

Komórki tuczne i angiogeneza w niedrobnokomórkowych rakach płuc

Mastocytes and angiogenesis in non-small lung carcinomas

Grzegorz Wyrobiec¹, Wojciech Rokicki², Katarzyna Stęplewska³, Janusz Kasperczyk⁴, Maria Głowacka⁵

¹Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Śląska Akademia Medyczna, Zabrze

²Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej, Śląska Akademia Medyczna, Zabrze

³Katedra i Zakład Patomorfologii, Śląska Akademia Medyczna, Zabrze

⁴Katedra i Zakład Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej, Śląska Akademia Medyczna, Zabrze

⁵Oddział Reumatologii, Szpital Specjalistyczny nr 1, Bytom

Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2007; 4 (2): 155–161

Streszczenie

Wstęp: Do rozwoju guzów nowotworowych niezbędna jest sieć naczyń krwionośnych odżywiających tkankę nowotworową. Dotychczasowe badania sugerują, iż komórki tuczne mogą być źródłem co najmniej kilkudziesięciu czynników stymulujących angiogenezę.

Cel: Celem pracy jest próba znalezienia zależności pomiędzy liczbą gromadzących się na obrzeżu niedrobnokomórkowego raka płuc komórek tucznych a liczbą nowo powstałych naczyń krwionośnych. Badania przeprowadzono na dwóch najczęściej występujących w Polsce niedrobnokomórkowych rakach płuc, tj. raku płaskonabłonkowym i gruczolakoraku.

Materiał i metody: Materiał do badania stanowiły wycinki guzów usuniętych w czasie zabiegów torakochirurgicznych. Badaniu poddaliśmy grupę 73 chorych, których operowano z powodu pierwotnego niedrobnokomórkowego raka płuc w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Wydziału Lekarskiego w Zabrzu Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Do badania wykorzystaliśmy typowe metody barwienia immunohistochemicznego z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych firmy Novocastra: CD31 (PECAM-1) oraz Mast Cell Tryptase (NCL-MCTYP-428).

Wyniki: Na obrzeżu gruczolakoraków stwierdziliśmy nagromadzenie większej liczby komórek tucznych oraz bardziej nasiloną angiogenezę niż na obrzeżach raków płaskonabłonkowych. U osób starszych na obrzeżu obu badanych rodzajów guzów stwierdziliśmy mniejszą liczbę komórek tucznych i mniejszą liczbę nowo powstałych naczyń krwionośnych.

Słowa kluczowe: komórki tuczne, angiogeneza, niedrobnokomórkowe raki płuc.

Abstract

Background: A network of blood vessels feeding the tumour tissue is a necessary condition for the development of neoplastic tumours. The research that has been done so far suggests that mastocytes are the source of numerous factors stimulating angiogenesis.

Aim: The aim of the research was to study the relations between the number of mastocytes accumulating at the edge of the tumour in cases of non-small lung carcinoma and the number of newly created blood vessels. The research was carried out on two types of non-small lung carcinomas that are most commonly found in Poland: adenocarcinoma and squamous cell carcinoma.

Material and methods: The research material consisted of samples of tumours excised during thoracoscopic operations. The research included a group of 73 patients who were operated on due to primary non-small lung carcinoma in the Chest Surgery Clinic of the Medical University of Silesia in Katowice, the Medical Faculty in Zabrze. The methods used in the research were the typical immunohistochemical staining techniques using monoclonal antibodies by the Novocastra company: CD31 (PECAM-1) and Mast Cell Tryptase (NCL-MCTYP-428).

Results: Accumulation of a large number of mastocytes at the tumour edges and more intensive angiogenic processes were found in cases of adenocarcinoma. It was not so intensive in cases of squamous cell carcinoma. In elderly patients it was found that the accumulation of mastocytes and the number of newly created vessels were much smaller in both types of carcinomas.

Key words: mastocytes, angiogenesis, non-small lung carcinomas.

Adres do korespondencji: dr n. med. Grzegorz Wyrobiec, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze, tel.: +48 32 272 28 42, faks: +48 32 272 28 67, e-mail: grzewyr@interia.pl

Wstęp

Rak płuc jest najczęstszym na świecie nowotworem złośliwym u człowieka. W Polsce od 20 lat jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u mężczyzn i trzecim u kobiet (po raku piersi i jelita grubego). Rocznie notuje się blisko 20 tysięcy zachorowań i prawie tyle samo zgonów z powodu tego nowotworu [1, 2].

Raka niedrobnokomórkowego płuca wykrywa się u ok. 80% chorych. Spektrum zachorowań na poszczególne typy histologiczne niedrobnokomórkowego raka płuca jest zróżnicowane geograficznie. W Polsce, Finlandii, Szkocji, a także w wielu innych krajach europejskich przeważają zachorowania na raka płaskonabłonkowego. Natomiast w Stanach Zjednoczonych i Chinach zdecydowanie częściej rozpoznawany jest gruczolakorak [3–6].

