

Сања Алексић-Ковачевић, Д. Маринковић и Ивана Вучићевић<sup>1</sup>

## МАРКЕРИ ЗНАЧАЈНИ ЗА ПРОГНОЗУ И ТЕРАПИЈУ ТУМОРА ПАСА

### Кратак садржај

Вишеструки онкогени ефекти утичу на инхибицију матурације ћелије, миграцију и ткивну инвазију. Развој тумора подразумева несклад између пролиферације, раста и диференцијације, што је праћено значајним генотипским и фенотипским варијацијама. Квалитативно и квантитативно одређивање биолошких прогностичких фактора у ткиву говори о метастатском потенцијалу тумора и предикцији неопластичне болести. Факторе ангиогенезе и бројне активирајуће и инхибиторне протеине могуће је имунохистохемијски доказати у ткиву тумора, а имунофенотипизација лимфома је нужна за избор терапијског протокола. Одређивање пролиферативног потенцијала туморских ћелија имунохистохемијском детекцијом PCNA, Ki-67, CD-117, CD45 користи се у градирању мастоцитома. Све је значајнија клиничка корелација раста тумора са експресијом различитих антигена на туморским ћелијама.

**Кључне речи:** тумори паса, маркери, прогноза.

Sanja Aleksić-Kovačević, D. Marinković i Ivana Vučićević

## PROGNOSTIC MARKERS SIGNIFICANT FOR THERAPY OF TUMOURS IN DOGS

### Abstract

The multiple oncogenic effects on the inhibition of cell maturation, on cell migration and tissue invasion, is responsible for the occurrence of tumours. The development of tumours implies a disproportion between proliferation, growth and differentiation, which is accompanied by significant genotypic and phenotypic variations in the diseased. The qualitative and quantitative determination of the biological prognostic factors in the tissue indicates possible tumour metastasizing, and consequently also the prognosis of the neoplastic disease. It is possible immunohistochemically to prove factors of angiogenesis and numerous activating and inhibiting proteins in the tumour tissue, which is also very important for properly choice of lymphoma therapy. The determination of the proliferative potential of tumour cells by immunohistochemical detection of PCNA, Ki-67, CD-117, CD 45, is used in grading of mast cell tumours. In addition to other histological, clinical and biological parameters, they are significant for the further prognosis and therapy of neoplasms.

**Key words:** tumours, dogs, prognostic markers.

---

<sup>1</sup> Др Сања Алексић-Ковачевић, редовни професор, Катедра за патолошку морфологију, Факултет ветеринарске медицине, Београд, e-mail: skovasevic@vet.bg.ac.rs; др Дарко Маринковић, доцент, Катедра за патолошку морфологију, Факултет ветеринарске медицине, Београд; мр Ивана Вучићевић, асистент, Катедра за патолошку морфологију, Факултет ветеринарске медицине, Београд.

## УВОД

Нормална ткива у процесу обнављања испољавају равнотежу између ћелијске пролиферације, раста, диференцијације и програмиране ћелијске смрти. Развој тумора подразумева несклад између пролиферације, раста и диференцијације, што је праћено значајним генотипским и фенотипским варијацијама код оболеле јединке. Сценарио вишеструких онкогених ефеката на инхибицију старења ћелије, апоптозе и матурације, затим на стимулацију пролиферације, на ћелијску миграцију и ткивну инвазију, одговоран је подједнако за настанак тумора код људи и животиња. Данас се овом аспекту ветеринарске онкологије у свету придаје све већи значај. Постало је сасвим јасно да квалитативно и квантитативно одређивање биолошких прогностичких фактора у ткиву оболелих говори директно о способности метастазирања тумора, а тиме и о прогнози неопластичне болести. Праћење клиничких и биолошких прогностичких фактора значајно је за терапију и предикцију тумора код људи и животиња.

## МЕТОДЕ РАДА

Методe испитивања материјала обухватале су: узорковање ткива тумора паса, фиксирање у пуферизованом формалину, аутоматско процесовање, калупљење и сечење на микротому, затим рутинско хистолошко бојење исечака (хематоксилин еозин – HE) и специфично хистолошко бојење исечака за доказивање хистаминских гранула у мастоцитима код мастоцитома (толуидин плаво – TB). Урађена су и имунохистохемијска бојења исечака ткива фиксираних у формалину (LSAB2 техником) коришћењем моноклонских антитела за CD3, CD79, CD45RA, CD117, Ki – 67, PCNA, одговарајућих секундарних антитела, хромогена за визуелизацију DAB или AEC, медијума за испирање и растварање антитела и процедура потребних за демаскирање антигена. Код испитивања пролиферативног потенцијала мастоцитома, примењена је и метода PCR за доказивање мутација на *c-kit* прото-онкогену из узорака ткива фиксираних формалином, што подразумева екстракцију ДНК из ткивних узорака мастоцитома паса, фиксираних формалином и идентификацију генома PCR методом. Употребљени су прајмери PE1 и PE 2 за детекцију *c-kit* протоонкогена.

