumor microenvironment of the heterogeneous tumor cell population and the associated matrix allowing natural interactions between the different cell populations in the sample [31]. Therefore, preservation of the microenvironment is a theoretical benefit of using fresh tumor samples.

The results of our study indicate that LSCC tissue samples outlived on the CAMs sustaining strongly adhered to the membranes in all the experiments despite the short term of interaction (2 to 4 days after implantation). All examined implants retained essential characteristics of the donor tumor specimens from living individuals with LSCC. It is important to note that all LSCC implants remained with their main histological features and no signs of necrosis were observed. Thus, the results of the present study show that the CAM assay 8

can be used to analyze fresh material derived from LSCC. This is the first *in vivo* model for LSCC which opens new perspectives to study this disease and tumor aggressiveness and to assess tumor responses to new therapeutic agents. We have noticed that LSCC tissues induced significant

We have noticed that LSCC tissues induced significant changes of all the structures of the host medium starting from the 2nd day after tumor implantation while having stayed on the CAM. The observed thickening of the mesenchyme with increased density of mesenchymal cells and thickening of chorionic epithelium in the CAM under the tumor implant can be explained as the result of action of the growth stimuli factors that are coming from the implanted LSCC tumor tissue and the nonspecific inflammatory reaction of the CAM due to the implant [33, 34].

Examination of CAM sections suggested that partial thickening in the mesenchyme between the outer and inner epithelium may be due to edema [35]. During the investigation with the uncoated dialysis capillary or by applying the Thermanox tissue culture cover slips onto the CAM, a high density of inflammatory cells, such as heterophils, and giant mast cells with associated fibrosis were found. The stroma of the CAM showed fibrocyte proliferation, leucocyte infiltration, and clusters of dispersed ectodermal epithelial cells [36-39]. As chick embryo CAM is accepted to be a naturally immunodeficient host [11] until day 18 of incubation [4], the inflammatory response of the chorioallantoic membrane to biomaterials is explained as the result of appearance of nonlymphoid avian leukocytes, mast cells, basophils, thrombocytes (functional analog to platelets), and monocytes that represent nonspecific inflammatory reaction [33].

Angiogenesis plays a critical role in many normal physiological processes, as well as in tumor neovascularization [34]. Establishment and growth of malignant tumors are critically dependent on their ability to stimulate the formation of new blood vessels from preexisting vasculature to support their metabolic needs [34, 40]. Thus, angiogenesis facilitates tumor growth and spread [6].

In head and neck tumors, increased angiogenesis has been associated with an unfavorable prognosis in many studies; however, prognostic relevance of angiogenic factors in laryngeal tumor development has been questioned [41–43]. More recent studies emphasized that increased LSCC tumor angiogenesis was an early event in laryngeal tumor development and positively correlated with local and locoregional relapse and lethal outcome of the disease [44, 45].

Chick embryo CAM being rich in developed arteries, veins, and capillary plexus also accompanied by evolved nutrition delivery system is accepted to be one of the most widely used in vivo assays for studying anti- or proangiogenic properties [4, 12, 34]. However, theoretically, revascularization of the tumor sample is required for the sample's survival and growth [31].

The results of our study disclose that after implanting fresh LSCC tissue samples onto the chick embryo CAM the process of active angiogenesis in the CAM appears. That is the result of multiplying blood vessels associated with increase in vessel volume; hence, naccent blood vessel proliferation BioMed Research International

during our experiment is the visible sign of LSCC progression onto the CAM.

It is suggested though that alteration in the gaseous environment of chorionic epithelium may have initiated the chain of events leading to keratogenic metaplasia [46]. This phenomenon has been noticed while investigating LSCC implant onto chick embryo CAM in our study: the keratogenic metaplasia in the chorionic epithelium was observed only just beneath the implanted LSCC in contrast to the sites distant from the carcinoma implant or CAMs of control.

Results of the present study are in agreement with the data of other investigations. An increased value of vascular growth was noticed after implantation of decellularized healthy laryngeal tissue samples on CAM [24]. Ovarian fragments implanted onto chick embryo CAM markedly increased the number of distended blood vessels in the membrane near or next to the implanted ovarian fragments and an increased number of fine capillaries within close proximity of the implanted fragments were found [17, 27]. The gastrointestinal tract carcinoma cells induced angiogenesis in the CAM and positively correlated with their capacity to colonize the CAM tissue [13, 25].

