

Angiogeneza w nowotworach skóry i tkanki podskórnej psów

ALEKSANDRA SOBECZYŃSKA-RAK

Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Głębocka 30, 20-612 Lublin

Sobczyńska-Rak A.

Angiogenesis in skin and subcutaneous tissue of dogs with tumors

Summary

The aim of the study was the evaluation of the degree of tumor vascularization in dogs. The examinations were performed on 42 tumors, taken surgically from dogs affected with skin and subcutaneous tissue tumors. Twenty three male and nineteen female mixed breed dogs aged 3 to 15 years were operated. The dogs had not been treated for neoplasma diseases earlier. The tumor samples were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours, after which the tissues were dehydrated in increasing concentrations of alcohol and embedded in paraffin. The slides were stained with hematoxyline and eosine. The tumor type was determined according to the current WHO classification. For the endothelium vessel observations immunohistochemical staining was performed with the use of polyclonal antibody directed against the von Willebrand factor (FVIII). The estimation of blood vessel quantity was performed in a microscope equipped with a computer image analysis system. The intratumoral microvessel density was calculated in 10 selected areas. The average of microvessel density was 190 per 1 mm² in malignant tumors and 138/mm² in benign tumors. It was found that the degree of malignant tumor vascularization was much larger than that of the benign tumor. Tumor angiogenesis determination can be used for diagnosis, prognosis, as well as for the degree of malignancy classification and metastatic potential.

Keywords: angiogenesis, tumour, skin, dog

Nowotwory od wielu lat są przedmiotem badań w medycynie. Obecnie, ze względu na wzrastającą ich liczbę u zwierząt, są także powodem interwencji lekarza weterynarii. Miejscem najczęstszej lokalizacji procesu nowotworowego u psów jest skóra i tkanka podskórna. Każdy guz, niezależnie od miejsca lokalizacji i tkanki, z której się wywodzi, wymaga do wzrostu zaopatrzenia w krew i substancje odżywcze. Warunkiem powiększenia masy guza i tworzenia przerzutów jest wytworzenie własnej sieci naczyń w procesie angiogenezy (1, 5, 7, 9, 13, 24).

Neoangiogeneza jest procesem wieloetapowym i stanowi wypadkową działania czynników pobudzających oraz hamujących uniczynienie (tab. 1) (7, 9, 13, 15, 23, 24). Pierwszym etapem rozwoju naczyń jest pobudzenie komórek śródbłonna przez czynniki wzrostu. Następnie dochodzi do miejscowego rozszerzenia naczynia oraz wzrostu przepływu krwi i wzmocnienia jego przepuszczalności. Dochodzi do degradacji błony podstawnej naczynia i aktywacji czynników proangiogennych, które

Tab. 1. Czynniki angiogenne

Pobudzające	Hamujące
VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń	TSP-1 – trombospondyna
FGF – czynnik wzrostu fibroblastów	Angiostatyna
TGF- β – transformujący czynnik wzrostu	Endostatyna
HGF – czynnik wzrostu hepatocytów	Ang-2 – angiopoetyna-2
Angiogenina	Restyna
Ang-1 – angiopetyna-1	Wazostatyna
PDGF – płytkowy czynnik wzrostu	N-końcowy fragment czynnika płytkowego 4
IGF – insulinowy czynnik wzrostu	N-końcowy fragment prolaktyny
TF – czynnik tkankowy	INF α/β – interferon α/β
PG-E – prostaglandyna-E	TIMP – tkankowe inhibitory metaloproteaz
Il-8 – interleukina-8	Il-1 – interleukina-1
Proliferyna	Il-6 – interleukina-6
Epo – erytropoetyna	Il-10 – interleukina-10
22 kDa fragment heparyny	Il-12 – interleukina-12
Chemokiny	

pobudzają komórki śródbłonna do proliferacji i migracji (13). Komórki śródbłonna wydłużają się i ukła-

dają w szereg, tworząc w ten sposób pęczek naczyń, w którym dalsze podziały zachodzą proksymalnie do wędrującego szczytu, umożliwiając wzrost pęczka naczyniowego na długość (18). Ważną rolę w tym procesie odgrywają metaloproteazy i hydrolazy. Pod ich wpływem dochodzi do rozluźnienia struktury macierzy zewnątrzkomórkowej, co ułatwia migrację komórek śródbłonna i tworzenie nowych naczyń. Ostatnim etapem angiogenezy nowotworowej jest synteza błony podstawnej naczyń (13, 24).

