

Angiogeneza w nowotworach złośliwych śledziony u psów

ALEKSANDRA SOBCZYŃSKA-RAK, PIOTR SILMANOWICZ, ELŻBIETA SOBOLEWSKA*

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

*Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej UM, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin

Sobczyńska-Rak A., Silmanowicz P., Sobolewska E.

Angiogenesis in malignant spleen cancers in dogs

Summary

The aim of the study was to determine the level of vascularization of neoplastic and healthy splenic parenchyma tissue in dogs. The first research group comprised spleen samples with diagnosed tumor changes extracted during splenectomy. Four male and five female dogs, aged between 8 and 13 years and of various races, were operated on. The second group comprised 10 samples of healthy spleen tissue extracted post-mortem. After staining with haematoxylin and eosin, the samples were diagnosed and the tumor type classified according to the official WHO classification. In order to render the vascular endothelium visible, immunohistochemical staining was performed with the use of the polyclonal antibody against the von Willebrand factor F VIII and the DAKO EnVision system. Angiogenesis that was observed in malignant spleen cancer tissue was intensified in comparison to that in healthy perenchyma tissue. The mean vascular density observed in malignant splenic tumors was 87 capillary vessels/mm². The mean vessel density was 60/mm² in lymphomas, while in angiosarcomas it averaged 108/mm². In healthy splenic tissue the observed mean vascular density was 14 vessels/mm². The highest vascular density was noted in tumors with metastases to other abdominal cavity organs (mean – 132 vessels/mm²). The observations may provide practitioners with a valuable prognostic insight into the potential danger of metastasis.

Keywords: angiogenesis, tumour, spleen, dog

Angiogeneza (neowaskularyzacja, naczyniotworzenie) jest procesem wieloetapowym, prowadzącym do powstania nowych naczyń krwionośnych na bazie istniejących naczyń gospodarza zarówno w tkankach zdrowych, jak i nowotworowych (10). Fizjologiczna angiogeneza występuje w okresie embriogenezy, owulacji, ciąży oraz podczas gojenia ran i pozostaje pod ścisłą kontrolą czynników aktywujących lub hamujących podziały komórek endotelialnych (1, 10, 17). Jest procesem samoograniczającym w tkankach prawidłowych, podczas gdy w tkankach patologicznie zmienionych komórki śródbłonna dzielą się 20-2000 razy szybciej i przeżywają znacznie dłużej (6).

Naczyniotworzenie stanowi także ważny element patogenezy wielu chorób. Wykazano jego znaczenie w rozwoju takich chorób, jak: łuszczyca, reumatoidalne zapalenie stawów, zapalenie naczyń, schorzenia gastrologiczne (nieswoiste zapalenie jelit, zapalenie błony śluzowej żołądka), miażdżyca, choroba niedokrwienna serca oraz cukrzyca (2, 10, 20). Zasadniczą rolę angiogeneza odgrywa w rozwoju chorób nowotworowych (1, 6, 10, 15, 17, 19, 20).

Folkman (4) stwierdził, że guz w początkowej fazie jest odżywiany drogą dyfuzji i może przetrwać w stadium przedinwazyjnym przez wiele miesięcy. Stan taki może trwać do czasu, aż w pewnej grupie komórek pojawi się fenotyp angiogeny i proces angiogenezy wymyka się spod mechanizmów kontrolnych. Dochodzi do stałego uwalniania przez komórki guza czynników stymulujących komórki śródbłonna do proliferacji i tworzenia nowej kapilary (17).

Celem badań było określenie stopnia unaczynienia tkanek nowotworowych oraz tkanek prawidłowych mięszu śledziony psów.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły śledziony pobrane od psów leczonych w Katedrze i Klinice Chirurgii Zwierząt UP w Lublinie. Pierwszą grupę stanowiły śledziony ze zmianami patologicznymi, pobrane podczas splenektomii (ryc. 1, 2). Operowano 4 samice i 5 samców w wieku 8-13 lat, różnych ras: rottweiler – 2, owczarek niemiecki – 2, mieszaniec – 2 oraz owczarek collie, spaniel i jamnik. Psy nie były wcześniej leczone z powodu choroby nowotworowej.