The results of our study show that reliable protocol for implanting of human LSCC onto the chick embryo CAM is established and this assay can be used to analyze fresh material derived from human LSCC. However, some limitations arise from the inherent features of the chick embryo CAM model. Because the duration of the CAM assay is limited to a 7-9 days' window available before the chick hatches, most tumor cells cannot produce macroscopically visible colonies in secondary organs before the termination of the assay. As a result, the more difficult detection of micrometastases becomes an inherent part of the chick embryo CAM model system [47]. This feature of the chick embryo CAM assay probably determined a rather rare (2 cases out of 6) detection of LSCC invasion and micrometastases in our series.

#### 5. Conclusions

In summary, results of our study clarify that chicken embryo CAM is a relevant host medium for implanting fresh tissues of the LSCC. The LSCC implants adhere to the host membrane and induce significant morphological changes of it, allowing visualizing microscopically the behavior of implanted tumor cells. Data of this study provide the first morphological and morphometric characterization of the LSCC implant on CAM model and, therefore, allow better understanding of cancer cell biology. Future development of this model may lead to identification of new specific and selective therapeutic agents and composition of drugs to limit spread of LSCC.

#### Abbreviations

LSCC:	Laryngeal squamous cell carcinoma
CAM:	Chorioallantoic membrane
SD:	Standard deviation
SF:	Sight field
HMW CK	High molecular weight cytokeratins.

#### Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

#### Acknowledgments

The authors highly appreciate the technical assistance of Valda Saročkaitė and Raminta Mozūraitė from Department of Histology and Embryology, LUHS.

#### References

- E. Rudolph, G. Dyckhoff, H. Becher, A. Dietz, and H. Ramroth, "Effects of tumour stage, comorbidity and therapy on survival of laryngeal cancer patients: a systematic review and a metaanalysis," *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 268, no. 2, pp. 165–179, 2011.
- [2] D. M. Easty, G. C. Easty, A. Baici et al., "Biological studies of ten human squarnous carcinoma cell lines: an overview," *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, vol. 22, no. 6, pp. 617– 634, 1986.
- [3] D. Sano and J. N. Myers, "Xenograft models of head and neck cancers," Head & Neck Oncology, vol. 1, article 32, 2009.
- [4] A. Vargas, M. Zeisser-Labouèbe, N. Lange, R. Gurny, and F. Delie, "The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 59, no. 11, pp. 1162–1176, 2007.
- [5] D. Ribatti, "The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology," *Experimental Cell Research*, vol. 328, no. 2, pp. 314–324, 2014.
- [6] M. Liu, C. S. Scanlon, R. Banerjee et al., "The histone methyltransferase E2H2 mediates tumor progression on the chick chorioallantoic membrane assay, a novel model of head and neck squamous cell carcinoma," *Translational Oncology*, vol. 6, no. 3, pp. 273–281, 2013.
- [7] D. Ribatti, "The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo assay to study antiangiogenesis," *Pharmaceuticals*, vol. 3, no. 3, pp. 482–513, 2010.
- [8] D. Stehelin, H. E. Varmus, J. M. Bishop, and P. K. Vogt, "DNA related to the transforming gene (s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA," *Nature*, vol. 260, no. 5547, pp. 170–173, 1976.
- [9] M. N. Vergara and M. V. Canto-Soler, "Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development," *Neural Development*, vol. 7, no. 1, article 22, 2012.
- [10] H. M. Temin, "The participation of DNA in Rofs sarcoma virus production," Virology, vol. 23, no. 4, pp. 486–494, 1964.
- [11] E. I. Deryugina and J. P. Quigley, "Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis," *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 130, no. 6, pp. 1139–1130, 2008.
- [12] C. A. Staton, S. M. Stribbling, S. Tazzyman, R. Hughes, N. J. Brown, and C. E. Lewis, "Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo," International Journal of Experimental Pathology, vol. 85, no. 5, pp. 233–248, 2004.
- [13] M. C. Subauste, T. A. Kupriyanova, E. M. Conn, V. C. Ardi, J. P. Quigley, and E. I. Deryugina, "Evaluation of metastatic and angiogenic potentials of human colon carcinoma cells in chick embryos model systems," *Clinical and Experimental Metastasis*, vol. 26, no. 8, pp. 1033–1047, 2009.