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Познато је да у неопластичним процесима код људи и животиња, инфилтрација лимфних чворова малигним ћелијама (Н-стадијум), корелира са ризиком настанка метастаза. Већина неопластичних процеса бива код паса и мачака клинички дијагностикована тек у моменту када су наступиле удаљене метастазе. Метастазе тумора често се случајно налазе на обдукцији, а да пре тога животиња није показивала, за власника уочљиве, клиничке манифестације болести (Алексић-Ковачевић и сар., 2005). Ово се посебно односи на неке секундарне депозите у јетри који постају приметни тек када наступи асцитес. Насупрот томе, карциноми штитасте жлезде код паса у преко 60% случајева постају веома брзо клинички детектибилни палпацијом. Тврде су конзистенције и вршећи притисак на душник узрокују респираторне поремећаје, што је такође веома рано клинички уочљиво. Код ових малигнух тумора Н-стадијум није поуздан клинички параметар, јер карциноми штитасте жлезде ретко метастазирају у ретрофарингеалне и каудалне цервикалне лимфне чворове. Наиме, због врло раног продора ћелија тиреоидног карцинома у огранке тиреоидних вена, прве метастазе се начешће запажају у плућима.

Пол и старост паса не утичу значајно на прогнозу већине тумора код животиња. Изузетак у томе представљају тумори млечне жлезде, чија прогноза је знатно лошија при истом хистолошком градусу код мужјака него код женки. Планоцелуларни карциноми на кожи старијих паса годинама расту локално инвазивно, метастазирајући само у око 10% случајева у регионалне лимфне чворове.

Вирусни статус је у неким случајевима пресудан за даљу прогнозу и терапију тумора. Наиме, познато је да код људи са недиферентованим карциномом назофаринкса, позитиван EBV статус (*Epstein-Barr* вирус) корелира са повољном прогнозом. Разлог за ово је могућност терапије ове вирусне инфекције. Насупрот томе, позитиван ретровирусни (FeLV) статус код мачака умањује смисао терапије болести, фаворизујући еутаназију као једино решење у случају ретровирусима индукованог лимфома мачака. Насупрот томе, код паса је имунофенотипизација лимфома драгоцен дијагностичка и прогно-

стичка процедура и представља есенцијални предуслов за примену одговарајуће терапије (Алексић-Ковачевић и сар., 2001; Алексић-Ковачевић, 2005). Два фактора значајна за прогнозу лимфома код паса су имунофенотип и подстадијум болести одређен према WHO класификацији (класификација тумора по критеријумима Светске здравствене организације). Већина аутора сматра да су пси са CD3 имунореактивним туморима (Т-ћелијски лимфоми) изложени краћој ремисији и времену преживљавања, од оних са Б-ћелијским лимфомима. Након примене одговарајућег хемиотерапијског протокола, 80% паса са Б-ћелијским лимфомом улазе у ремисију у првој години. За разлику од паса, CD3 имунореактивност лимфома није прогностички значајна код мачака, па је неопходно прво искључити FeLV инфекцију, а онда применити одговарајући хемиотерапијски протокол. У том случају, могућност преживљавања код трећине мачака са оваквим лимфомима износи око осамнаест месеци од момента постављања дијагнозе.

Регулација ћелијског циклуса обухвата бројне активирајуће и инхибиторне протеине чији је поремећај евидентан у многим малигним туморима код људи и животиња. Протеински продукт p53 гена назива се чуваром генома и надзире интегритет ДНК, па у случају оштећења ДНК доводи до заустављања ћелијског циклуса, како би се оштећење поправило, или уводи ћелију у апоптозу. Тако се спречава преношење мутације на ћелије ћерке. Губитак или мутација p53 је удружен са повећаним ризиком за настанак тумора и представља далеко најчешћу генетску алтерацију у туморима. Познато је да су протеини мутираног p53 гена много стабилнији, акумулирају се у једру туморских ћелија, где се лако детектују имунохистохемијским методама (Miyakami et al., 2000). За мутацију p53 гена могу бити одговорни и вируси EBV код људи и лабораторијских глодара, FeLV и FeSV гени код мачака, BLV код говеда и други.