Ryc. 1. Naczyniakomięsak śledziony – obraz śródoperacyjny



Ryc. 2. Chłoniak złośliwy – obraz śródoperacyjny

We wszystkich przypadkach właściciele informowali o zaburzeniach w przyjmowaniu pokarmu i nagłej utracie masy ciała zwierzęcia. U 50% osobników objawem dominującym były uporczywe wymioty. Badanie rtg i/lub usg w 2 przypadkach wykazało nowotworowe ogniska przerzutowe w wątrobie, w jednym – zmiany w płucach, u innego osobnika wykazano obecność przerzutów w trzustce i jelitach. Zmiany nowotworowe obejmujące wyłącznie mięsz śledziony stwierdzono u 6 psów.

Drugą badaną grupę (10 próbek) stanowiły prawidłowe tkanki śledziony pobrane podczas sekcji od psów poddanych eutanazji z powodu chorób innych niż nowotworowe.

Materiał po splenektomii dostarczano 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 według obowiązującej klasyfikacji WHO. W celu uwidocznienia śródbłonka

naczyń wykonano barwienie immunohistochemiczne z zastosowaniem poliklonalnego przeciwciała przeciwko czynnikowi von Willebranda F VIII przy użyciu systemu EnVision firmy DAKO.

Identyczną procedurę zastosowano do barwienia preparatów z tkanek śledziony prawidłowej. Wybarwione preparaty oceniano w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej UM w Lublinie. Do ilościowej oceny naczyń krwionośnych wykazujących ekspresję czynnika F VIII wykorzystano system komputerowo wspomaganą analizę obrazu mikroskopowego. W dziesięciu polach widzenia liczono naczynia i określano średnią liczbę naczyń przypadającą na 1 mm².

Wyniki i omówienie

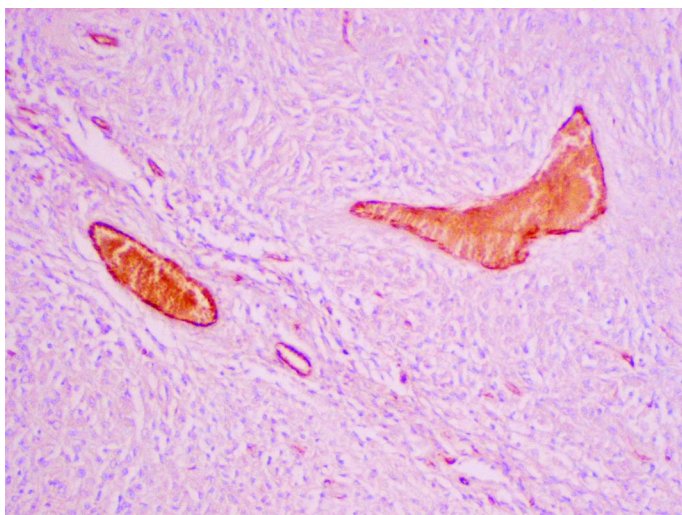
Wyniki badania histopatologicznego i immunohistochemicznego podano w tab. 1.

Badanie histopatologiczne potwierdziło złośliwy charakter wszystkich nowotworów. W 5 przypadkach rozpoznano naczyniakomięsaka (*haemangiosarcoma*), a w 4 chłoniaka złośliwego (*lymphosarcoma*).