Proces neowaskularyzacji, obserwowany między innymi w onkologii, zapewnia możliwość rozwoju guza nie tylko dlatego, że rozwiązuje problem zaopatrzenia tkanki nowotworowej w składniki odżywcze i wymianę metabolitów, ale również dlatego, że komórki śródbłonka naczyń krwionośnych przyczyniają się do wzrostu objętości guza [7, 8]. Dodatkowo unaczynienie guza tworzy drogę, którą mogą rozprzestrzeniać się komórki nowotworowe, tworząc przerzuty. Można powiedzieć, iż najważniejszym wydarzeniem dla ekspansji guza złośliwego i powstawania przerzutów jest zmiana fenotypu komórek nowotworowych z nieangiogennej na angiogennej. Niemiecki badacz Westphal już w roku 1891 stwierdził, iż komórki tuczne (mastocyty) gromadzą się na obwodzie nowotworu złośliwego człowieka. W toku prac badawczych stwierdzono, że obszar akumulacji mastocytów w przebiegu choroby nowotworowej pokrywa się z regionem występowania tzw. „gorących pól” angiogenezy. Dodatkowo ustalono, iż paraenteralne podanie zwierzętom roztworu zawierającego komórki tuczne prowadzi do przyspieszenia rozwoju choroby nowotworowej, natomiast wraz ze zmniejszającą się liczbą komórek tucznych proces nowotworowy ulega zwolnieniu. Stwierdzono również, iż degranulacja komórek tucznych występuje tylko na obrzeżu guzów złośliwych, zjawiska takiego nie obserwuje się w przypadku nowotworów łagodnych [9, 10].

Cel

Celem pracy jest próba znalezienia zależności pomiędzy liczbą gromadzących się na obrzeżu niedrobnokomórkowego raka płuc komórek tucznych a liczbą nowo powstałych naczyń krwionośnych. Badania przeprowadzono na dwóch najczęściej występujących w Polsce niedrobnokomórkowych rakach płuc, tj. raku płaskonabłonkowym i gruczolakoraku.

Materiał i metody

Materiał do badania stanowiły wycinki guzów usuniętych w czasie zabiegów torakochirurgicznych, utrwalone w formalinie i przechowywane w postaci bloczków parafinowych. Badaniu poddano grupę 73 chorych w wieku od

39 do 79 lat (średnia wieku wynosiła 62,9±8,3 lat), których operowano z powodu pierwotnego niedrobnokomórkowego raka płuc w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Wydziału Lekarskiego w Zabrze Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach w latach 1988–2004 (tab. I). Dobór pacjentów stanowiących badaną próbę był przypadkowy. Badania histopatologiczne i immunohistochemiczne przeprowadzono w Katedrze Patomorfologii Wydziału Lekarskiego w Zabrze Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach.

Z każdego wycinka guza wykonano cztery preparaty, każdy o grubości 5 µm. Pierwszy preparat barwiono metodą standardową – hematoksyliną i eozyną w celu weryfikacji rozpoznania histopatologicznego oraz selekcji do dalszych badań. Trzy kolejne preparaty przeznaczano do badań immunohistochemicznych. Barwienia immunohistochemiczne przeprowadzono trójstopniową metodą ABC (Avidin-Biotin-Complex), zgodnie z zaleceniami producenta, z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych firmy Novocastra: CD31 (PECAM-1) oraz Mast Cell Tryptase (NCL-MCTRP-428).

Skrojone skrawki na szkiełkach silanizowanych odparafinowano w ksylenie, a następnie po uwodnieniu gotowano w kuchence mikrofalowej w temperaturze 96°C w roztworze buforu cytrynianowego przez 1 min w celu odkrycia antygeny. Po ostudzeniu pojemnika z próbkami pod zimną wodą i przepłukaniu preparatów w letniej wodzie blokowano endogenną peroksydazę przy użyciu 3-procentowej wody utlenionej przez 5 min. Po wyptukaniu w buforze TBS przystąpiono do właściwego barwienia immunohistochemicznego.

Za pomocą surowicy zablokowano niespecyficzne wiązania. Przeprowadzono inkubację materiału badawczego w temperaturze 60°C z przeciwciałami firmy Novocastra, inkubację biotynylowanym przeciwciałem przez 30 min oraz inkubację ABC. Po każdej z tych czynności przeprowadzono płukanie preparatów w roztworze TBS 2 razy po 5 min. Następnie wywołano reakcję barwną z użyciem DAB chromogenu. Po płukaniu preparatów w wodzie destylowanej przez 5 min podbarwiono je hematoksyliną przez 1 min, a następnie płukano w bieżącej wodzie przez 15 min. Przy-

Tab. I. Zbiorcza charakterystyka badanej grupy pacjentów

Cecha	Liczba przypadków
płeć	
kobiety	n=12 (16,4%)
mężczyźni	n=61 (83,6%)
typ histologiczny wg WHO	
gruczolakorak	n=29 (39,7%)
rak płaskonabłonkowy	n=44 (60,3%)
zróżnicowanie (grading)	
G1	n=14 (19,2%)
G2	n=44 (60,3%)
G3	n=15 (20,5%)
zaawansowanie wg pTNM	
I	n=31 (42,5%)
II	n=19 (26,0%)
III	n=23 (31,5%)

WHO – ang. World Health Organization.

gotowanie preparatów zakończyło się odwodnieniem w alkoholu, „prześwietleniem” w ksylenie i „zamknięciem” w balsamie kanadyjskim. Przygotowane preparaty poddano ocenie mikroskopowej przy użyciu mikroskopu świetlnego Olympus BX50. Analizę mikroskopową przeprowadzono w opisany poniżej sposób.