Релативно честа карактеристика малигне ћелије је резистенција на апоптозу. Један од протеина који спречава туморску ћелију да уђе у процес апоптозе је Bcl-2. Овај протеин је локализован на унутрашњој мембрани митохондрија, ендоплазматском ретикулуму и једровој мембрани. Многобројни фактори који изазивају оште-

ћење ћелије доводе до интеракције анти- и проапоптотских чланова Bcl-2 породице. Од узамне реакције ових протеина зависи да ли ће протеолитичка каскада каспаза, егзекутора апоптозе, бити активирана. Ако су у равнотежи, обезбеђена је хомеостаза, а ако постоји повећана експресија антиапоптотских или смањена експресија проапоптотских протеина, настаје тумор. Аберантна експресија Bcl-2 описана је код многих карцинома. Повећана експресија Bcl-2 у туморским ћелијама могла би, уз друге прогностичке факторе, указати на лошу прогнозу (Youle et al., 2008).

Поремећај регулације ћелијског циклуса може довести до неконтролисаног ћелијског раста и развоја малигног тумора. Циклини су позитивни регулатори ћелијског циклуса и њихова повећана експресија је повезана са убрзаном пролиферацијом туморских ћелија. Током ране G1 фазе ћелијског циклуса изражена је експресија циклина D1, који делује на местима познатим као „места провере“ (*checkpoints*). Прогностички значај циклина D1 испитиван је у туморима људи, ређе код животиња, али се у неким карциномима описује повећана експресија циклина D1 и доводи се у везу са настанком раног релапса тумора и краћим преживљавањем. Постоје, међутим, и резултати испитивања овог прогностичког фактора код људи, који указују да губитак експресије циклина D1 доводи до локалног рецидива. Експресија циклина D1 праћена је на туморима млечне жлезде куја, и то у преканцерским и развијеним канцерским лезијама. Циклин D1 био је експримиран у 60% случајева у преканцерским лезијама и у 44% случаја у канцерским лезијама у млечној жлезди куја (Sfacteria et al., 2003). Обе лезије са повећаном експресијом циклина D1 показивале су већи пролиферативни потенцијал.

CD117 (c-Kit протеин) припада породици рецептора тирозин киназа и кључни је медијатор пролиферације прогениторских ћелија. Нормална експресија CD117 описана је у мастоцитима, ћелијама хематопоезе, дукталном епителу, меланоцитима, паријеталним ћелијама желуца и ћелијама јајника. Поред тога што има улогу у нормалном расту и диференцијацији, CD117 корелира и са прогнозом многих малигнух тумора, а све већи значај има као таргет терапијски молекул. Цитоплазматска експресија CD117 у мастоцито-

мима паса корелира са високим хистолошким градусом тумора и лошијом прогнозом (Da Costa et al., 2007). Одређивање пролиферативног потенцијала туморских ћелија имунохистохемијском детекцијом Ki-67 (MIB-1) користи се често у градирању неких тумора код паса и мачака, пре свега лимфома, тумора млечне жлезде, мастоцитома и тумора нервног система. Поред експресије Ki-67, за утврђивање пролиферативног потенцијала тумора користе се и детекција ћелијског антигена пролиферације (*proliferating cell nuclear antigen – PCNA*, енгл.) као и аргирофилног нуклеоларног организационог региона – AgNOR. Међутим, од свих наведених метода, детекција CD-117, Ki-67 и AgNOR се сматрају најпоузданијим техникама. Посебно корисни резултати добијени су код одређивања пролиферативног потенцијала мастоцитома код паса применом ових техника (Kiupel et al., 2011).

Раст метастатског тумора је аутономан, мада је у извесној мери и под утицајем фактора раста домаћина (*Tumor growth factor – TGF*, енгл. и *Platelets derived growth factor – PDGF*, енгл.) који стимулишу раст нових крвних судова. Ангиогенеза представља стварање нових капилара из постојећих крвних судова и кључни је фактор у одржавању туморског раста и метастазирања. Тумор који није у стању да организује сопствену васкуларизацију не расте, већ остаје у облику групе ћелија која се храни измењујући хранљиве материје простом дифузијом са околином. Туморске ћелије, посебно добри клонови, имају особину стварања фактора који стимулише ангиогенезу (*Tumor angiogenesis factor – TAF*, енгл.). Овај рибонуклеопротеин директно делује на стимулацију деобе ендотелних ћелија капилара.

