

# ANGIOGENEZA ÎN CANCERUL PANCREATIC EXPERIMENTAL

I. ȘIMON<sup>1</sup>, R.TOGĂNEIU<sup>1</sup>, O. CEBOTARI<sup>1</sup>, O. FABLAN<sup>1</sup>, M. CAZACU<sup>1</sup>,  
E. RYSCHICH<sup>2</sup>, J. SCHMIDT<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Clinica Chirurgie IV, UMF Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, Romania

<sup>2</sup> Departamentul de Chirurgie, Universitatea Heidelberg, Germania

## Rezumat

Rezultatele tratamentului cancerului pancreatic sunt dezamăgitoare. Până în prezent singura posibilitate de tratament curativ rămâne rezecția pancreatică. Fără o rezecție potențial curativă, supraviețuirea la 5 ani a pacienților cu tumori pancreatice rezecabile este de numai 2-26%.

Lucrarea are ca scop studiul angiogenezei în cancerul pancreatic experimental, prin microscopie intravitală efectuată pe un lot de 16 șobolani Lewis.

Au fost identificate caracteristicile tipice ale vascularizației tumorale în cancerul de pancreas. S-a constatat dispariția anatomiei normale a arteriolei, capilarului și venulei, așa cum poate fi găsită în marea majoritate a țesuturilor sănătoase, inclusiv în pancreasul exocrin.

Densitatea vasculară a carcinomului pancreatic DSL6A a fost semnificativ scăzută. Creșterea tumorală continuă în experimentul de față a condus la creșterea discrepanței între vascularizația centrală și cea periferică a tumorii.

O altă caracteristică a morfologiei vasculare tumorale este diametrul neregulat al vaselor și pierderea ierarhiei vasculare. Această caracteristică apare în formele extreme, prin formarea de sinusoides și lacune vasculare.

Cuvinte cheie: cancer pancreatic, model, angiogeneză

## Summary. The angiogenesis in experimental pancreatic carcinoma

The results of treatment of pancreatic carcinoma are disappointing. Resection has up to now been the single possible way of curing it. Without potential curative resection only 2-25% of patients with resectable pancreatic cancer survive 5 years.

The paper aims to study angiogenesis in experimental pancreatic carcinoma investigated by intravital microscopy done to a group of 16 Lewis rats. Typical characteristics of the tumor microvasculature of pancreatic cancer were identified. The normal anatomy of arteriole, capillary and venule as it can be found in most healthy tissues including normal exocrine pancreas had disappeared. The vessel density of the pancreatic carcinoma DSL6A after intrapancreatic implantation was significantly lower. The continuing tumor growth in the present experiment led to a increasing discrepancy between the central and peripheral vascularisation of the tumor.

Another characteristic of the morphology of the tumor vasculature is its irregular diameter and the loss of vessel hierarchy. This is indicated in extreme forms by the formation of sinusoids and lacunas.

**Key words:** pancreatic cancer, model, angiogenesis

## Introducere

În ciuda importanței epidemiologice și oncologice a cancerului de pancreas, până în momentul de față nu există date despre angiogeneză drept pentru care în acest studiu este descris un cancer pancreatic experimental, care permite investigarea unor aspecte ale angiogenezei. Lucrarea de față intenționează să răspundă la următoarele întrebări:

1. ce trăsături caracterizează morfologia vasculară a cancerelor pancreatice experimentale?
2. localizarea tumorii (ortotopice sau heterotopice) influențează gradul de creștere tumorală și apoptoza?

## Metode

În carcinomul pancreatic la șobolani a fost utilizată o linie celulară prestabilită (DSL6A). Din punct de vedere histologic, acesta este un cancer desmoplazic care mimează un cancer pancreatic uman, în contrast cu morfologia acinară a celor mai multe tipuri de tumori pancreatice exocrine la șobolani<sup>(1)</sup>.

S-au utilizat 16 șobolani rasa Lewis de sex masculin (160-180 g), fiecare dintre ei fiind anesteziat cu pentobarbital 10 mg/kg (Nembutal, Sanofi, Germania), administrat intraperitoneal și ketamină 40 mg/kg (Ketanest, Parke Davis, Berlin, Germania), administrată intramuscular. După incizia mediană abdominală, au fost aplicate două plăcuțe sterile de polimetilmetacrilat (PMMA) (diametru 11 mm, Glasflex, Stirling, NJ,

SUA) prin tehnica “sandwich” pe ambele părți ale capului pancreatic (implantare ortotopică) precum și în peritoneu și pe stratul muscular abdominal, imediat sub piele (implantare heterotopică). Plăcuțele au fost atașate prin suturi fine cu polipropilen 5/0 (Prolene, Ethicon, Norderstedt, Germania).

