

STUDIUL MICROCIRCULAȚIEI ÎN CANCERUL PANCREATIC EXPERIMENTAL

I. ȘIMON¹, R. TOGANEL¹, O. CEBOTARI¹, O. FABLAN¹, M. CAZACU¹,
E. RYSCHICH², J. SCHMIDT²

Section 1.02 ¹ Clinica Chirurgie IV, UMF Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, Romania

Section 1.03 ² Departamentul de Chirurgie, Universitatea Heidelberg, Germania

Rezumat

Lucrarea are ca scop studiul microcirculației în cancerul pancreatic experimental, pe un lot de 10 șobolani, investigată prin microscopie intravitală.

Densitatea vaselor în tumoră a fost semnificativ mai mică decât în țesutul pancreatic normal ($p=0,0004$). Caracteristic pentru vascularizația tumorii a fost lipsa unei diferențieri în arhitectura vaselor, în formarea vaselor sinusoidale și lacunare și în schimbări bruște în diametrul vaselor. Viteza de circulație a hematiilor a fost diferită la nivelul vaselor tumorale.

Cancerul pancreatic experimental se caracterizează prin: aranjamentul haotic al vaselor; formarea vaselor sinusoidale și lacunare; densitatea vasculară scăzută; creșterea diametrului mediu al vaselor.

Cuvinte cheie: cancer pancreatic, model, microcirculație.

Summary. The study of microcirculation in experimental pancreatic cancer

The aim of this paper is to study microcirculation in experimental pancreatic carcinoma, at a group of 10 rats, investigated by intravital microscopy.

The density of vessels in the carcinoma was significantly less than in normal pancreatic tissue ($p=0.0004$). The vasculature of the tumour was characterised by lack of differentiation in architecture of vessels, formation of sinusoidal and lacunar vessels and sudden changes in diameter of vessels. Red blood cells velocity differed among tumour vessels.

Experimental pancreatic carcinoma could be characterised by: chaotic arrangement of vessels; the formation of sinusoidal of lacunar vessels; lower vascular density; increase in mean diameter of vessels.

Key words: pancreatic cancer, model, microcirculation.

Introducere

Dintre toate tipurile de tumori pancreatice, cel mai frecvent este adenocarcinomul ductal. Aportul de sânge și limfă sunt importante pentru creșterea tumorală (progresia și metastazarea), iar dezvoltarea, structura și fiziologia microcirculației influențează biologia tumorală și limitează eficiența mecanismelor de apărare imunologice, metodelor de diagnostic și managementului terapeutic.

În ciuda importanței epidemiologice și oncologice, până în momentul de față nu există date despre microcirculație în cancerul de pancreas. În acest studiu este descris un model experimental de cancer pancreatic la șobolan, care permite investigarea multor aspecte de microcirculație, dorindu-se a răspunde la următoarea problemă: ce trăsături caracterizează morfologia vasculară și microcirculația in vivo a cancerelor pancreatice experimentale?

Metode

În carcinomul pancreatic experimental 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.

S-au utilizat 10 șobolani rasa Lewis de sex

masculin (160-180 g), fiecare 'dintre ei fiind anesteziat cu pentobarbital 10 mg/kg, administrat intraperitoneal și ketamină 40 mg/kg, administrată intramuscular. După incizia mediană abdominală, două plăcuțe sterile de polimetilmetacrilat (PMMA) (diametru 11 mm) au fost aplicate prin tehnica "sandwich" pe ambele părți ale capului pancreatic.

PMMA este un material biocompatibil utilizat în oftalmologie și urologie. 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 mm³ de țesut tumoral, dintr-o tumoră primară a unui șobolan și implantată în pancreas între cele două plăcuțe.

Abdomenul a fost închis iar animalele au fost trezite. La 4 săptămâni după inoculare, a fost efectuat un experiment de microscopie intravitală. Tumora a fost de aproximativ 4-6 mm în diametrul maxim, împrejmuată de plăcuțe la acest moment. Atât arile centrale cât și cele periferice au fost accesibile examenului microscopic intravital.

După 4 săptămâni, toate animalele au fost reanesteziate. Un cateter de teflon (diametrul intern 0,5 mm) a fost introdus în vena jugulară internă pentru acces 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. Tumora a fost imobilizată într-o cameră de imersie cu soluție Ringer la o temperatură controlată (37°C). Întreaga etapă de microscopie intravitală a fost efectuată cu un microscop cu fluorescență. După ce pregătirea a fost efectuată, toate animalele au primit o injecție intravenoasă de 1 ml/kg de eritrocite autologe, marcate cu fluoresceină izotiocianată (FITC), pentru măsurarea vitezei eritrocitare. Microcirculația a fost urmărită timp de 30 de minute. Imaginile microcirculatorii au fost transmise de o videocameră la un monitor și înregistrate cu un videorecorder pentru o analiză secvențială ulterioară.