9

- [14] M. Balke, A. Neumann, C. Kersting et al., "Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane," *BMC Research Notes*, vol. 3, article 58, 2010.
- [15] N. Bulčiuniene, A. Tamašauskas, A. Valančiute et al., "Histology of human glioblastoma transplanted on chicken chorioallantoic membrane," *Medicina*, vol. 45, no. 2, pp. 123–131, 2009.
- [16] A. Kuzminienė, S. Šalomskaitė-Davalgienė, I. Balnyte, J. Palubinskienė, A. Valančiitė, and V. Ulozas, "Evabaation of the chicken embryo chorioallantoic membrane model for laryngeal turnor transplantation," *Papers on Anthropology*, vol. 20, pp. 229–240, 2012.
- [17] R. A. Cushman, C. M. Wahl, and J. E. Fortune, "Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles," *Human Reproduction*, vol. 17, no. 1, pp. 48–54, 2002.
- [18] M. Scarpatetti, O. Tsybrovskyy, and H. H. Popper, "Cytokeratin typing as an aid in the differential diagnosis of primary versus metastatic lung carcinomas, and comparison with normal lung," *Varchews Archiv*, vol. 440, no. 1, pp. 70–76, 2002.
- [19] D. Wang, C. R. Stockard, L. Harkins et al., "Immunohistochemistry in the evaluation of neovascularization in tumor xenografts," *Biotechnic and Histochemistry*, vol. 83, no. 3–4, pp. 179–189, 2008.
- [20] A. B. Villaret, D. Barbieri, G. Peretti et al., "Angiogenesis and lymphangiogenesis in early-stage laryngeal carcinorna: prognostic implications," *Head and Neck*, vol. 35, no. 8, pp. 1132– 1137, 2013.
- [21] R. B. Rodrigues, R. Da Ros Motta, S. M. Dos Santos Machado et al., "Prognostic value of the immunohistochemistry correlation of Ki-67 and p53 in squamous cell carcinomas of the larynx," *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, vol. 74, no. 6, pp. 855– 859, 2008.
- [22] M. Brand, N. Lamandé, E. Larger, P. Corvol, and J.-M. Gasc, "Angiotensinogen impairs angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 85, no. 5, pp. 451–460, 2007.
- [23] J. C. Russ and R. T. Dehoff, Practical Stereology, Plenum Press, New York, NY, USA, 2nd edition, 1999.
- [24] S. Baiguera, A. Gonfiotti, M. Jaus et al., "Development of bioengineered human larynx," *Biomaterials*, vol. 32, no. 19, pp. 4433–4442, 2011.
- [25] D. I. Gheonea, T. Cártána, T. Ciurea, C. Popescu, A. Badarau, and A. Saftoiu, "Confocal laser endomicroscopy and immunoendoscopy for real-time assessment of vascularization in gastrointestinal malignancies," World Journal of Gastroenterology, vol. 17, pp. 21–27, 2011.
- [26] D. Ribatti, The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis, Springer Science+Business Media B.V, London, UK, 2010.
- [27] V. Isachenko, P. Mallmann, A. M. Petrunkina et al., "Comparison of in vitro- and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, Article ID e32549, 2012.
- [28] I. C. MacDonald, E. E. Schmidt, V. L. Morris, A. F. Chambers, and A. C. Groom, "Intravital videomicroscopy of the chorioallantoic microcirculation: a model system for studying metastasis," *Microvascular Research*, vol. 44, no. 2, pp. 185–199, 1992.
- [29] K. Kunzi-Rapp, F. Genze, R. Küfer, E. Reich, R. E. Hautmann, and J. E. Gschwend, "Chorioallantoic membrane assay: vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate

cancer cells as an animal substitute model," Journal of Urology, vol. 166, no. 4, pp. 1502-1507, 2001.