PMMA este un material biocompatibil utilizat în oftalmologie și urologie<sup>0</sup>. Distanțele standard de 3 mm între cele două plăcuțe de PMMA au fost menținute de 3 tuburi fine de silicon (diametru 0,8 mm). A fost recoltat aproximativ 1 mm<sup>3</sup> de țesut tumoral dintr-o tumoră primară a unui șobolan și implantată în pancreas sau intraperitoneal, între cele două plăcuțe.

Abdomenul a fost închis, iar animalele au fost trezite. Microscopia intravitală a fost efectuată la 4 săptămâni după inoculare. Tumora a fost de aproximativ 4-6 mm în diametrul maxim, împrejmuită de plăcuțe la acel moment. Atât ariile centrale cât și cele periferice au fost accesibile examenului microscopic intravital.

După 4 săptămâni, toate animalele au fost reanesteziate așa cum s-a descris anterior. Un cateter de teflon (diametrul intern 0,5 mm, B.Braun AG, Melsungen, Germania) a fost introdus în vena jugulară internă pentru abord venos. Un alt cateter a fost plasat în artera carotidă stângă pentru recoltări sanguine și monitorizarea parametrilor cardiovasculari.

Abdomenul a fost deschis printr-o incizie mediană. Animalul a fost plasat într-un loc special și menținut artificial la 37°C.

Tumora a fost identificată macroscopic. Suprafața portantă a tumorii a fost imobilizată într-o cameră de imersie cu temperatură controlată (37°C) ce conține soluție Ringer.

Întreaga etapă de microscopie intravitală a fost efectuată cu un microscop fluorescent (Leica GmbH, Wetzlar, Germania). Au fost folosite 2 blocuri de filtre fluorescente: I3 (filtru de excitație BP450-490; filtru de emisie LP520) și N2.1 (filtru de excitație BP515-560, filtru de emisie LP580).

Pentru obținerea unui contrast maxim al morfologiei vasculare și pentru măsurarea diametrului vascular au fost administrate 50 mg/kg corp albumină marcată cu fluoresceină izotiocianată (A-9771, Sigma Chemicals Co., St. Louis, SUA).

La sfârșitul experimentului, animalele au fost sacrificate cu o supradoză de pentobarbital. Suprafața portantă a tumorii a fost recoltată și fixată în formol 10% pentru investigații histologice ulterioare și confirmarea prezenței tumorale în suprafața respectivă.

Diametrul vaselor în microcirculația tumorală și în pancreasul normal au fost evaluate folosind un

software special (Capimage, Zeintle GmbH, Heidelberg, Germany).

Piese din tumoră au fost tăiate în secțiuni histologice de 8 μm pentru măsurarea densității vasculare. Pentru evaluarea densității vasculare, fiecare secțiune necolorată a fost divizată în 6 câmpuri microscopice periferice și 3 câmpuri microscopice centrale, în raport cu volumul tumoral.

Deoarece toate vasele sanguine au fost umplute cu soluție fluorescentă colorantă, administrată anterior, densitatea vaselor a fost cuantificată cu un software comercial (Capimage, Zeintl GmbH, Heidelberg, Germania), folosind o scală gri, superpozabilă pe toate ariile fluorescente, aceasta fiind exprimată ca și procentaj al suprafeței tisulare.

Pentru compararea microvascularizației pancreasului normal, au fost analizate 6 pancreasuri normale, pregătite în același mod. Au fost examinate la un microscop optic secțiuni histologice de 5 μm din tumoră. Imaginea histologică a fost transmisă printr-o videocameră la un monitor și înregistrată la un videorecorder. Suprafața secțiunii transversale a tumorii a fost măsurată ulterior folosind același software special. Apoptoza tumorală a fost colorată prin metoda TUNEL (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germania). Au fost calculate numărul de celule tumorale apoptotice și numărul total de celule. Apoptoza a fost exprimată ca și procent din totalul celulelor tumorale.