Au fost alese aleator 4 câmpuri microcirculatorii și au fost înregistrate timp de 10 secunde pentru evaluarea vitezei eritrocitare. După aceasta, 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. La sfârșitul experimentului, animalele au fost eutanasiate cu o supradoză de pentobarbital. Tumora a fost recoltată și fixată în formol 10% pentru investigații histologice ulterioare și confirmarea prezenței tumorale în suprafața respectivă. Microscopia intravitală în pancreasul normal a fost efectuată la 6 șobolani de sex masculin, rasa Lewis. După anestezie și incizia mediană, pancreasul a fost exteriorizat într-o baie de soluție Ringer cu temperatură controlată. S-au administrat intravenos 1 ml/kg de eritrocite marcate cu FITC. După o perioadă de stabilizare de 30 de minute, au fost identificate, înregistrate și evaluate 5 câmpuri microscopice/animal, cu 50 de capilare și 3 venule (diametru 20-40 μm)/ animal.

Viteza eritocitară și diametrul vaselor în microcirculația tumorală și în pancreasul normal au fost evaluate de un software special (Capimage). Viteza eritocitară a fost evaluată prin metoda cadru cu cadru. Piese din tumoră au fost tăiate în secțiuni histologice de 8 μm pentru măsurarea densității vasculare. Fiecare secțiune necolorată a fost divizată în 6 câmpuri microscopice periferice și 3 câmpuri

microscopice centrale, depinzând de volumul tumoral, pentru evaluarea densității vasculare. Deoarece toate vasele sanguine au fost umplute cu soluție fluorescență colorantă, administrată anterior, densitatea vaselor a fost cuantificată cu un software comercial (Capimage), folosind o scală gri, superpozabilă pe toate ariile fluorescente; aceasta a fost exprimată ca și procentaj al suprafeței tisulare. Pentru compararea microvascularizației pancreasului normal au fost analizate 6 animale sănătoase pregătite în același mod. Secțiuni histologice de 5 μm din pancreas au fost examinate la un microscop optic. Imaginea histologică a fost transmisă printr-o videocameră la un monitor și înregistrată la un videorecorder.

Datele au fost analizate folosind software SAS. Toate datele sunt prezentate ca medie (deviație standard). A fost folosit testul Student și Anova în evaluarea semnificației statistice a 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. A dispărut anatomia normală a arteriolei, capilarului și venulei așa cum poate fi găsită în marea majoritate a țesuturilor sănătoase, inclusiv în pancreasul exocrin. A existat o lipsă completă a diferențierii arhitecturii vasculare în centrul tumorii. Vase asemănătoare cu arteriolele și venulele, cu diametre neregulate, au fost observate doar în ariile periferice. Distribuția vasculară regională a fost neregulată și heterogenă. 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 imprezvizibilă. Vasele sinusoidale și lacunare pot adeseori să fie identificate în microcirculația tumorii. 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 μm). Diametrele vaselor tumorale sunt prezentate în figura 1.

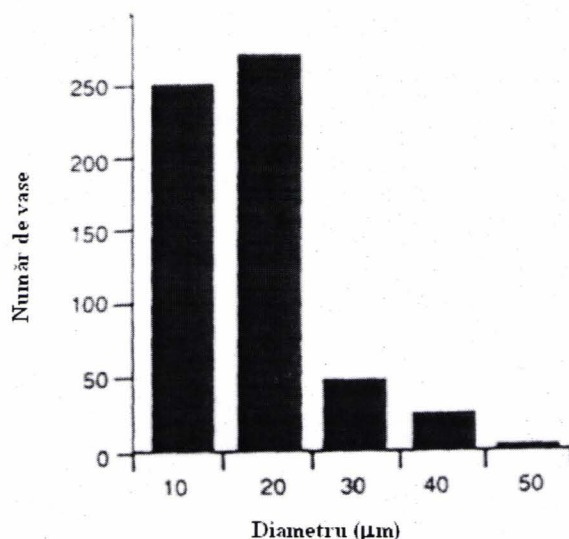


Figura 1: Distribuția diametrului vaselor în cancerul pancreatic experimental: majoritatea vaselor au diametrul între 10 și 20 µm.

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, conform 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), iar în aria centrală a fost de $0,1\% \pm 0,2\%$ ($p=0,006$, comparativ cu pancreasul exocrin normal).

Densitatea vasculară în aria tumorală periferică a fost semnificativ mai mare decât în regiunile centrale ($p=0,02$).

Viteza medie a hematiilor din toate vasele în cancerul pancreatic nu diferă semnificativ față de cea din pancreasul normal. (tabelul I). Nu există diferență semnificativă a vitezei hematiilor între venulele colectoare (20-40 µm) din pancreasul normal și vasele tumorale cu același diametru (tabel I).

Tabelul nr. 1: Media ± deviația standard a vitezei eritrocitare în pancreasul normal și cancerul pancreatic experimental.