Komórki tuczne – mastocyty

Liczbę komórek tucznych oceniano na obrzeżu guza w miejscach ich największego nagromadzenia. Miejsca te wybierano w powiększeniu 100x, unikając okolic okołonaczyniowych i okołoskrzelowych. Komórki tuczne liczono w powiększeniu 200x w pięciu polach widzenia, każde o powierzchni 0,950 mm², podając wynik jako wartość średnią. Jako dodatnią reakcję oceniano komórki, których cytoplazma zabarwiła się na kolor brązowy. Jako pozytywną kontrolę zastosowano wycinki migdałka podniebiennego dla oceny tryptazy komórek tucznych.

CD31

Liczbę mikronaczyń liczono w miejscach największej neowaskularyzacji (tzw. „hot spot”) na obrzeżu guza. Miejsca te wybierano w powiększeniu 100x. Mikronaczynia liczono w powiększeniu 200x w trzech polach widzenia, każde o powierzchni 0,950 mm², podając wynik jako średnią wartość. Jako mikronaczynie oceniano również pojedyncze komórki śródbłonna oraz ich gniazda, o ile były wyraźnie odgraniczone od pozostałych mikronaczyń i innych składników tkanki łącznej. Obecność światła naczynia, choć zwykle obecnego, nie była konieczna dla uznania tej struktury za mikronaczynie. Jako pozytywną kontrolę zastosowano dla oceny CD31 wycinki raka sutka z inwazją naczyń.

Analiza statystyczna

Zebrane dane analizowano za pomocą pakietu Statistica 6.1pl. Po obliczeniu statystyk opisowych dla analizowanych cech dokonano porównań międzygrupowych przy użyciu testu Chi-kwadrat z odpowiednimi poprawkami (dla zmiennych jakościowych) oraz dla zmiennych ilościowych testów U Manna-Whitneya lub ANOVA Kruskala-Wallis. We wszystkich obliczeniach za różnice istotne przyjęto wartość $p < 0,05$.

Wyniki

Dla całej badanej grupy guzów płuc stwierdziliśmy występowanie istotnej dodatniej korelacji pomiędzy liczbą zgro-

madzonych mastocytów a liczbą nowo wytworzonych naczyń krwionośnych ($p < 0,05$; $r = 0,919$). Stwierdziliśmy, iż liczba gromadzących się na obrzeżu guzów komórek tucznych wynosi średnio $42,91 \pm 16,6$, zaś średnia liczba nowo powstałych naczyń krwionośnych guzów wynosi $60,34 \pm 23,6$.

Analizując korelacje liczby mastocytów i zaawansowania angiogenezy w grupie gruczolakoraków, a następnie raków płaskonabłonkowych, stwierdziliśmy występowanie istotnych korelacji w obu badanych grupach guzów. W przypadku gruczolakoraków stwierdziliśmy, iż średnio na obrzeżu tego typu histologicznego guza gromadzi się $76,60 \pm 13,16$ mastocytów, zaś w przypadku raków płaskonabłonkowych gromadzi się średnio $20,71 \pm 8,26$ mastocytów (tab. II).