Datele au fost analizate folosind software SAS (SAS Institute Inc., Cary, SUA). Toate datele sunt date ca medie (deviație standard), în afara celor care au fost indicate în alt mod.

Testul Student, Anova sau testul Mann-Whitney U au fost folosite pentru evaluarea semnificației diferențelor dintre grupuri; probabilitatea mai mică de 0,05 a fost acceptată ca semnificativă.

## Rezultate

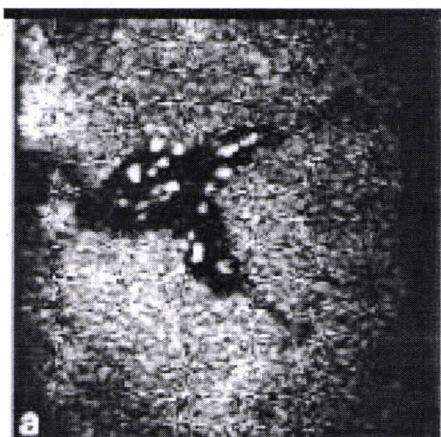
Au fost identificate caracteristicile tipice ale microvascularizației tumorale în cancerul de pancreas. S-a constatat dispariția anatomiei normale a arteriolei, capilarului și venulei, așa cum poate fi găsită în marea majoritate a țesuturilor sănătoase, inclusiv în pancreasul exocrin (Figura 1).



**Figura 1:** Microvascularizația în cancerul pancreatic (se observă pierderea ierarhiei vasculare).

A existat o lipsă completă a diferențierii arhitecturii vasculare în centrul tumorii. Vase asemănătoare cu arteriolele și venele, cu diametru neregulate, au fost observate doar în ariile periferice. Distribuția vasculară regională a fost neregulată și heterogenă (Figura 1).

S-a observat o pierdere a ierarhiei vasculare. Diametrele vaselor sanguine nu au fost constant crescătoare sau descrescătoare, așa cum există în majoritatea țesuturilor sănătoase, unde depind fie de ramificațiile arteriale, fie de cele venoase din circulație, ci s-au prezentat ca fiind schimbate într-o manieră imprevizibilă (Figura 1, Figura 2a, figura 2b).



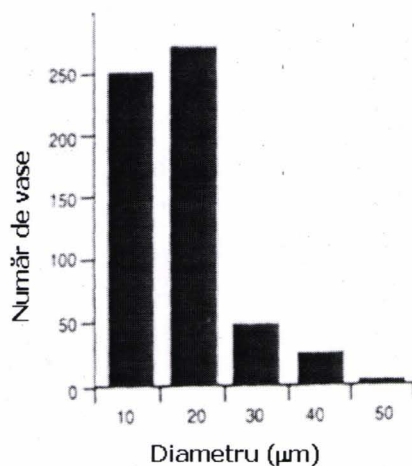
**Figura 2:** Vasele sinusoidale în cancerul pancreatic. Imagine standard a sinusoidelor cu eritrocite marcate cu fluoresceină (a) și cu albumină marcată cu fluoresceină (b)

Vasele sinusoidale și lacunare pot adeseori să fie identificate în microcirculația tumorii (Figura 2a, 2b, Figura 3). Diametrul mediu al vaselor tumorale a fost mai mare decât în pancreasul exocrin sănătos.

Majoritatea vaselor au avut un diametru corespunzător venulelor postcapilare din microcirculația normală (10-20  $\mu\text{m}$ ). Diametrele vaselor tumorale sunt arătate în Figura 4.



**Figura 3:** Un al vas sinusoidal în cancerul pancreatic. Se observă clar creșterea și descreșterea bruscă a diametrului vascular (albumină marcată cu fluoresceină)



**Figura 4:** Distribuția diametrului vaselor în cancerul pancreatic experimental: majoritatea vaselor au diametrul între 10 și 20  $\mu\text{m}$ .

Densitatea capilară medie în pancreasul normal a fost de  $6,6\% \pm 2,1\%$ . Densitatea vasculară în cancerul pancreatic poate fi divizată într-o parte periferică și una centrală, datorită unei schimbări bruște în densitatea vasculară din aria centrală. Densitatea vasculară a cancerului pancreatic DSL6A după implantarea intrapancreatică a fost semnificativ mai scăzută. Aria periferică a avut o

densitate vasculară de  $0,6 \pm 0,2\%$  ( $p=0,006$ , comparativ cu pancreasul exocrin normal) și în aria centrală a fost de  $0,1\% \pm 0,2\%$  ( $p=0,006$ , comparativ cu pancreasul exocrin normal). (Figura 5). Densitatea vasculară în aria tumorală periferică a fost semnificativ mai mare decât în regiunile centrale ( $p=0,02$ ).