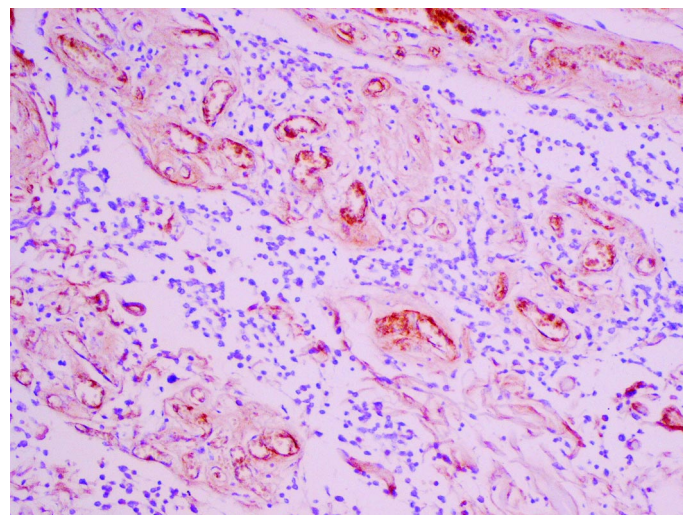
Badanie immunohistochemiczne (ryc. 3, 4). Średnia gęstość naczyń w nowotworach złośliwych śledziony wyniosła 87 kapilar/mm². Największą liczbę naczyń stwierdzono w 2 naczyniakomięsach – wynosiła ona 183 i 162 naczynia/mm² powierzchni guza. W pozostałych 3 naczyniakomięsach gęstość naczyń wahała się w granicach 48-96/mm². W chłoniakach liczba naczyń była mniejsza i wyniosła średnio 60/mm². W tkance pobranej z niezmienionych nowotworowo śledzion średnia gęstość naczyń wyniosła 14 naczyń/1 mm² powierzchni guza (ryc. 5). Najwięcej naczyń stwierdzono w tkance nowotworowej 4 osobników, u których występowały przerzuty do innych narządów. W przypadkach tych zanotowano wyniki od 88 do 183

Tab. 1. Charakterystyka pacjentów i wyników badań

| Opis psa | Rozpoznanie histopatologiczne | Przerzuty | Gęstość naczyń/mm ² |
|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Rottweiler, ♂, 9,5 r | naczyniakomięsak (haemangiosarcoma) | liczne w jelitach, trzustce | 183 |
| Mieszaniec, ♂, 11 l | chłoniak (lymphosarcoma) | liczne w płucach | 88 |
| Owczarek niemiecki, ♂, 8 l | chłoniak (lymphosarcoma) | brak | 62 |
| Owczarek collie, ♀, 12 l | chłoniak (lymphosarcoma) | brak | 30 |
| Mieszaniec, ♀, 13 l | naczyniakomięsak (haemangiosarcoma) | brak | 48 |
| Spaniel, ♀, 10 l | naczyniakomięsak (haemangiosarcoma) | brak | 52 |
| Owczarek niemiecki, ♀, 9 l | naczyniakomięsak (haemangiosarcoma) | wątroba | 96 |
| Rottweiler, ♂, 11 l | naczyniakomięsak (haemangiosarcoma) | wątroba | 162 |
| Jamnik, ♂, 10 l | chłoniak (lymphosarcoma) | brak | 60 |



Ryc. 3. Prawidłowy mięsz śledziony – barwienie immunohistochemiczne, powiększenie 600 × (rycina przedstawia 9 wybarwionych naczyń krwionośnych)



Ryc. 4. Naczyniakomięsak – barwienie immunohistochemiczne, powiększenie 200 × (rycina przedstawia 41 wybarwionych naczyń krwionośnych)

(średnio 132) kapilar/mm². Mniejsze nasilenie angiogenezy wykazano w guzach bez przerzutów, a najmniejszą liczbę kapilar stwierdzono w zdrowym mięszu śledziony (ryc. 6).