Od lat prowadzone są badania różnych czynników wpływających na rozwój procesu nowotworowego, pod kątem ich klinicznej wartości prognostycznej. Dotyczą one: typu histologicznego, stopnia złośliwości, wielkości guza, obecności przerzutów oraz procesu neowaskularyzacji. Brak jest jednak danych na temat angiogenezy w nowotworach skóry i tkanki podskórnej u psów.

Celem badań było określenie stopnia unaczynienia nowotworów skóry i tkanki podskórnej usuniętych operacyjnie u psów.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły tkanki nowotworowe 42 chorych psów. Zwierzęta były operowane w Katedrze i Klinice Chirurgii Zwierząt UP w Lublinie z powodu występowania guzów nowotworowych w obrębie skóry i tkanki podskórnej. Operowano 23 samce i 19 samic, różnych ras, w wieku 3-15 lat. Materiał pobrano od psów następujących ras: rottweiler – 6, bokser – 5, doberman – 5, owczarek niemiecki – 3, spaniel – 3, jamnik – 2, dog – 2, sznaucer – 2, owczarek collie – 1, owczarek kaukaski – 1, dalmatyńczyk – 1 oraz 11 psów rasy mieszanej (tab. 2, 3). Psy nie były wcześniej leczone z powodu choroby nowotworowej. Żywiono je karmą komercyjną lub przygotowywaną przez właściciela.

U wszystkich zwierząt określano stopień zaawansowania klinicznego nowotworów według systemu TNM. Wykonywano badanie radiologiczne klatki piersiowej w celu potwierdzenia lub wykluczenia obecności przerzutów. Po chirurgicznym usunięciu nowotworu, uzyskany materiał dostarczano bezpośrednio po zabiegu do Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie. Wycinki guzów utrwalano w 10% buforowanej formalinie przez 24 h. Po utrwaleniu materiał odwadniano we wzrastających stężeniach alkoholu i zatapiano w parafinie. Na podstawie preparatów barwionych hematoxyliną i eozyną ustalano rozpoznanie i określano typ nowotworu wg obowiązującej klasyfikacji WHO. W celu uwiarygodnienia śródbłonna naczyń wykonano barwienie immunohistochemiczne z zastosowaniem poliklonalnego przeciwciała przeciwko czynnikowi von Willebranda F VIII oraz systemu EnVision firmy DAKO. Do ilościowej oceny naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję czynnika