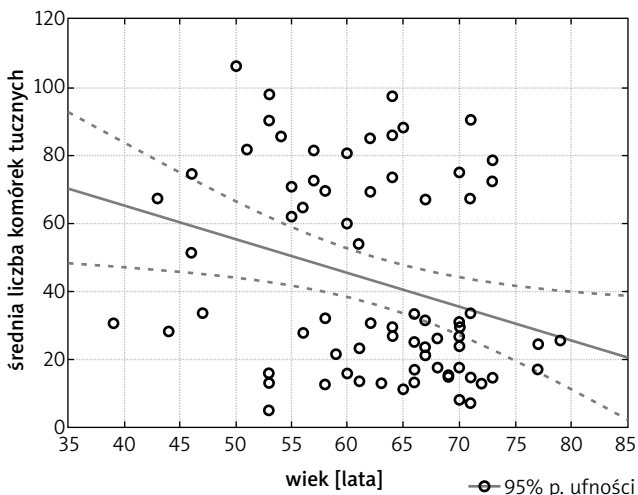
Stwierdziliśmy także występowanie istotnych statystycznie różnic pomiędzy gruczolakorakami i rakami płaskonabłonkowymi w zakresie liczby nowo powstałych naczyń krwionośnych ($p < 0,01$). W przeprowadzonym badaniu stwierdziliśmy pojawienie się średnio $101,71 \pm 36,42$ naczyń krwionośnych zaopatrujących komórki nowotworowe w przypadku gruczolakoraków oraz pojawienie się średnio $33,08 \pm 12,54$ naczyń krwionośnych zaopatrujących komórki nowotworowe raków płaskonabłonkowych. Dodatkowo we wszystkich badanych guzach stwierdziliśmy występowanie istotnych statystycznie różnic pomiędzy liczbą nowo powstałych naczyń krwionośnych w zależności od cechy N. W grupie N0 średnia liczba naczyń krwionośnych w naszym badaniu wyniosła $32,77 \pm 18,42$, w grupie N1: $63,01 \pm 20,64$, zaś w grupie N2: $115,10 \pm 45,95$. Stwierdziliśmy również występowanie znamiennej statystycznie ujemnej korelacji pomiędzy wiekiem chorych operowanych z powodu niedrobnokomórkowego nowotworu płuc a zaawansowaniem procesu neowaskularyzacji ($p = 0,057$; $r = -0,27$) oraz liczbą mastocytów gromadzących się na obrzeżu guzów ($p = 0,087$; $r = -0,29$) (ryc. 1., 2.).

Dyskusja

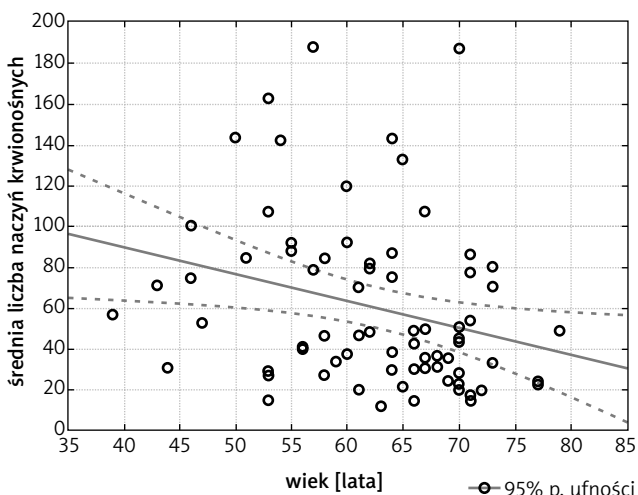
Z dotychczasowych badań nad komórkami tucznymi wiadomo, iż w warunkach fizjologicznych są one obecne we wszystkich narządach człowieka. Istnieją liczne prace, które wykazują, iż liczba komórek tucznych znamienne wrasta w miejscach inicjacji angiogenezy nowotworowej w przypadku różnych nowotworów. Lachter i wsp., badając raka jelita grubego, wykazali, iż na obrzeżu guza dochodzi do istotnego gromadzenia się komórek tucznych. Podobne zjawisko, ale w przypadku raka piersi, zaobserwowali Kankkunen i wsp. Także Duncan i wsp. w swoich badaniach wykazali, iż liczba komórek tucznych istotnie wrasta na obrzeżu

Tab. II. Średnia liczba komórek tucznych i naczyń krwionośnych

Typ histologiczny guza	Liczba guzów	Komórki tuczne		Naczynia krwionośne	
		średnia liczba	odchylenie standardowe	średnia liczba	odchylenie standardowe
gruczolakorak	29	76,60	13,16	101,71	36,42
rak płaskonabłonkowy	44	20,71	8,43	33,08	12,54
ogólnie grupa guzów	73	42,91	16,60	60,34	23,60



Ryc. 1. Zależność liczby komórek tłuszcznych od wieku badanych pacjentów



Ryc. 2. Zależność liczby naczyń krwionośnych od wieku badanych pacjentów

czerniaka skóry [11–13]. Zwiększoną liczbę komórek tłuszcznych obserwowano także w przypadku badanych przez nas niedrobnokomórkowych raków płuc. W badaniach przeprowadzonych przez Takanami i wsp., obejmujących 180 pacjentów, jak również w badaniach Imady i wsp., obejmujących 85 pacjentów, jednoznacznie stwierdzono, iż na obrzeżu niedrobnokomórkowych raków płuc dochodzi do akumulacji komórek tłuszcznych.

Podobne wyniki uzyskali także między innymi: Tomita i wsp. (25 badanych), Nagata i wsp. (66 badanych) czy też Kojima i wsp. (132 badanych) [14–18]. W przeprowadzonym przez nas badaniu również stwierdziliśmy, iż komórki tłuszczne gromadzą się na obrzeżu tych dwóch typów histologicznych niedrobnokomórkowych raków płuc. Liczba komórek tłuszcznych gromadzących się na obrzeżu gruczolakoraków jest większa w stosunku do liczby komórek tłuszcznych gromadzących się w przypadku raków płaskonabłonkowych. Liczba

stwierdzonych przez nas komórek tłuszcznych koreluje z zaawansowaniem procesu angiogenezy na obrzeżu badanych raków płuc. Uzyskane wyniki sugerują, iż komórki tłuszczne mają wpływ na proces tworzenia się naczyń krwionośnych i przejście guza z fazy nieangiogenicznej w angiogeniczną. Fakt gromadzenia się największej liczby komórek tłuszcznych oraz tworzenia większej liczby naczyń krwionośnych w przypadku gruczolakoraka może stanowić wyjaśnienie większej agresji klinicznej raków o typie gruczolakowym.