Факторе ангиогенезе могуће је имунохистохемијски доказати у ткиву тумора, што их уз остале хистолошке, клиничке и биолошке параметре чини значајним за даљу прогнозу и терапију неоплазме. Ангиогенеза је посредована факторима раста, од којих посебан значај за стимулацију миграције и пролиферације ендотелних ћелија има васкуларни ендотелни фактор раста (*Vascular endothelial growth factor – VEGF*, енгл.). Продукују га макрофаги, глаткомишићне ћелије крвних судова и туморске ћелије. Овај фактор своје деловање на ендотелне ћелије испољава посредством две врсте рецептора који имају активност тирозин киназе. Прогностички

значај експресије VEGF доказан је у неким малигним туморима: у колоректалном карциному, аденокарциномима млечне жлезде и сквамозно-ћелијским карциномима. Повећана експресија VEGF у појединим малигним туморима код паса и мачака доводи се у везу са туморском прогресијом и већим ризиком за метастазирањем у лимфне чворове, што корелира са лошом прогнозом.

Поред наведених маркера ћелијске пролиферације у ткивима, у онкологији се данас интензивно одређује присуство и концентрација туморских маркера у крви или телесним течностима. Туморски маркери су супстанце које стварају или сами тумори или домаћин као одговор на тумор, а користе се за утврђивање присуства тумора. Такве супстанце се налазе у ћелијама, ткивима или телесним течностима, а мере се квалитативно или квантитативно, хемијски, имунолошки или молекуларним методама. Туморски маркери могу бити биохемијски или имунолошки показатељи стадијума тумора. Бројни туморски маркери одражавају супстанце које се нормално ембриолошки стварају у одговарајућим ткивима. Први описани туморски маркер је био *Bence-Jones* протеин. Много година после овог открића, идентификовани су бројни хормони, ензими, изоензими и други протеини, чија се концентрација у телесним течностима мења услед постојања малигног процеса. Примена туморских маркера је ограничена у области скрининга, дијагностиковања, процењивања прогнозе, утврђивања степена и локализације тумора. То значи да је већина туморских маркера првенствено значајна за праћење терапије, а да је само неколико њих корисно за рано откривање тумора. Скоро ниједан туморски маркер није значајан у превенцији обољења. Нове технологије у биомедицини ће свакако омогућити развој и примену нових биомаркера као туморских маркера.

## ЗАКЉУЧАК

Из свега наведеног може се закључити да је за постављање ваљане дијагнозе, предикције и терапије тумора, од непроцењивог значаја примена биолошких прогностичких фактора у самом ткивном исечку тумора. Ово фаворизује имунохистохемијско одређивање, пре свега, прогностичких фактора раста, односно маркера ћелијске

пролиферације, фактора ангиогенезе и бројних активирајућих и инхибиторних протеина. Резултати имунохистохемијских метода добијени применом одговарајућих примарних антитела представљају данас есенцијални предуслов за прогнозу и терапију неопластичних болести код паса и мачака.

**Напомена:** рад из пројекта III 46002, Министарства науке РС.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Aleksić-Kovačević S., Kukulj V., Marinković D., Knežević M., 2005, *Retrospective study of canine epithelial and melanocytic tumors*, Acta Vet. 55, 319–326.
2. Aleksić-Kovačević S., Jelesijević T., 2001, *Morphological, histopathological and immunohistochemical study of canine malignant lymphoma*, Acta. Vet. 51, 245–254.
3. Aleksić-Kovačević S., 2005, *Limfomi pasa i mačaka*, Mladost biro, Beograd, Srbija.
4. Da Costa R. M. G., Matos E., Rema A., Lopes C., Pires M. A., Gärtner F., 2007, *CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers*, BMC Vet. Res. 3, 19–29.
5. Kiupel, M., Webster, J. D., Bailey, K. L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C. J. et al., 2011, *Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior*, Veterinary Pathology, 48, 147–55.
6. Murakami Y., Tateyama S., Rungsiapat A., Uchida K., Yamaguchi R., 2000, *Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats*, J. Vet. Med. Sci. 62, 743–750.
7. Sfacteria A., Bertani C., Costantino G., Del Bue M., Paiardini M., Cervasi B., Piedimonte A., De Vico G., 2003, *Cyclin D1 expression in precancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland*, J. Comp. Pathol. 128, 245–251.
8. Youle R. J., Strasser A., 2008, *The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9, 47–59.