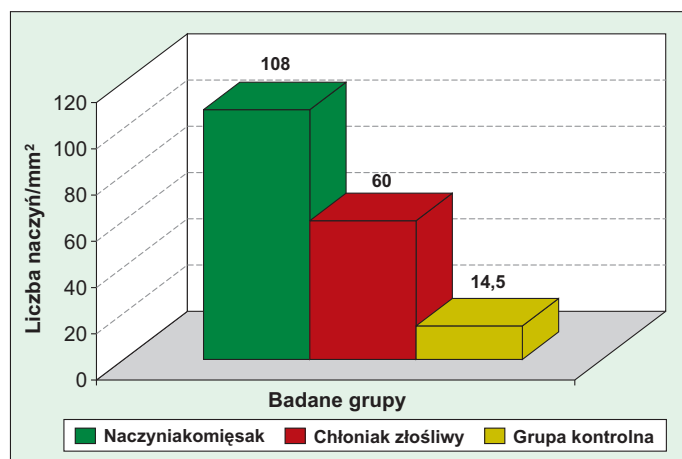
Nowotwory śledziony rozpoznawane są u psów coraz częściej. Mogą rozwijać się jako guzy pierwotne lub przerzutowe. Do najczęściej stwierdzanych nowotworów złośliwych śledziony u zwierząt mięsożernych należą: naczyniakomięsaki (*haemangiosarcomata*), chłoniaki złośliwe (*lymphosarcomata*) i mięsaki (*sarcomata*), rzadziej spotyka się nowotwory niezłośliwe: tłuszczaki i mięśniaki (11).

Naczyniakomięsaki są nowotworami wywodzącymi się z komórek śródbłonka naczyń krwionośnych (3). Predysponowanymi rasami są: owczarki niemieckie, retrievery, dogi, bokserzy, setery angielskie i mieszance (3, 11). Guzy pojawiają się zazwyczaj u osobników starszych, w wieku 8-13 r. ż. (1, 8, 13, 14, 18). Rosną one w postaci szarych lub czerwono-czarnych pojedynczych lub mnogich guzów. Należą do guzów wolno rosnących i mogą do momentu rozpoznania

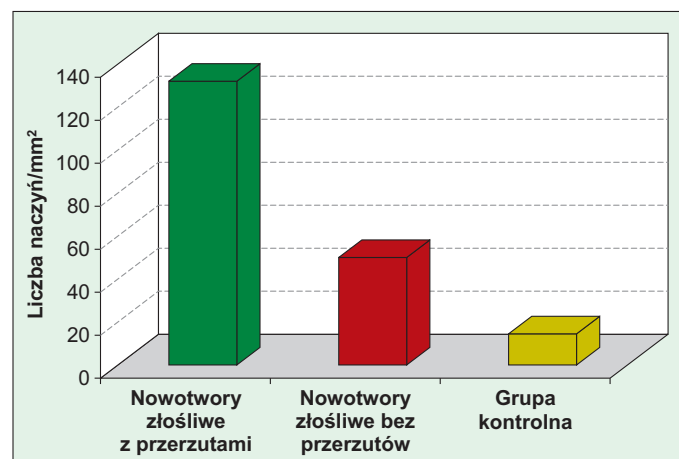
osiągnąć rozmiary od kilku milimetrów do kilkunastu centymetrów. Często w masie nowotworu stwierdza się ogniska martwicy i wylewy krwawe (11, 14). Przerzuty przy naczyniakomięsakach pojawiają się głównie w wątrobie i płucach. Średni czas przeżycia psów po splenektomii wynosi 4-5 miesięcy (1, 5, 8, 11, 18).

Chłoniaki złośliwe śledziony wywodzą się z limfocytów. Znaczne powiększenie śledziony i rozrost nowotworowy pojawiają się zwykle w postaci wielogniskowej chłoniaka i wówczas zmiany chorobowe dotyczą także węzłów chłonnych, wątroby oraz szpiku kostnego (11, 13, 16). Mogą występować w różnych grupach wiekowych, ale najczęściej dotyczą psów w wieku średnim. W przypadku zaawansowanej wielogniskowej postaci chłoniaka limfatycznego obraz kliniczny jest bardzo zróżnicowany. Mogą go charakteryzować niespecyficzne objawy żołądkowo-jelitowe oraz zaburzenia układu krwiotwórczego (15).