Ponadto stwierdzane często w przypadku gruczolakoraków występowanie wczesnych przerzutów poprzez krew wydaje się mieć związek z intensywną angiogenezą towarzyszącą temu typowi histologicznemu raka płuc. W przypadku raka płaskonabłonkowego stwierdziliśmy, iż na obrzeżu guza gromadzi się niewielka liczba komórek tłuszcznych, które korelują z małą liczbą wytworzonych naczyń krwionośnych. Jak wiadomo, rak płaskonabłonkowy jest nowotworem, który rośnie stosunkowo wolno, a przerzuty do węzłów chłonnych wnętrza płuca są długo ograniczone. To właśnie liczba mastocytów i naczyń krwionośnych może być odpowiedzią na pytanie o przyczynę takiej inwazyjności tego raka. Zastanawiający jest jednak fakt, iż powolny wzrost guza, który przecież pozwala komórkom nowotworowym przez odpowiednio długi czas produkować mediatory, pobudzające mastocyty do akumulacji, nie powoduje, iż komórki te zgromadzą się na obrzeżu tkanki nowotworowej. Tymczasem nie tylko w naszym materiale badawczym, ale także w eksperymentach innych badaczy stwierdzono, iż w przypadku raka płaskonabłonkowego, który klinicznie rozwija się wolniej od gruczolakoraka, obserwuje się znacznie mniejszą liczbę komórek tłuszcznych niż w przypadku raka o typie gruczolakowym [14, 15, 19]. Według Imady i wsp. na właśnie takie gromadzenie się mastocytów może mieć wpływ produkcja przez organizm różnych cytokin, która jest z kolei zależna od histologicznego typu guza [14].

Oczywiście należy pamiętać również, że komórki tłuszczne nie są jedynym źródłem czynników stymulujących angiogenezę. Powszechnie wiadomo, iż komórki nowotworowe, komórki śródbłonkowe naczyń krwionośnych, a także komórki tkanek otaczających guza uwalniają szereg substancji regulujących proces angiogenezy. Dlatego też według niektórych autorów zwiększona liczba komórek tłuszcznych nie jest dowodem na ich udział w procesie neowaskularyzacji [20]. Według teorii, podawanej między innymi przez Norrby'ego i wsp., to zwiększona liczba naczyń rozwijającego się guza nowotworowego powoduje, że komórki tłuszczne gromadzą się wokół silnie unaczynionej tkanki. W przeprowadzonych przez nas badaniach w pojedynczych przypadkach stwierdziliśmy, iż przy niewielkiej liczbie mastocytów występuje bardzo duża liczba nowo powstałych naczyń krwionośnych. Obserwowaliśmy również guzy, w których – mimo że na obrzeżu doszło do akumulacji znacznej liczby mastocytów – liczba naczyń krwionośnych była niewielka.

Wyniki te sugerują, iż obecność komórek tłuszcznych nie jest niezbędna do wytworzenia sieci nowych naczyń

krwionośnych, a także że czynniki stymulujące angiogenezę są uwalniane nie tylko przez mastocyty. Ponadto duża liczba komórek tłuszcznych przy niewielkiej liczbie naczyń krwionośnych może przemawiać za tym, że komórki tłuszczne zgromadziły się na obrzeżu guza i stymulują komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, ale ten jeszcze w pełni nie zareagował na mediatory uwalniane z mastocytów.

Wydaje się, że tylko całkowite zablokowanie wydzielania endogennych i egzogennych czynników stymulujących angiogenezę pozwoliłoby zobiektywizować udział komórek tłuszcznych w tym procesie. Jednakże ze względu na złożony charakter tego procesu, jego etapowość, a także fakt, iż w chwili obecnej nie są znane wszystkie czynniki stymulujące angiogenezę, takie przedsięwzięcie jest na razie niemożliwe do zrealizowania. Przeprowadzone przez nas badanie potwierdza jednak, iż w zdecydowanej większości przypadków wraz ze wzrostem liczby komórek tłuszcznych wzrasta liczba naczyń krwionośnych.