- [30] M. Hagedorn, S. Javerzat, D. Gilges et al., "Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 5, pp. 1643–1648, 2005.
- [31] G. Sys, M. Van Bockstal, R. Forsyth et al., "Turnor grafts derived from sarcoma patients retain turnor morphology, viability, and invasion potential and indicate disease outcomes in the chick chorioallantoic membrane model," *Concer Letters*, vol. 326, no. 1, pp. 69–78, 2012.
- [32] J. S. De Bono and A. Ashworth, "Translating cancer research into targeted therapeutics," *Nature*, vol. 467, no. 7345, pp. 543– 549, 2010.
- [33] T. I. Valdes, D. Kreutzer, and F. Moussy, "The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 62, no. 2, pp. 273–282, 2002.
- [34] E. I. Deryugina and J. P. Quigley, "Chapter 2 chick embryo chorioallantoic membrane models to quantify angiogenesis induced by inflammatory and tumor cells or purified effector molecules," in *Methods in Enzymology*, vol. 444, pp. 21–41, Elsevier, 2008.
- [35] British American Tobacco, Research & Development Establishment: Report No. RD. 680: A Chorioallantoic Membrane Hyperplasia Test for Smoke, British American Tobacco, Southampton, UK, 1969.
- [36] G. J. Burton and M. E. Palmer, "Development of the chick chorioallantoic capillary plexus under normoxic and normobaric hypoxic and hyperoxic conditions: a morphometric study," *Journal of Experimental Zoology*, vol. 262, no. 3, pp. 291– 298, 1992.
- [37] J. Wilting, B. Christ, and M. Bokeloh, "A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. Studies on the effects of carriers, PBS, angiogenin, and bFGE" Anatomy and Embryology, vol. 183, no. 3, pp. 259–271, 1991.
- [38] C. Balachandran, N. Pazhanivel, T. J. Prabhakar, V. Murugadas, and P. Prabakar, "Avipox virus infection in Rosella parakeet (Platycercus sp.)," Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, vol. 2, no. 3, pp. 184–187, 2012.
- [39] P. W. Barone and M. S. Strano, "Single walled carbon nanotubes as reporters for the optical detection of glucose," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 3, no. 2, pp. 242–252, 2009.
- [40] L. Østergaard, A. Tietze, T. Nielsen et al., "The Relationship between turnor blood flow, angiogenesis, turnor hypoxia, and aerobic glycolysis," *Cancer Research*, vol. 73, no. 18, pp. 5618– 5624, 2013.
- [41] J. D. Murray, G. W. Carlson, K. McLaughlin et al., "Tumor angiogenesis as a prognostic factor in laryngeal cancer," *American Journal of Surgery*, vol. 174, no. 5, pp. 523–526, 1997.
- [42] F. Beatrice, R. Cammarota, C. Giordano et al., "Angiogenesis: prognostic significance in laryngeal cancer," Anticancer Research, vol. 18, no. 6, pp. 4737–4740, 1998.
- [43] K. Kupisz, D. Chibowski, J. Klatka, S. Klonowski, and A. Stepulak, "Turnor angiogenesis in patients with laryngeal cancer," *European Archives of Ote-Rhino-Laryngology*, vol. 256, no. 6, pp. 303–305, 1999.
- [44] A. B. Villaret, D. Barbieri, G. Peretti et al., "Angiogenesis and lymphangiogenesis in early-stage laryngeal carcinoma: prognostic implications," *Head & Neck*, vol. 35, no. 8, pp. 1132– 1137, 2013.

- [45] J. Laitakari, V. Näyhä, and F. Stenbäck, "Size, shape, structure, and direction of angiogenesis in laryngeal turnour development," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 57, no. 4, pp. 394–401, 2004.
- [46] A. Moscona, "Squamous metaplasia and keratinization of chorionic epithelium of the chick embryo in egg and in culture," *Developmental Biology*, vol. 1, no. 1, pp. 1–23, 1959.
- [47] A. Zijlstra, J. Lewis, B. DeGryse, H. Stuhlmann, and J. P. Quigley, "The inhibition of turnor cell intravasation and subsequent metastasis via regulation of *in vivo* turnor cell motility by the tetraspanin CDI51," *Cancer Cell*, vol. 13, no. 3, pp. 221–234, 2008.

# SUMMARY

# **INTRODUCTION**

Laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) is one of the most common malignant tumors of the respiratory tract with an estimated incidence rate of 10/100 000 cases in males in Europe. Despite the up-to-date treatment using advanced chemoradiation therapy and modern surgical techniques, the survival rate is not increasing remarkably within the last 30 years and the overall 5-year survival of patients with this carcinoma localization in Europe was 63% in the period of 1995 to 2003.