Trzecim typem nowotworu rozpoznawanym w mięszu śledziony są mięsaki. Do grupy tej należą: włókniakomięsaki, mięsaki histiocytarne oraz mięsaki nie-



Ryc. 5. Porównanie średniej gęstości naczyń w badanych grupach



Ryc. 6. Porównanie angiogenezy w nowotworach złośliwych, nowotworach złośliwych z przerzutami i grupie kontrolnej

zróznicowane. Występują one najczęściej w postaci pojedynczych guzków uwypuklających się nad powierzchnię narządu (11, 13).

Objawy kliniczne guzów śledziony zależą od ich lokalizacji i wielkości. Często guz rozpoznawany jest przypadkowo podczas omacywania jamy brzusznej lub badania radiologicznego. Nowotwory śledziony mogą wywoływać objawy niespecyficzne, tj.: osłabienie, powiększenie objętości brzucha, wymioty, błądź błon śluzowych, znaczne wychudzenie, zaburzenia krążeniowe i oddechowe oraz zmiany hematologiczne, takie jak: leukocytoza, anemia lub trombocytopenia (7-9, 11). W przypadku pęknięcia guzów zlokalizowanych w śledzionie może dojść do śmierci zwierzęcia wśród objawów wstrząsu (13, 14). Po potwierdzeniu rozpoznania na podstawie badania rtg lub usg postępowaniem z wyboru jest splenektomia (7, 11, 14).

Tworzenie naczyń w guzie jest procesem warunkującym jego dalszy rozwój i zwiastuje początek objawów choroby nowotworowej (17). Ocena unaczynienia guzów wykorzystywana jest w prognozowaniu, terapii oraz ocenie efektów leczenia nowotworów. Do badania nasilenia angiogenezy wykorzystywana jest metoda polegająca na znakowaniu śródbłonna naczyniowego, przy użyciu różnych typów przeciwciał. Po wybarwieniu określa się gęstość mikronaczyń (microvessel density – MVD) (7, 12, 18, 19). W przeprowadzonych badaniach użyto poliklonalnego przeciwciała przeciwko czynnikowi von Willebranda F VIII (15). Wykazano znacznie większą gęstość naczyń w nowotworach złośliwych śledziony w porównaniu z niezmiennym chorobowo mięszem narządu. Największą gęstość naczyń stwierdzano w naczyniakomięsakach z przerzutami do narządów jamy brzusznej (średnio 132 naczynia/mm²).

Do chwili obecnej udowodniono wzmożenie procesu angiogenezy podczas rozwoju guzów litych: piersi, krtani, gruczołu krokowego, pęcherza moczowego, płuc i jelita grubego u ludzi. Wykazano, że jest ona związana ze stopniem zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej, częstością pojawiania się przerzutów i rokowaniem (6, 10, 12, 15, 17).

We wcześniejszych badaniach własnych (15) potwierdzono wartość diagnostyczną i prognostyczną angiogenezy w nowotworach złośliwych skóry i tkanki podskórnej u psów. Wykazano, że duża gęstość naczyń (218-335/mm²) w raku płaskonabłonkowym, guzach komórek tucznych i nowotworach zatoki przyodbytovej może zostać uznana za marker histologicznego stopnia złośliwości (15). Od niedawna trwają badania nad rolą powstawania naczyń w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego. Wykazano nasilenie angiogenezy w początkowym okresie przewlekłej białaczki limfoblastycznej u dzieci. W badanej grupie gęstość naczyń uległa znacznemu zmniejszeniu w okresie remisji, lecz nie miała statystycznie istotnego wpływu na rokowanie (12). Podczas badań pa-

cjentów ze szpiczakiem plazmocytowym i chłoniakiem złośliwym wykazano nasiloną neowaskularyzację, która jednak nie korelowała ze zwiększonym naciekiem nowotworowym i rokowaniem (6).

Dane piśmiennictwa oraz badania własne pozwalają zatem wysunąć hipotezę, że nasilenie angiogenezy może stanowić wskazówkę dla lekarza weterynarii odnośnie do tendencji pojawiania się przerzutów w innych narządach, szczególnie w okresie pooperacyjnym. Natomiast przed rozpoczęciem leczenia określenie gęstości mikronaczyń (microvessel density – MVD) może stanowić wartościową informację w ocenie rokowania rozwoju choroby nowotworowej.