O ile udział mastocytów i ich mediatorów w poszczególnych etapach angiogenezy jest zagadnieniem w dalszym ciągu badanym, a pewne aspekty tego udziału są nadal w sferze hipotez, to znaczenie procesu angiogenezy dla progresji procesu nowotworowego jest na obecnym etapie wiedzy niepodważalne. Angiogeneza sprzyja nie tylko wzrostowi nowotworu, ale również jego rozsiewowi i tworzeniu przerzutów, co potwierdzono w badaniach między innymi raków sutka, gruczołu krokowego i płuc [14, 21, 22]. Jednakże stosowanie różnych przeciwciał w ocenie angiogenezy nowotworowej może być (i jest) przyczyną rozbieżnych wyników badań i kontrowersyjnych opinii co do wartości prognostycznej neowaskularyzacji.

Ponadto rozbieżność wyników pochodzących z różnych ośrodków badawczych uniemożliwia porównanie rezultatów eksperymentów przeprowadzanych na podobnym histopatologicznie materiale diagnostycznym. W związku z powyższym przeprowadzane są porównawcze badania angiogenezy na tym samym materiale z wykorzystaniem różnych przeciwciał monoklonalnych. Za przykład mogą służyć badania przeprowadzone przez Giatromanolakięgo i wsp., dotyczące angiogenezy w niedrobnokomórkowych rakach płuc. Badania te wykazały, że w wielu przypadkach guzów stwierdza się większy stopień neowaskularyzacji (ok. 2–3-krotny) przy barwieniu przeciwciałem anty CD-31 niż przy barwieniu przeciwciałem anty-vWf [23].

W naszej pracy badawczej posłużyliśmy się przeciwciałami anty CD-31. Wybór właśnie tego przeciwciała spośród aktualnie trzech najpopularniejszych (anty CD-31, anty CD-34, anty-vWf) nie był łatwy, gdyż jak wiadomo, każde z tych przeciwciał ma zarówno swoje wady, jak i zalety. Oznaczając naczynia krwionośne przeciwciałami anty CD-31, stwierdziliśmy, iż większa liczba naczyń zostaje wytworzona na obrzeżu gruczolaka, mniejsza zaś w przypadku raka płaskonabłonkowego. Porównując ten wynik z pracami badaczy posługujących się w swoich oznaczeniach immunohistochemicznych innymi przeciwciałami (CD34, vWf), stwierdziliśmy, iż bez względu na zastosowane przeciwciało zawsze większa liczba naczyń

Tab. III. Stopień zajęcia węzłów chłonnych i liczba naczyń krwionośnych dla całej badanej grupy guzów

Stopień zajęcia węzłów chłonnych (cała badana grupa)	Liczba guzów	Naczynia krwionośne	
		średnia wartość	odchylenie standardowe
N0	34	32,77	18,42
N1	23	63,01	20,64
N2	16	115,10	45,95

Tab. IV. Stopień zajęcia węzłów chłonnych i liczba naczyń krwionośnych dla guzów o typie raka płaskonabłonkowego

Stopień zajęcia węzłów chłonnych (rak płaskonabłonkowy)	Liczba guzów	Naczynia krwionośne	
		średnia wartość	odchylenie standardowe
N0	28	25,35	7,54
N1	12	44,30	5,69
N2	4	53,50	2,78

Tab. V. Stopień zajęcia węzłów chłonnych i liczba naczyń krwionośnych dla guzów o typie gruczolaka

Stopień zajęcia węzłów chłonnych (gruczolakorak)	Liczba guzów	Naczynia krwionośne	
		średnia wartość	odchylenie standardowe
N0	6	67,38	13,72
N1	11	83,42	4,90
N2	12	135,63	32,21

krwionośnych jest stwierdzana w przypadku gruczolaka, mniejsza zaś w przypadku raka płaskonabłonkowego [14, 21, 22].

Innym aspektem badania angiogenezy jest podkreślana przez Pavlopoulosa i wsp. konieczność dokładnego badania morfologii drobnych naczyń krwionośnych. Ich zdaniem badanie angiogenezy powinno opierać się także na ocenie rozmiarów i kształtu naczyń, wzoru ich rozgałęzień i innych cech. Autor ten wyraża przekonanie, że tylko tak rozszerzone badanie angiogenezy może przynieść wiarygodne wyniki opisujące wpływ tego procesu na znaczenie nowotworstwa naczyniowego w inwazji nowotworowej guza, a także na rokowanie [24].

Dodatkowo należy także nadmienić, iż przy ilościowej ocenie angiogenezy nowotworowej nie bez znaczenia jest definicja naczynia przyjęta przez eksperymentatora oceniającego preparaty histologiczne. W większości badań, zgodnie z definicją Weidnera, naczynie krwionośne to zarówno uformowane naczynie, jak i pojedyncza zabarwiona komórka śródbłonna, którą można oddzielić od podścieliska lub struktury nowotworu. Definicję tę przyjęliśmy w swoich badaniach przy ocenie nowo powstałych naczyń krwionośnych. Jednak nieliczne grupy badaczy stosują inną definicję naczynia, która określa je jako strukturę z wykształconym światłem.