Recurrent respiratory papillomatosis (RRP) is the most common larynxgeal tumor of benign origin. The incidence of RRP in the USA is reported at 4.0–4.3 per 100,000 in children and 1.8–2.0 per 100,000 in adults, and 0.24 per 100,000 in children aged 14 years and younger in Canada. The natural history and clinical course of RRP is highly variable and unpredictable. Some of the patients experience spontaneous remissions and some of them have aggressive lesions requiring multiple surgical procedures over a period of few months. Despite many treatments tried in clinical practice no single or combined or adjuvant therapy was recognized to be consistently effective to cure RRP. Identifying effective diagnostic and treatment methods for LSCC and RRP tumors are limited by a lack of experimental *in vivo* models, as *in vitro* models do not representative of the human tumors features.

Therefore, we report the first successful cases of implanting LSCC and RRP tumors onto the chick embryo CAM assay. That is known as a highly vascularized biologic membrane with incomplete lymphoid system. These features greatly stimulate the growth of the implanted tumor onto the chick embryo CAM and serve as a naturally immunodeficient host that is efficient for maintaining implanted tumor tissues without species-specific restrict-tions.

### Aim of the study

To elaborate the experimental *in vivo* model for LSCC and RRP tumors on the chick embryo CAM, and to study peculiarities of tumor growth and angiogenesis.

### **Objectives of the study**

- 1. To evaluate the suitability of the chick embryo CAM as experimental *in vivo* model for LSCC and RRP tumor investigation.
- 2. To evaluate the morphologic, morphometric, immunohistochemic characteristics and *in vivo* biomicroscopic and fluorescent stereomicroscopic features of the chick embryo CAM after LSCC and RRP tumor transplantation. To compare these findings with the control group and between the experimental LSCC and RRP groups.
- 3. To evaluate if the LSCC and RRP tumors remained vital with their main histological features on the surface of the CAM until the end of experiment.
- 4. To compare the features of the experimental LSCC and RRP tumor growth on the chick embryo CAM to the natural clinical course of these tumors in the patients body.

### Scientific novelty of the study

The chick embryo CAM model has long been used for the investigation of angiogenesis, oncogenesis and tumor metastasis. The CAM model provides rapid results and may be employed as a simple, inexpensive method in any laboratory. This model provides a naturally immunodeficient host that accepts implantation from various tissues and species and, therefore, can be used for xenoimplantation of different types of cells. Despite the evident advantages of the CAM assay and its natural immunodeficient environment, the CAM model is still relatively rarely used for human tumor implanting.

However, there are only sporadic reports in the literature on the use of the CAM assay for biological studies of human laryngeal tissue: for establishment of LSCC cell lines and for CAM analysis of acellular laryngeal scaffolds showing induction of a strong *in vivo* angiogenic response.

This is the first *in vivo* model for LSCC and RRP which opens new perspectives to study this disease and tumor aggressiveness and assessment of tumor responses to new therapeutic agents.

### Material and methods of the study

### **Incubation and egg opening**

Fertilized hen eggs (*Cobb-500*) obtained from the local hatchery (Dovainoniu Paukstynas, Lithuania) were incubated at 37.7 °C and 59-60 % relative humidity with permanent ventilation and being rotated to and fro all day long. On the third embryonic day two milliliters of albumen was removed in order to disconnect the developing CAM from the shell. Afterwards, using a high speed drill above the yolk with embryo, an oval window of about 1cm<sup>2</sup> on the top of the shell of each egg was opened and covered with transparent sterile tape. Afterwards, eggs were placed back into the incubator and kept in the same conditions without rotation. The opened eggs were used for the LSCC and RRP implantation.

# LSCC and RRP tissue samples

Fresh LSCC and RRP tissue samples of the size at least about  $0.5 \times 1.0 \times 0.5$  cm were obtained from the patients at the Department Otorhinolaryngology, Lithuanian University of Health Sciences (LUHS) during laryngeal surgery. Tumor tissues were transported to the laboratory of the Department of Histology and Embryology of the LUHS in the isotonic saline solution and implanted onto the chick embryo CAM.

Investigations in the study were performed in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki and approved by Kaunas Regional Bioethics Committee (P1-BE-2-34/2007). Histologically confirmed LSCC tissue samples were acquired in accordance with the protocol approved by the Institutional Review Board of LUHS. Written Informed consent was obtained from the patients before surgery and patients' identifiers were removed to ensure anonymity.