Tab. 2. Nowotwory złośliwe skóry i tkanki podskórnej

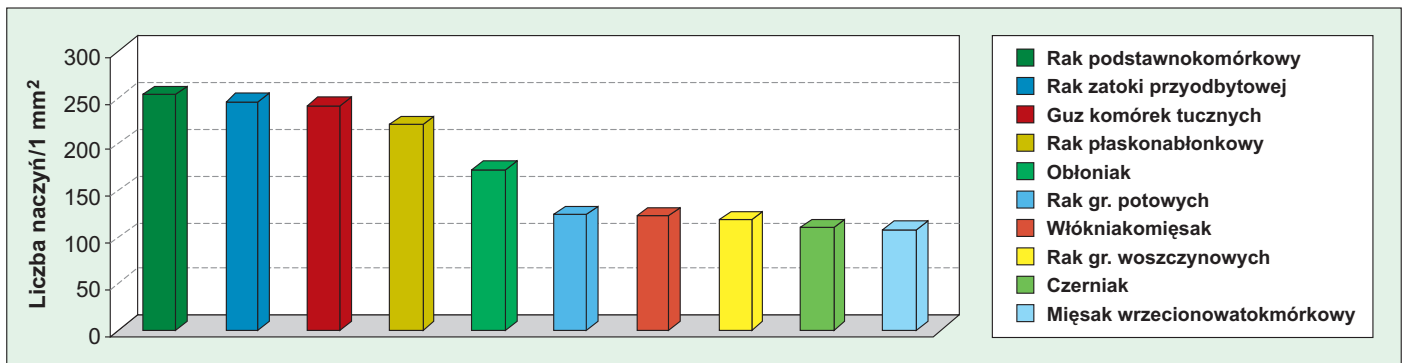
Opis psa	Rozpoznanie histologiczne	Gęstość naczyń na mm ²
Doberman, ♂, 7 lat	Mięsak wrzecionowatokomórkowy	130
Mieszaniec, ♀, 15 lat	Mięsak wrzecionowatokomórkowy	97
Jamnik, ♂, 10 lat	Mięsak wrzecionowatokomórkowy	90
Doberman, ♀, 8 lat	Mięsak wrzecionowatokomórkowy	114
Spaniel, ♂, 10 lat	Włóknakiomęsak	130
Owczarek niemiecki, ♀, 8 lat	Włóknakiomęsak	115
Doberman, ♀, 9 lat	Rak płaskonabłonkowy	230
Mieszaniec, ♀, 14 lat	Rak płaskonabłonkowy	242
Doberman, ♀, 8 lat	Rak płaskonabłonkowy	77
Dog, ♂, 5 lat	Rak płaskonabłonkowy	335
Bokser, ♀, 10 lat	Rak gruczołów woszczynowych	118
Bokser, ♀, 10 lat	Rak gruczołów potowych	124
Owczarek niemiecki, ♂, 13 lat	Rak zatoki przyodbytowej	228
Mieszaniec, ♂, 12 lat	Rak zatoki przyodbytowej	262
Dog, ♀, 11 lat	Obłoniak	128
Owczarek niemiecki, ♂, 7 lat	Obłoniak	218
Mieszaniec, ♂, 9 lat	Obłoniak	280
Sznaucer, ♂, 6 lat	Obłoniak	63
Mieszaniec, ♂, 12 lat	Guz z komórek tłuszcznych	128
Bokser, ♂, 7 lat	Guz z komórek tłuszcznych	263
Owczarek kaukaski, ♀, 8 lat	Guz z komórek tłuszcznych	231
Mieszaniec, ♂, 13 lat	Guz z komórek tłuszcznych	276
Mieszaniec, ♂, 11 lat	Guz z komórek tłuszcznych	260
Doberman, ♂, 8 lat	Guz z komórek tłuszcznych	330
Mieszaniec, ♂, 10 lat	Guz z komórek tłuszcznych	280
Dalmatyńczyk, ♂, 5 lat	Guz z komórek tłuszcznych	158
Sznaucer, ♂, 11 lat	Czerniak	110
Mieszaniec, ♀, 9 lat	Rak podstawnokomórkowy	243
Spaniel, ♂, 10 lat	Rak podstawnokomórkowy	264

F VIII wykorzystano system komputerowo wspomaganą analizę obrazu mikroskopowego (ryc. 3-5). W dziesięciu polach widzenia liczono naczynia i określano średnią przypadającą na 1 mm².

W celu określenia istotnej zależności między liczbą naczyń stwierdzoną w guzach niezłośliwych i złośliwych przeprowadzono analizę statystyczną z zastosowaniem testu Manna-Whitneya.

Wyniki i omówienie

Badanie histopatologiczne zebranych guzów pozwoliło na rozróżnienie dwóch grup: I – nowotwory złośliwe (tab. 2), II – nowotwory niezłośliwe (tab. 3). U 29 psów proces nowotworowy miał charakter złośliwy, co stanowiło 69%. Guzy niezłośliwe stwierdzono w 13 przypadkach (31%). W grupie I rozpoznano: guza z komórek tłuszcznych (8 przypadków), mięsaka wrzeciono-



Ryc. 1. Średnia gęstość naczyń w nowotworach złośliwych skóry i tkanki podskórnej

watokomórkowego (4), włókniakomięsaka (2), raka płaskonabłonkowego (4), obłoniaka (4), raka podstawnokomórkowego (2), raka zatoki przyodbytowej (2), raka gruczołów potowych (1), raka gruczołów woszczynowych (1), czerniaka (1). Grupę II stanowiło: 9 włókniaków i 4 nabłoniaki z gruczołów łojowych.