To różne definiowanie pojęcia naczynia bywa przyczyną rozbieżnych wyników, utrudniających porównanie resulta-

tów badań prowadzonych przez różnych eksperymentatorów. Ocena nowotworowej angiogenezy dla celów klinicznych, oparta na ilościowym pomiarze nasilenia angiogenezy w skrawkach parafinowych resekowanych guzów nowotworowych, posiada wartość jako wskaźnik potencjału przerzutowego nowotworu. Pierwsze dowody na istnienie związku pomiędzy intensywnością angiogenezy i prawdopodobieństwem wystąpienia przerzutów stwierdzono w czerniaku skóry. Następnie Weidner i wsp. udokumentowali wartość prognostyczną angiogenezy co do wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych w raku piersi [22].

W badanym przez nas materiale stwierdziliśmy, iż liczba nowo powstałych naczyń krwionośnych ma związek z pojawieniem się i obecnością przerzutów nowotworowych do węzłów chłonnych. Ustaliliśmy, iż angiogeneza w grupie guzów bez przerzutów jest znamienne niższa niż w grupie guzów z przerzutami. Analiza nasilenia angiogenezy i obecności przerzutów w węzłach chłonnych może stanowić ważne ogniwo w wyborze indywidualnej metody terapii chorych, u których leczenie ograniczono tylko do resekcji płuca. Ilościowa ocena angiogenezy pozwala na selekcję grupy chorych wysokiego ryzyka wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych w celu zastosowania chemioterapii wspomagającej. Uzyskane przez nas rezultaty dotyczące związku między nasileniem angiogenezy a stopniem zajęcia węzłów chłonnych potwierdzają wyniki uzyskane przez innych eksperymentatorów. Macchiarini i wsp. wykazali istnienie istotnej korelacji pomiędzy nasileniem angiogenezy nowotworowej a występowaniem przerzutów nowotworowych w węzłach chłonnych, badając grupę 87 pacjentów leczonych chirurgicznie z powodu niedrobnokomórkowego raka płuc [25]. Podobne wyniki uzyskali Fontanini i wsp., badając grupę 195 chorych ze stopniem I–III niedrobnokomórkowego raka płuc [26]. Badania Imady i wsp. (180 pacjentów z gruczolakorakiem płuc) wykazały z kolei istnienie dodatniej korelacji pomiędzy nasileniem angiogenezy i stopniem zajęcia węzłów chłonnych a infiltracją tkanki nowotworowej przez komórki tuczne [17]. Również retrospektywne analizy Sikory i wsp., obejmujące 76 chorych, udowodniły, iż angiogeneza w grupie guzów bez przerzutów do węzłów chłonnych była znamienne niższa niż w grupie guzów z przerzutami [27].

Część badaczy podkreśla jednak, iż brak jest zależności pomiędzy nasileniem angiogenezy i stopniem zajęcia węzłów chłonnych w przypadku, jeśli liczba powstałych naczyń krwionośnych jest niższa od ok. 100. W badaniach przeprowadzonych przez Yamazaki i wsp., obejmujących 42 przypadki niedrobnokomórkowych raków płuc o typie gruczolowym, nie stwierdzono zależności pomiędzy nasileniem angiogenezy i stopniem zajęcia węzłów chłonnych. Według tych badaczy, przyczyną takiego wyniku jest średnia liczba naczyń krwionośnych powstałych w procesie angiogenezy, która w przeprowadzonym przez nich eksperymencie wyniosła ok. 67 [28].

Wyniki uzyskane przez nas, a także przez wielu innych badaczy angiogenezy, nie potwierdzają jednak tej teorii. Zresztą sam Yamazaki i wsp. nie są w stanie wyjaśnić przyczyny uzyskanych przez nich wyników, a jedynie przypusz-

czają, iż powodem takich rezultatów są różnice histopatologiczne pomiędzy badanymi guzami. Wydaje się, iż dalsze badania mogą wyjaśnić, przy jakiej konkretnie liczbie powstałych naczyń krwionośnych pojawiają się przerzuty nowotworowe.

Rak płuca występuje zwykle u osób po 40. roku życia, a szczyt zapadalności na ten nowotwór przypada na okres między 55. a 65. rokiem życia. Średnia wieku pacjentów w naszym badaniu wyniosła ok. 63 lat. Analizując uzyskane przez nas wyniki, stwierdziliśmy, iż pojawia się ujemna korelacja pomiędzy liczbą zgromadzonych mastocytów, nasileniem angiogenezy a wiekiem chorych operowanych z powodu raka płuc. Inaczej mówiąc, im starsza osoba, którą operowano z powodu raka płuc, tym mniej na obwodzie guza komórek tucznych, mniej naczyń zaopatrujących guza w substancje odżywcze i usuwających metabolity. Uzyskany wynik wydaje się potwierdzać obserwacje kliniczne, iż wraz z wiekiem progresja procesu nowotworowego przebiega wolniej.