Piśmiennictwo

- Akhtar N., Padilla M. L., Dickerson E. B., Steinberg H., Breen M., Auerbach R., Helfand S. C.: Interleukin-12 inhibits tumor growth in a novel angiogenesis canine hemangiosarcoma xerograf model. *Neoplasia* 2004, 6, 106-116.
- Carmeliet P., Jain R. K.: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000, 407, 249-257.
- De Lorimier L. P., Kitchell B. E.: Leczenie pacjentów z naczyniakomięsakiem krwionośnym. *Weterynaria po Dyplomie* 2003, 4, 16-24.
- Folkman J.: Clinical applications of research on angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 1995, 333, 1757-1763.
- Fosmire S. P., Dickerson E. B., Scott A. M., Bianco S. R., Pettengill M. J., Meylemans H., Padilla M., Frezer-Abel A. A., Akhtar N., Getzy D. M., Wojcieszyn J., Breen M., Helfand S. C., Modiano J. F.: Canine malignant hemangiosarcoma as a model of primitive angiogenic endothelium. *Lab. Invest.* 2004, 84, 562-572.
- Grosicki S., Grosicka A., Hołowiecki J.: Kliniczne znaczenie angiogenezy i czynników ją modyfikujących w onkohematologii. *Wiad. Lek.* 2007, 60, 39-46.
- Gülbahar M. Y., Güvenc T., Besalti O.: Splenic hemangiosarcoma with abdominal dissemination in a dog. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.* 1998, 22, 459-463.
- Johnson K. A., Powers B. E., Withrow S. J., Sheetz M. J., Curtis C. R., Wrigley R. H.: Splenomegaly in dogs. Predictors of neoplasia and survival after splenectomy. *J. Vet. Intern. Med.* 1989, 3, 160-166.
- Kessler M., Maurus Y., Köstlin R.: Hemangiosarcoma of the spleen: clinical aspects in 52 dogs. *Tierarztl. Prax. Aug.* Klientiere 1997, 6, 651-656.
- Mizia-Malarz A., Sobol G., Woś H.: Angiogeneza w przewlekłych schorzeniach zapalnych i nowotworowych. *Pol. Merk. Lek.* 2008, 141, 185-189.
- Morris J., Dobson J.: *Small Animal Oncology*. Blackwell Science Ltd, London 2001.
- Owoc-Lempach J., Chybicka A.: Znaczenie angiogenezy w nowotworach występujących w populacji dziecięcej. *Okol. Pol.* 2006, 9, 87-92.
- Sapierzynski R., Malicka E., Bielecki W., Krawiec M., Osińska B., Sendek H., Sobczyk-Filipiak M.: Powiększenie śledziony u psów: przegląd 97 przypadków. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 88-71.
- Sapierzynski R., Sapierzynska E.: Nowotwory naczyniowe u psów i kotów. *Życie Wet.* 2005, 80, 36-40.
- Sobczyńska-Rak A.: Angiogeneza w nowotworach skóry i tkanki podskórnej. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 110-114.
- Sokolowska J.: Chłoniaki u psów. Część I. występowanie, objawy i etiologia. *Życie Wet.* 2005, 80, 162-165.
- Swidzińska E., Naumnik W., Chyczewska E.: Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2006, 74, 414-420.
- Warren A. L., Summers B. A.: Epithelioid variant of hemangioma and hemangiosarcoma in the dog, horse and cow. *Vet. Pathol.* 2007, 44, 15-24.
- Wolfesberger B., Tonar Z., Witter K., Guija de Arespocohaga A., Skalicky M., Walter I., Thalhammer G. F.: Microvessel density in normal lymph nodes and lymphomas of dogs and their correlation with vascular endothelial growth factor expression. *Res. Vet. Sci.* 2008, 1, 56-61.
- Zielonka T. M.: Angiogeneza – część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń. *Alergia Astma Immunologia* 2003, 8, 169-174.

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