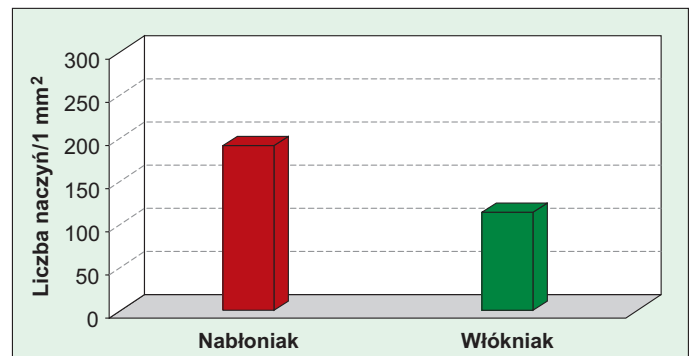
W grupie I średnia arytmetyczna liczba naczyń krwionośnych wynosiła 190/mm². Najmniejszą liczbę naczyń (63) stwierdzono w obłoniaku, natomiast najwięcej naczyń (335) występowało w raku płaskonabłonkowym. Podobny wynik otrzymano w guzach komórek tucznych, gdzie największa liczba naczyń wynosiła 330/mm². Najbardziej niejednorodną grupę pod względem gęstości naczyń stanowiły obłoniaki. Liczba naczyń w tych guzach wahała się od 63 do 280. W większości guzów z komórek tucznych, rakach zatoki przyodbytowej, guzach podstawnokomórkowych i rakach płaskonabłonkowych średnia gęstość naczyń wyniosła ponad 200/mm² powierzchni guza. W obłoniakach zanotowano średnią wartość 172, w pozostałych nowotworach wahała się w granicach 108-124 (tab. 2).

Średnią gęstość naczyń w poszczególnych typach nowotworów złośliwych skóry i tkanki podskórnej przedstawia ryc. 1.

W grupie II, stanowiącej guzy niezłośliwe, średnia gęstość naczyń wyniosła 138/mm². Najmniejszą liczbę naczyń (58) zanotowano we włókniaku, a największą (222) w nabłoniaku z gruczołów łojowych. Średnia arytmetyczna liczby naczyń we włókniakach wyniosła 115/mm², a w nabłoniakach z gruczołów łojowych 192/mm² (tab. 3). Średnią liczbę naczyń w nowotworach niezłośliwych obrazuje ryc. 2.

Przeprowadzone badania wykazały, że w nowotworach niezłośliwych skóry i tkanki podskórnej liczba naczyń w 1 mm² guza była znacznie mniejsza niż w nowotworach złośliwych. Były to różnice statystycznie istotne.

Proces nowotworowy u psów bardzo często ma charakter złośliwy. Potwierdzają to wcześniejsze, liczne doniesienia oraz wyniki badań własnych. Prace wielu autorów (6, 10, 16, 17) i przeprowadzone badania wskazują, że najczęściej u psów występują nowotwory skóry i tkanki podskórnej (NSiTP). W badaniach własnych największy odsetek złośliwych NSiTP sta-



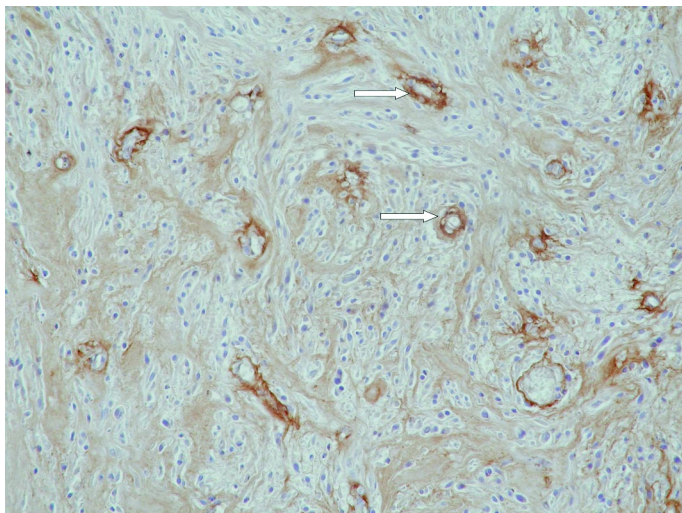
Ryc. 2. Średnia gęstość naczyń w nowotworach niezłośliwych skóry i tkanki podskórnej