	Tumoră intrapancreatică		Pancreas normal	
	Număr de vase	Media ± Deviația Standard	Număr de vase	Media ± Deviația Standard
Viteza eritocitară în toate vasele sanguine (mm/s)	165	$0,8 \pm 0,6$	495	$1,0 \pm 0,3$
Viteza eritocitară în vasele sanguine cu diametrul de 20-40 µm.	25	$1,1 \pm 0,6$	33	$0,8 \pm 0,4$

Discuții

Circulația sanguină și oxigenarea tisulară a tumorilor maligne au o importantă influență în majoritatea rezultatelor tratamentelor adjuvante. Totuși, până în prezent, nu au existat date despre microcirculație în cancerul pancreatic.

Pentru a obține informații calitative și cantitative despre microcirculația locală, metoda de elecție este microscopia în vivo. Aceasta permite vizualizarea directă și adecvată a microcirculației

în vivo, dar necesită un organ mobilizat, menținut în condiții fiziologice și pe o suprafață plană. Aceste obiective pot fi obținute atunci când este folosit un model de tumoră transplantabilă, în contrast cu toate modelele de tumori carcinogen-induse, în care timpul de instalare a transformărilor maligne este imprevizibil și suprafața tumorii neregulată. Microscopia intravitală a fost folosită pentru prima oară în studierea tumorilor maligne, utilizând camera

subcutanată la șobolani.

Introducerea tehnicii de microscopie fluorescentă a permis ulterior o mai bună evaluare cantitativă a microcirculației tumorale. Folosirea materialului transparent biocompatibil (PMMA) a permis implantarea intrapancreatică în modelul prezent și observarea microcirculației în cancerul pancreatic într-un mediu adecvat. Spațiul dintre plăcuțele PMMA, cu un tip de creștere relativ liniară, poate să difere de condițiile naturale, dar acest pas este necesar pentru a observa perfuzia microvaselor în tumoră, deoarece o suprafață neregulată nu ar permite o vizualizare adecvată.

Activitatea funcțională a pancreasului exocrin are nevoie de un aport adecvat de sânge, deoarece pancreasul prezintă o densitate vasculară foarte mare și de asemenea o viteză de curgere a sângelui ridicată. 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.

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. O caracteristică a morfologiei vasculare tumorale este diametrul ei neregulat și pierderea ierarhiei vasculare. Aceasta apare în formele extreme prin formarea de sinusoidale și lacune vasculare. Aceste vase au fost investigate prin studii ultrastructurale în melanomul malign, iar lacunele și sinusoidalele au fost găsite în arile în care presiunea interstițială produsă de celulele tumorale a fost maximă. Celulele tumorale sunt strâns legate de celulele endoteliale în aceste vase și pot fi integrate în endoteliu. Aceste vase pot juca un important rol în microcirculație. Sinusoidalele și lacunele sunt caracterizate prin comunicări milimetrice pe suprafețe întinse, care cauzează creșterea extravazării constituenților plasmatici.

Am comparat rata de curgere a sângelui în carcinomul pancreatic cu cea din pancreasul exocrin normal. Circulația sângelui în tumoră a fost heterogenă, dar valorile medii nu au diferit semnificativ de acelea din capilarele pancreasului normal. Nu s-a observat nici o diferență între fluxul sanguin în venulele colectoare ale pancreasului normal și cel din vasele tumorale cu același diametru.

Am descris un nou model pentru studiul microcirculației tumorale în cancerul pancreatic experimental. Modelul permite observația directă și cantitativă a fluxului sanguin în acest tip de cancer.

Bibliografie

- BRAND, R.E., TEMPERO, M.A. – Pancreatic cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 1998;10:362-6.
- ENDRICH, B., REINHOLD, H.S., GROSS, J.F., INTAGRIETTA, M. – Tissue perfusion in homogeneity during early tumor growth in rats. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1979;62:385-95.
- FOLKMAN, J. – New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur. J. Cancer.* 1996;32A:2534-9.
- FUKUMURA, D., YUAN, F., MONSKY, W.L., CHEN, Y., JAIN, R.K. – Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* 1997;151:679-88.
- 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.
- 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.
- SCHMIDT, J., HOTZ, H.G., FOITZIK, T., RYSCHICH, E., BUHR, H.J., WARSHAW, A.L., HERFARTH, C., KLAR, E. – Intravenous contrast medium aggravates the impairment of pancreatic microcirculation in necrotizing pancreatitis in the rat. *Ann. Surg.* 1995;221:257-64.
- SCHMIDT, J., RYSCHICH, E., DANIEL, V., et al – Vascular structure and microcirculation of experimental pancreatic carcinoma in rats. *Eur. J. Surg.* 2000, 166:328-335.
- 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.
- TOMINAGA, S., KUROISHI, T. – Epidemiology of pancreatic cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 1998; 15:2-7.
- TREDE, M., SAEGER, H.D., SCHWALL, G., RUMSTADT, B. – Resection of pancreatic cancer – surgical achievements. *Langenbecks Arch. Surg.* 1998; 383:121-8.