Wnioski

1. Wydaje się, iż proces większego nowotwórstwa naczyniowego w gruczolakorakach w porównaniu z rakami płaskonabłonkowymi spowodowany jest gromadzeniem się większej liczby komórek tucznych na obrzeżach guza oraz może stanowić wyjaśnienie większej agresji klinicznej raków o typie gruczolowym.
2. Wiek osób chorych na raka płaskonabłonkowego i gruczolakoraka płuca w istotny sposób wpływa na obniżenie liczby komórek tucznych i naczyń krwionośnych na obrzeżu guza nowotworowego.

Piśmiennictwo

1. Kordek J, Jassem J, Krakowski M, Jeziorski A. Onkologia – podręcznik dla studentów i lekarzy. Wyd. 2. Medical Press, Gdańsk 2004.
2. Didkowska J. Nowotwory złośliwe w Polsce w 1999 roku. Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie. Wydawnictwo Zakładu Epidemiologii i Prewencji Nowotworów, Warszawa 2000.
3. Makitaro R, Paakko P, Huhti E, Bloigu R, Kinnula VL. An epidemiological study of lung cancer: history and histological types in a general population in northern Finland. *Eur Respir J* 1999; 13: 436-440.
4. Radzikowska E, Głaz P. Rak płuca – różnicowanie związane z płcią. *Pneumonol Alergol Pol* 2000; 68: 417-424.
5. Radzikowska E, Głaz P. Znaczenie płci jako czynnika rokowniczego w raku płuca. *Pneumonol Alergol Pol* 2000; 68: 425-433.
6. Travis WD, Lubin J, Ries L, Devesa S. United States lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer* 1996; 77: 2464-2467.
7. Gil M, Roszkowski K. Angiogeneza w procesie nowotworowym. *Pneumonol Alergol Pol* 1993; 61: 5-10.
8. Nasulewicz A, Opolski A. Rola miedzi w procesie angiogenezy nowotworowej – implikacje kliniczne. *Post Hig Med Dośw* 2002; 56: 691-705.
9. Meininger CJ. Mast cells and tumor-associated angiogenesis. *Chem Immunol* 1995; 62: 239-257.
10. Norrby K. Mast cell and angiogenesis. *APMIS* 2002; 110: 355-371.
11. Duncan LM, Richards LA, Mihm MC. Jr. Increased mast cell density in invasive melanoma. *J Cutan Pathol* 1998; 25: 11-15.
12. Kankkunen JP, Harvima IT, Naukkarinen A. Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions. *Int J Cancer* 1997; 72: 385-388.
13. Lachter J, Stein M, Lichtig C, Eidelman S, Munichor M. Mast cells in colorectal neoplasias and premalignant disorders. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 290-293.

14. Imada A, Shijubo N, Kojima H, Abe S. Mast cells correlate with angiogenesis and poor outcome in stage I lung adenocarcinoma. *Eur Respir J* 2000; 15: 1087-1093.
15. Kojima H, Shijubo N, Abe S. Thymidine phosphorylase and vascular endothelial growth factor in patients with Stage I lung adenocarcinoma. *Cancer* 2002; 94: 1083-1093.
16. Nagata M, Shijubo N, Walls AF, Ichimiya S, Abe S, Sato N. Chymase-positive mast cells in small sized adenocarcinoma of the lung. *Virchows Arch* 2003; 443: 565-573.
17. Takanami I, Takeuchi K, Naruke M. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2686-2692.
18. Tomita M, Matsuzaki Y, Onitsuka T. Effect mast cells on tumor angiogenesis in lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2000; 69: 1686-1690.
19. Shijubo N, Uede T, Kon S, Maeda M, Segawa T, Imada A, Hirasawa M, Abe S. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1269-1273.
20. Tataroglu C, Kargi A, Ozkal S, Esrefoglu N, Akkoclu A. Association of macrophages, mast cells and eosinophil leukocytes with angiogenesis and tumor stage in non-small cell lung carcinomas (NSCLC). *Lung Cancer* 2004; 43: 47-54.
21. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 401-409.
22. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
23. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Theodossiou D, Barbatis K, O'Byrne K, Harris AL, Gatter KC. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 2485-2492.
24. Pavlopoulos PM, Konstantinidou AE, Agapitos E, Kavantzias N, Nikolopoulou P, Davaris P. A morphometric study of neovascularization in colorectal carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 2067-2075.
25. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularization to metastases of non small cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340: 145-146.
26. Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M, Silvestri V, Mussi A, De Placido S, Tortora G, Bianco AR, Gullick W, Angeletti CA, Bevilacqua G, Ciardiello F. Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 241-249.
27. Sikora J, Slodkowska J, Radomyski A, Giedronowicz D, Kobos J, Kupis W, Rudzinski P. Immunohistochemical evaluation of tumour angiogenesis in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Ann Acad Med Bialostoc* 1997; 42 Suppl. 1: 271-279
28. Yamazaki K, Abe S, Takekawa H, Sukoh N, Watanabe N, Ogura S, Nakajima I, Isobe H, Inoue K, Kawakami Y. Tumor angiogenesis in human lung cancer. *Cancer* 1994; 74: 2245-2250.