### LSCC and RRP tissue implantation onto the CAM

LSCC and RRP tumor tissue implantation was performed on the 7<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> or 9<sup>th</sup> day of eggs' incubation. Each piece of the tumor (1 piece per egg of apprx. 8 mm<sup>3</sup>) was gently placed on the outer surface of the CAM. At the 9<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> day of eggs' incubation of tumor implantation two to four eggs with alive embryos were opened and live-fixed in the 10% formalin solution. CAM's with the adhering LSCC and RRP tumors were excised and fixed in formalin for 5 days.

Control CAMs were incubated and proceeded under the same protocol, except LSCC and RRP tissue implantation.

### **Tissue sampling and histology**

CAMs with the adhered LSCC and RRP tissues were cut out and embedded into paraffin blocs, sliced perpendicularly to the CAM surface into 3µm thick sections and stained with hematoxylin and eosin for histological and morphometric examination. Histological evaluation of the samples was performed with the cold light microscope OLYMPUS BX40F4 (Olympus Opticae co. LTD., Japan) under 10 x magnification using CellSensDimention1.9 Digital Imaging Software for Research Applications (Olympus Corporation of the Americas, USA).

### Immunohistochemistry

The 3µm thick sections of formalin-fixed paraffin-embedded CAMs with LSCC and RRP tumor implants were mounted on poly-L-lysine coated glass slides and kept at 60°C for 24 hours. Tissue sections were dewaxed with xylene and rehydrated with ethanol followed by PBS washes. The sections were pre-treated with EN-VISIONtm FLEX Target retrieval solution, low pH for MMP-9, high pH for HMW CK, Ki67 and PCNA by heating in a pressure-cooker and then treated with endogenous peroxidase blocking solution. Afterwards incubated with cytokeratin monoclonal antibodies (clone 34 $\beta$ E12, dilution 1:100), monoclonal mouse anti-human antibody for Ki67 (clone MIB-1, dilution 1:50); 3), antibodies for proliferating cell nuclear antigen (anti-PCNA, clone PC10) and purified rabbit anti-matrix metalloproteinase-9 (anti-MMP-9) polyclonal antibodies (NB-P1-72189, dilution 1:100) (Novus Biologicals, Littleton CO, USA and Dako A/S (Glostrup, Denmark).

Detection of antibodies using commercially available kits EnVision Flex+Mouse (Linker) and EnVisionFlex/-HRP (both from Dako) was performed following the protocols of the provider. Sites of enzyme activity were visualized using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) chromogen solution (Dako, Denmark). Sections were counterstained in weak Mayer's hematoxylin, dehydrated, cleared and mounted for light microscopy.

In order to highlight endothelium of blood vessels in chick embryo CAM, slices were stained with 10  $\mu$ g/ml biotinylated *Sambucus nigra* bark lectin (SNA) (Vector, USA. The Vectastain *Elite ABC* kit (Vector, USA) was used to detect biotinylated molecules. Enzyme activity sites were

visualized using DAB chromogen solution (Dako, Denmark). Sections were counterstained in Mayer's hematoxylin, dehydrated, cleared and mounted.

### Statistical analysis

IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. (Armonk, NY: IBM Corp. Software) was used for statistical analysis. Data presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Student's *t* test and one-way ANOVA were used for testing hypothesis about equality of the mean and to compare data for groups. The (extent of difference between) the mean values of the groups was evaluated by estimation of type I and type II errors ( $\alpha$  and  $\beta$ ) of the tests. The difference was considered to be significant if  $\beta \le 0.2$  and  $\alpha = 0.05$ . The level of statistical significance by testing statistical hypothesis was 0.05.

### Conclusions

- 1. The present study show that the CAM assay can be used to analyze fresh material derived from LSCC and RRP tumors.
- 2. The LSCC and RRP tumor tissues induced significant changes of all the structures of the CAM: the thickening of the CAM with increased density of mesenchymal vessels and thickening of chorionic epithelium of the CAM under the tumor implants and in the neighboring sites.
- 3. All LSCC and RRP implants remained with their main histological features showing signs of increased proliferative capacity of implanted tumors cells. The distant LSCC and RRP tumors spread on the chick embryo CAMs were noticed. LSCC implants showed the infiltrative tumor growth pattern on experimental CAMs, whereas RRP tumors grew on the surface of CAMs and no signs of RRP's ingrowths into CAM's mesenchymal layer were detected.
- 4. The pure differentiated LSCC tumor cells adhered the experimental CAMs and induced the significant increase of the mean number of CAM blood vessels statistically significantly more often than the well-differentiated ones. Those LSCC tumors that spread on the chick embryo CAMs more often formed the distant metastases in the patients' bodies. Those RRP tumors that required multiple surgical procedures for the patients more often have adhered, grew and formed the distant RRP tumors on the experimental CAMs.