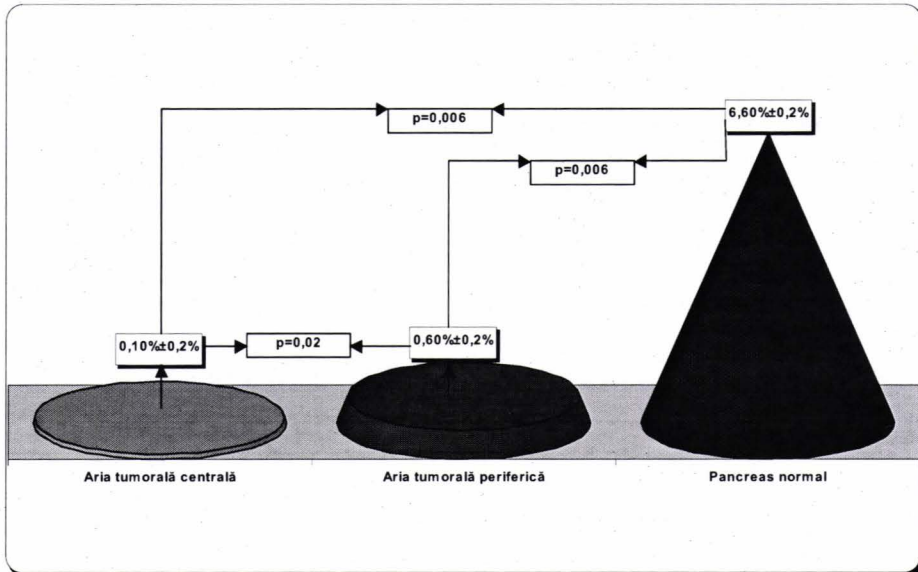


Figura 5: Diferențe de densitate vasculară în pancreasul normal și tumoral.

Tumorile implantate ortotopic au o rată de apoptoză între 0,6-6,3% (media  $2,8\% \pm 2,5\%$ ). S-a observat o supresié semnificativă a apoptozei tumorale în tumorile heterotopice de 0-0,8% (media  $0,6\% \pm 0,3\%$ ) ( $p=0,02$ ).

Pe măsură ce tumorile cresc între plăcuțele de PMMA (necesare pentru vizualizarea vascularizației tumorale), acestea au fost forțate intenționat să crească într-un mod bidimensional. Suprafața tumorală măsurată, vizibilă între plăcuțele de PMMA a fost semnificativ mai mare după implantare heterotopică ( $36,9 \pm 16,3 \text{ mm}^2$ ), decât după implantarea ortotopică ( $7,4 \pm 5,1\%$ ) ( $p=0,004$ ).

Deoarece distanța între cele 2 plăcuțe a fost de 3 mm, volumul tumoral calculat a fost de  $117,7 \pm 48,9 \text{ mm}^3$  (heterotopic) în comparație cu  $22,2 \pm 15,3 \text{ mm}^3$  (ortotopic).

### Discuții

Rezultatele tratamentului cancerului pancreatic sunt dezamăgitoare<sup>0</sup>. Până în prezent singura posibilitate de tratament curativ rămâne rezecția pancreatică. Supraviețuirea la 5 ani la pacienții cu tumori pancreatice rezecabile este de numai 2-26%, fără o rezecție potențial curativă și depinde de selecția pacienților.

Tratamentele adjuvante ca radioterapia<sup>0</sup>, imunoterapia<sup>0,0</sup> și terapia genică<sup>0</sup> sunt controversate și până acum nu au fost demonstrate rezultate promițătoare.

Densitatea vasculară a carcinomului pancreatic DSL6A a fost semnificativ scăzută. Creșterea tumorală continuă în experimentul de față a condus la creșterea discrepanței între vascularizația centrală și cea periferică a tumorii. Această observație confirmă datele prezentate pentru alte tumori și nu este specifică pentru cancerul pancreatic<sup>0</sup>.