Tab. 3. Nowotwory niezłośliwe skóry i tkanki podskórnej

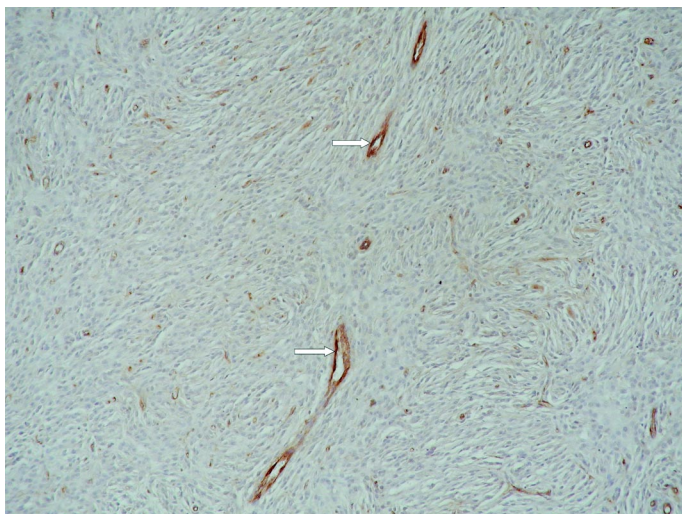
Opis psa	Rozpoznanie histopatologiczne	Gęstość naczyń na mm ²
Rottweiler, ♀, 8 lat	Włókniak	83
Jamnik, ♂, 8 lat	Włókniak	156
Rottweiler, ♀, 9 lat	Włókniak	106
Bokser, ♂, 4 lata	Włókniak	162
Bokser, ♀, 11 lat	Włókniak	157
Rottweiler, ♀, 8 lat	Włókniak	82
Mieszaniec, ♂, 14 lat	Włókniak	152
Rottweiler, ♀, 7 lat	Włókniak	58
Rottweiler, ♀, 8 lat	Włókniak	77
Rottweiler, ♂, 3 lata	Nabłoniak z gr. łojowych	220
Spaniel, ♂, 10 lat	Nabłoniak z gr. łojowych	222
Owczarek collie, ♀, 10 lat	Nabłoniak z gr. łojowych	127
Mieszaniec, ♀, 11 lat	Nabłoniak z gr. łojowych	198

nowił guz komórek tucznych – 27%. Według niektórych badaczy, występuje on często u psów i stanowi 10-20% wszystkich nowotworów skóry (17, 20). W badanym materiale własnym duży procent stanowił rak płaskonabłonkowy, mięsak wrzecionowatokomórkowy i obłoniak. Grupę nowotworów niezłośliwych stanowiło 9 przypadków włókniaka i 4 przypadki nabłoniaka.

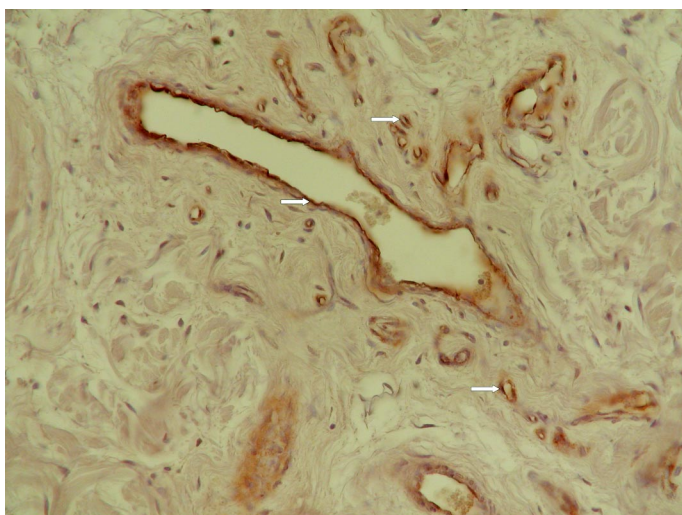
Szczególną rolę w rozwoju nowotworu odgrywa angiogeneza. Inwazyjny wzrost guza związany jest



Ryc. 3. Włókniakomięsak skóry i tkanki podskórnej – barwienie immunohistochemiczne, powiększenie 200 ×, (naczynia krwionośne oznaczone strzałkami)



Ryc. 4. Obłoniak skóry i tkanki podskórnej – barwienie immunohistochemiczne, powiększenie 200 ×, (naczynia krwionośne oznaczone strzałkami)



Ryc. 5. Włókniak skóry i tkanki podskórnej – barwienie immunohistochemiczne, powiększenie 600 ×, (naczynia krwionośne oznaczone strzałkami)

z pojawieniem się naczyń krwionośnych w obrębie zmiany, które poprawiają utlenowanie komórek guza i ułatwiają zaopatrywanie w substancje niezbędne do ich rozplemu (1, 13, 21, 23). Naczynia krwionośne nowotworów pierwotnych wywodzą się z dwóch źródeł. Pierwsze stanowi morfologicznie i czynnościowo dojrzałe naczynie gospodarza, natomiast drugim są nowe naczynia krwionośne wytworzone w procesie angiogenezy (18). Liczba kapilar przypadająca na 1 mm² guza jest około 10-krotnie większa niż w tkankach prawidłowych. Najwięcej naczyń znajduje się na obrzeżach guza (8). W fazie beznacyniowej rozrost guza odbywa się wolno. Nowotwór szybko indukuje rozwój kapilar, jeżeli jest zlokalizowany nie dalej niż 2-3 mm od najbliższego naczynia (8).