# BIOGRAFIJA

Vardas, pavardė	Alina Kuzminienė
Gimimo data	1979 11 25
Adresas	Taikos pr. 107–68, Kaunas
E-mail/tel.	alinakuzminiene@gmail.com, 8-657-75544
Tautybė	Lietuvė
Šeimyninė padėtis	ištekėjusi
Išsilavinimas	<ul> <li>Nuo 2010 09 01 doktorantė</li> <li>Lietuvos sveikatos mokslų universiteto</li> <li>Medicinos akademijos Ausų nosies ir gerklės ligų klinikoje.</li> <li>2006–2009 rezidentūra</li> <li>Kauno medicinos universiteto ausų nosies ir gerklės ligų klinikoje.</li> <li>2004–2005 internatūra</li> <li>Marijampolės apskrities ligoninėje.</li> <li>2009 06 29 magistro laipsnis ir gydytojo profesinė Kvalifikacija Kauno medicinos universitete.</li> </ul>
Patirtis	Nuo <b>2009 birželio 29 d.</b> gydytoja otorinolaringologė (licencijos Nr. MPL-15242) LSMU KK ANG ligų klinikoje. <b>2009–2015</b> asistentė Lietuvos sveikatos mokslų universitete MA. Nuo <b>2009</b> Kauno krašto otorinolaringologų asociacijos narė ir valdybos narė. <b>Nuo 2009</b> Lietuvos otorinolaringologų draugijos (LOD) narė. <b>2009–2011</b> LOD valdybos narė.

# PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju šio mokslinio darbo vadovui prof. Virgilijui Ulozai už konstruktyvius pamokymus, kantrybę, visokeriopą pagalbą ir rūpestingą vadovavimą visam tiriamajam darbui.

Profesoriau, dėkoju Jums už tikėjimą ir pasitikėjimą manimi, skatinimą siekti užsibrėžtų tikslų, už šiltą ir žmogišką bendravimą bei nuoširdžius patarimus!

Nuoširdžiai dėkoju visam LSMU MA Histologijos ir embriologijos katedros kolektyvui, o ypatingai profesorei Angelijai Valančiūtei už šiltą ir konstruktyvų bendradarbiavimą, pamokymus, patarimus ir visapusišką palaikymą tiriamojo darbo metu.

Dėkoju LSMU MA Mokslo centro vadovei prof. Ingridai Ulozienei ir visoms darbuotojoms už Jūsų tikslų ir puikiai suorganizuotą darbą, visapusišką pagalbą ir palaikymą. Dėkoju Jums, profesore, už Jūsų rūpestį ir saugumo jausmą doktorantūros studijų metu!

Dėkoju savo kolegoms už palaikymą, patarimus ir konstruktyvias pastabas.

Dėkoju profesorei Rūtai Pribuišienei ir gyd. Algiui Babarskui už tikėjimą manimi. Ačiū už Jūsų nuoširdumą!

Esu dėkinga savo tėveliams Birutei ir Algirdui Galbogiams už suteiktą galimybę ir norą mokintis, už išugdytą norą siekti užsibrėžtų gyvenimo tikslų. Jūsų gyvenimiško pavyzdžio vedina, tapau žmogumi ieškančiu žinių ir siekiančiu būti doru ir sąžiningu žmogumui.

Dėkoju savo vyrui Linui, savo sūnui Kajui ir dukrytei Rugilei už pagalbą ir už tai, kad buvote šalia ir visapusiškai palaikėte visą šį laiką!

Dėkoju savo sesei Indrei ir jos šeimai, savo vyro tėvams Liudmilai ir Vladimirui Kuzminams už palaikymą!

Dėkoju visiems draugams ir artimiesiems už supratimą ir palaikymą.