Capilarele sunt categoria de vase cea mai abundentă în microcirculația normală și pancreasul este extrem de bine irigat de capilare.

În contrast, cele mai multe vase din cancerul pancreatic DSL6A au diametrul mai mare decât cel al capilarelor din pancreasul normal. Diametrul acestor vase corespunde venulelor colectoare sau postcapilare din microcirculația normală a pancreasului exocrin.

De altfel, morfologia nu indică în mod necesar funcția, așa cum dilatația vaselor tumorale produce scăderea perfuziei suprafeței endoteliului tumoral și poate explica oxigenarea insuficientă și aportul nutritiv insuficient al tumorii, odată ce capacitatea de difuziune a oxigenului este depășită.

O altă caracteristică a morfologiei vasculare tumorale este diametrul neregulat al vaselor și pierderea ierarhiei vasculare. Această caracteristică apare în formele extreme, prin formarea de sinusoidă și lacune vasculare. Aceste vase au fost investigate prin studii ultrastructurale asupra melanomului malign<sup>0)</sup>, iar lacunile și sinusoidale au fost găsite în ariile în care presiunea interstițială produsă de celulele tumorale a fost maximă<sup>0)</sup>.

Pe scurt, am descris un nou model pentru studiul structurii vasculare tumorale în cancerul pancreatic experimental. Studiile viitoare vor putea fi direcționate asupra unor aspecte detaliate privind inhibiția angiogenezei.

### Concluzii

1. Pentru a obține informații calitative și cantitative despre structura vasculară în cancerul pancreatic, metoda de elecție este microscopia in vivo.
2. Folosirea materialului transparent biocompatibil a permis implantarea intrapancreatică de celule tumorale și observarea structurii vasculare din cancerul pancreatic.
3. În cancerul pancreatic, densitatea vasculară este semnificativ scăzută iar creșterea tumorală continuă conduce la accentuarea discrepanței între vascularizația centrală și cea periferică a tumorii.
4. Capilarele reprezintă categoria de vase cea mai abundentă în microcirculația normală, iar în cancerul pancreatic majoritatea vaselor au un diametru mai mare decât cele din pancreasul normal.
5. O altă caracteristică a morfologiei vasculare tumorale este diametru ei neregulat și pierderea ierarhiei vasculare. Celulele tumorale sunt strâns legate de celulele endoteliale în aceste vase și pot fi integrate în endoteliu.
6. Se observă diferențe semnificativ statistic atât pentru suprafața tumorală cât și pentru volumul tumoral în relație cu modul de implantare (ortotopic vs heterotopic) ceea ce sugerează că localizarea tumorii influențează gradul de creștere tumorală.

### Bibliografie

PETTENGILL, O.S., FARIS, L.A., BELL, R.H.J., KUHLMANN, E.T., LONGNECKER, D.S. – Derivation of duct-like cells lines from a transplantable acinar cell carcinoma of the rat pancreas. *Am. J. Pathol.* 1993, 143:292-303

SHAH, S.M., SPALTON, D.J. – Comparison of the postoperative inflammatory response in the normal eye with heparin-surface-modified and polymethylmethacrylate intraocular lenses. *J. Cataract. Refract. Surg.* 1995;21:579-85.

JAIN, R.K. – The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nat.* 1998; 4:655-7

TOMINAGA, S., KUROISHI, T. – Epidemiology of pancreatic cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 1998; 15:2-7

BARRIE, R., WOLTERING, E.A., HAJARIZADEH, H., MUELLER, C., URE, T., FLETCHER, W.S. – Inhibition of angiogenesis by somatostatin and somatostatin-like compounds is structurally dependent. *J. Surg. Res.* 1993; 55:446-50

NIEDERAU, C. – Free radical science: the long road from basic science to clinical medicine. *Hepatology* 1994;41:308

CLARY, B.M., LYERLY, H.K. – Gene therapy and pancreatic cancer. *Surg. Oncol. Clin. N.Am.* 1998; 7:217-49

JAIN, R.K., SCHLENGER, K., HOCKEL, M., YUAN, F. – Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat. Med.* 1997;3:1203-8

HAMMERSEN, F., ENDRICH, B., MESSMER, K. – The fine structure of tumor blood vessels. I. Participation of nonendothelial cells in tumor angiogenesis. *Int. J. Microcirc. Clin. Ex.* 1985;4:31-43