W 1979 r. wykazano, że szybkość powstawania naczyń oraz ich liczba zależy od złośliwości nowotworu i tempa wzrostu jego masy (12). W nowotworach niezłośliwych naczynia wytwarzają się wolno i są anatomicznie podobne do naczyń prawidłowych. Nowotwory złośliwe tworzą sieć naczyń dużo szybciej, lecz ściany kapilar wykazują zaburzenia w budowie. Posiadają wiele nietypowych rozgałęzień, pętli i połączeń (13). Charakteryzują się one cienką ścianą, przerwami w błonie podstawnej, niewielką liczbą komórek mięśni gładkich lub ich brakiem oraz wzmożoną przepuszczalnością (8, 13, 22).

Wykazana w badaniach własnych największa średnia liczba naczyń występowała w nowotworach złośliwych skóry i tkanki podskórnej, i wynosiła około 190/mm². W nowotworach niezłośliwych skóry i tkanki podskórnej badana średnia gęstość naczyń wyniosła 138/mm². Z przeprowadzonych badań wynika, że liczba kapilar w guzach o charakterze złośliwym jest większa niż w guzach niezłośliwych. Test Manna-Whitneya potwierdził występowanie istotnych różnic statystycznych ($p < 0,001$) między liczbą naczyń w nowotworach złośliwych i niezłośliwych. Liczba naczyń w guzach niezłośliwych była mniejsza o około 21% w porównaniu ze złośliwymi. Jest to wynik sprzeczny z danymi Gacki (8), który wykazał, że liczba kapilar w nowotworach niezłośliwych nie przekracza 25% liczby naczyń nowotworów złośliwych.

Opublikowano wiele prac z zakresu angiogenezy w nowotworach u ludzi. Prowadzi się badania nad możliwością zastosowania oceny angiogenezy w nowotworze i wykorzystania jej jako czynnika prognostycznego (22, 24). Przyjmuje się, że guzy lite bez sieci powstających naczyń nie są w stanie przekroczyć wielkości kilku mm³ (15). Stwierdzono, że gęstość kapilar w tych guzach jest wskaźnikiem prognozującym inwazyjny przebieg choroby nowotworowej z przerzutami (2).

W piśmiennictwie weterynaryjnym pojawia się coraz więcej publikacji uznających gęstość naczyń za nowy czynnik prognostyczny w ocenie złośliwości i potencjału wzrostu raków płaskonabłonkowych skóry u psów (14). Podobne wyniki u tego gatunku zwierząt

otrzymano w badaniach guzów komórek tucznych skóry (19). Stwierdzono znaczącą statystycznie różnicę ($p = 0,0002$) gęstości naczyń w guzach o większej złośliwości. Odmienne wyniki uzyskał Graham i wsp. (11). Mimo stwierdzenia korelacji między liczbą naczyń a złośliwością nowotworów, nie wykazali oni różnic w unaczynieniu między nowotworami złośliwymi bez przerzutów a nowotworami niezłośliwymi. Brak zależności między rozwojem naczyń guza i stopniem złośliwości zanotowano w raku podstawnkomórkowym skóry u ludzi (4). Niektórzy autorzy (3) podają, że nie ma zależności pomiędzy gęstością naczyń i stopniem zaawansowania klinicznego guzów jajnika. Wykazują oni brak różnic statystycznych w unaczynieniu guzów złośliwych i niezłośliwych.

Należy przypuszczać, że wykazana w badaniach własnych duża gęstość naczyń ($218-335/\text{mm}^2$), stwierdzana w raku płaskonabłonkowym skóry i tkanki podskórnej, może zostać uznana za marker histologicznego stopnia złośliwości. Podobne wyniki otrzymano w nowotworach skóry i tkanki podskórnej – guzach komórek tucznych, rakach podstawnkomórkowych i nowotworach zatoki przyodbytowej, gdzie średnia liczba naczyń wynosiła około $240/\text{mm}^2$. Należy sądzić, że dla wymienionych rodzajów nowotworów angiogeneza ma wartość diagnostyczną i prognostyczną oraz może być wykorzystywana do określania stopnia złośliwości i potencjału przerzutowego guza.

Piśmiennictwo

1. Cavallaro U., Christofori G.: Molecular mechanisms of tumors angiogenesis progression. *J. Neurooncol.* 2000, 50, 63-70.
2. Cygan Z., Cygan W.: Angiogeneza w nowotworach złośliwych, strategie antyangiogenne i niszczenia naczyń krwionośnych. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 1030-1033.
3. Czekerowski A.: Badania nad angiogenezą w łagodnych i złośliwych guzach jajnika przy zastosowaniu ultrasonografii z kolorowym Dopplerem oraz oceny stężeń śródbłonkowego czynnika wzrostu i wybranych markerów nowotworowych: CA-125, CA-19.9, CA-72.4 i VEGF. Rozprawa hab., AM Lublin 1996.
4. Eckert A. W., Maurer P., Lautner M., Meyer L., Schubert J.: Micro vessel density as an indicator of invasive growth pattern in basal cell carcinoma. *Int. Poster. J. Dent. Oral. Med.* 2003, 5, Poster 205.
5. Fidler I. J., Ellis L. M.: Neoplastic angiogenesis – not all blood vessels are created equal. *N. Engl. J. Med.* 2004, 351, 215-216.
6. Finnie J. W., Bostock D. E.: Skin neoplasia in dogs. *Aust. Vet. J.* 1979, 55, 602-604.
7. Folkman J.: Clinical applications of research on angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 1995, 333, 1757-1763.
8. Gacko M.: Angiogeneza i metody jej oceny. *Diagn. Lab.* 1997, 33, 375-394.
9. Gawrychowski K., Barcz E., Kamiński P.: Angiogeneza w raku jajnika. *Nowotwory* 1997, 47, 775-784.
10. Goldschmidt M. H., Shofer F. S.: *Skin Tumors of the Dog and Cat.* Pergamon Press, Oxford 1992.
11. Graham J. C., Myers R. K.: The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *J. Vet. Intern. Med.* 1999, 13, 416-418.
12. Hirst D. G., Denekamp J.: Tumor cell proliferation in relation to the vasculature. *Cell Tissue Kinet.* 1979, 12, 31.
13. Hucz J., Szala S.: Receptor VEGF-2 – cel terapii kierowanej w chorobach nowotworowych. *Współczesna Onkologia* 2006, 10, 506-514.
14. Maiolino P., Papparella S., Restucci B., De Vico G.: Angiogenesis in squamous cell carcinomas of canine skin: an immunohistochemical and quantitative analysis. *J. Comp. Pathol.* 2001, 125, 117-121.
15. Malecki M., Gromek K., Przybyszewska M., Janik P.: Plazmidowy wektor ekspresyjny kodujący receptor sFLT-1 (psFLT-1) ogranicza angiogenezę i wzrost guzów L1. *Współczesna Onkologia* 2006, 4, 145-151.
16. Morris J., Dobson J.: *Small Animal Oncology.* Black Science Ltd., London 2001.
17. Morrison W.: *Cancer in Dogs and Cats.* Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore 1998.
18. Olszewski E., Miodoński A. J.: Badania nad unaczynieniem guzów – angiogeneza – zagadnienie nadal aktualne. *Terapia* 2000, 9, 94-99.
19. Preziosi R., Sarli G., Paltrinieri M.: Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumors of the dogs. *J. Comp. Pathol.* 2004, 130, 143-151.
20. Sapieryński R., Sapieryńska E.: Nowotwory skóry i tkanki podskórnej u psów i kotów. Część I. Guz komórek tucznych. *Życie Wet.* 2000, 80, 283-289.
21. Singh Y.: Tumor angiogenesis: clinical implications. *Nepal J. Neurosci.* 2004, 1, 61-63.
22. Skrzypczak M.: Znaczenie angiogenezy w przebiegu chorób nowotworowych i nienowotworowych. *Magazyn Wet.* 2005, 14, 20-22.
23. Szala S., Radzikowski Cz.: Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów. *Nowotwory* 1997, 47, 1-19.
24. Świdzińska E., Naumnik W., Chyczewska E.: Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2006, 74, 414-420.

Adres autora: dr Aleksandra Sobczyńska-Rak, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin; e-mail: olsob@poczta.onet.pl