

pokarmu, w konsekwencji prowadząc do wyniszczenia i śmierci (11, 12). Zwierzęta zaczynają chorować w młodym wieku, a śmierć następuje najczęściej w wieku 2–4 lat, co sprawia, że znacznie spada liczba osobników będących w wieku rozrodczym (9). Tryb życia tych interesujących zwierząt (często dochodzi do walk pomiędzy osobnikami, które walczą o padlinę) sprawia, że ten mechanizm roznoszenia się choroby jest bardzo efektywny w rozprzestrzenianiu się nowotworu. Sprawia to, że nowotwór jest przyczyną szybkiego zmniejszania się populacji diabłów tasmańskich i istnieje potencjalna możliwość całkowitego wymarcia tego gatunku w naturze w ciągu kilku dekad. Nie wydaje się, aby w rozprzestrzenianiu się choroby jakąkolwiek rolę odgrywało spożywanie padliny lub, że choroba może być przenoszona przez jakieś wektory.

Guzy są często dobrze odgraniczone (87% przypadków), przybierają postać płaskich, jędrnych mas, często o owrzodzonej sączącej powierzchni, zlokalizowanych głównie na skórze części twarzowej i w jamie ustnej (10). W większości

przypadków (65%) u chorych diabłów tasmańskich obserwuje się występowanie przerzutów, najczęściej do węzłów chłonnych, płuc, śledziony, serca oraz otrzewnej.

Piśmiennictwo

1. Talmadge J.E., Fidler I.J.: AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 2010, **70**, 5649-5659.
2. Langley R.R., Fidler I.J.: The seed and soil hypothesis revisited—the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int. J. Cancer.* 2011, **128**, 2527-2535.
3. Langley R.R., Fidler I.J.: Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr. Rev.* 2007, **28**, 297-321.
4. Pavlidis N., Pentheroudakis G.: Cancer of unknown primary site. *Lancet.* 2012, **379**, 1428-1435.
5. Welsh J.S.: Contagious cancer. *Oncologist* 2011, **16**, 1-4.
6. Murgia C., Pritchard J.K., Kim S.Y.: Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell* 2006, **126**, 477-487.
7. Rogers K.S., Walker M.A., Dillon H.B.: Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1998, **34**, 463-470.
8. Albanese F., Salerni F.L., Giordano S., Marconato L.: Extragenital transmissible venereal tumour associated with circulating neoplastic cells in an immunologically compromised dog. *Vet. Comp. Oncol.* 2006, **4**, 57-62.
9. Hawkins CE, Baars C, Hesterman H, Hocking GJ, Jones ME: Emerging disease and population decline of an island endemic, the Tasmanian devil *Sarcophilus harrisii*. *Biol. Conserv.* 2006, **131**, 307-324.
10. Loh R., Bergfeld J., Hayes D., O'hara A., Pyecroft S., Raidal S., Sharpe R.: The pathology of devil facial tumor

disease (DFTD) in Tasmanian Devils (*Sarcophilus harrisii*). *Vet. Pathol.* 2006, **43**, 890-895.

11. Loh R., Hayes D., Mahjoor A., O'Hara A., Pyecroft S., Raidal S.: The immunohistochemical characterization of devil facial tumor disease (DFTD) in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). *Vet. Pathol.* 2006, **43**, 896-903.
12. Murchison E.P., Tovar C., Hsu A., Bender H.S., Kheradpour P., Rebbeck C.A., Obendorf D., Conlan C., Bahlo M., Blizzard C.A., Pyecroft S., Kreiss A., Kellis M., Stark A., Harkins T.T., Marshall Graves J.A., Woods G.M., Hannon G.J., Papenfuss A.T.: The Tasmanian devil transcriptome reveals Schwann cell origins of a clonally transmissible cancer. *Science* 2010, **327**, 84-87.

Dr hab. Rafał Sapieryński,
e-mail: rafal_sapierynski@sggw.pl

Modele doświadczalne w badaniach onkologicznych. Część I. Sferoidy i model *in ovo*

Kaja Urbańska, Justyna Sokołowska

z Katedry Nauk Morfologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Badania z zakresu biologii komórek nowotworowych oraz ich potencjału proliferacyjnego i metastatycznego oraz odpowiedzi na podane chemioterapeutyki lub inne substancje o charakterze przeciwnowotworowym, jak również charakterystyka farmakodynamiki tych związków w komórkach transformowanych nowotworowo w pierwszym etapie badań przedklinicznych oraz w badaniach naukowych, przeprowadzane są w warunkach *in vitro*. W tym celu wykorzystuje się komercyjnie dostępne linie komórek nowotworowych, pozyskane z banków linii komórkowych: ECACC (European Collection of Cell Cultures) lub ATCC (American Type Culture Collection) bądź wyprowadza się taką linię z guza pobranego śródoperacyjnie.

Badania w warunkach *in vitro* mają jednak swoje ograniczenia, co sprawia, że interpretacja wyników końcowych bywa trudna i nie zawsze odzwierciedla odpowiedź komórek nowotworowych wzrastających *in vivo*. Jest to związane przede wszystkim z tym, że większość komercyjnie dostępnych linii nowotworowych wprowadza się, wykonując seryjne pasaże i prowadząc selekcję komórek w kierunku pożądanego cech, takich jak ekspresja określonych genów, określone cechy morfologiczne i funkcje. Podczas tego kontrolowanego wzrostu komórki nowotworowe nabywają cech fenotypowych, które pozwalają im zaadaptować się do warunków *in vitro* (1). Ponadto w hodowlach jednowarstwowych (typu monolayer) komórki mają zapewniony łatwy dostęp

do składników odżywczych i tlenu, w wyniku czego powstaje jednolita pod względem genotypowym i fenotypowym populacja komórek (2). Należy podkreślić, że komórkom nowotworowym hodowanym w takich warunkach brakuje złożoności budowy guza wzrastającego w warunkach *in vivo*, w tym unaczynienia i obecność komórek zapalnych (3). Hodowla komórkowa pozbawiona jest również macierzy zewnątrzkomórkowej (4). Stwarza to konieczność poszukiwania innych modeli doświadczalnych do badań onkologicznych, na których można byłoby prowadzić badania z zakresu biologii nowotworów, jak również określać odpowiedź komórek nowotworowych na podawane substancje przeciwnowotworowe.

Sferoidy

W ocenie skuteczności działania leków przeciwnowotworowych lub innych substancji o potencjalnym charakterze supresorowym coraz częściej wykorzystuje się sferoidy (hodowle trójwymiarowe – 3D) – agregaty komórek nowotworowych, które hoduje się w warunkach *in vitro*. Wielokomórkowe sferoidy nowotworowe wykazują cechy guza wzrastającego w warunkach *in vivo* we wczesnej fazie

Experimental models in cancer research. Part I. Spheroids and *in ovo* model

Urbańska K., Sokołowska J., Department of Morphological Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Science – SGGW

The purpose of this article was to present the novel approach for studying cancer under controlled laboratory conditions. Development of cancer is a complex biological process that requires comprehensive experimental systems for the investigations. Until recently, cancer research was based on the use of neoplastic cell lines as *in vitro* experimental models to study biology of tumor cells. These models however, do not reflect all features of human tumors. It has created the necessity of developing more appropriate *in vitro* models. Here two novel models, namely: multicellular tumor spheroids and chick chorioallantoic membrane, are described. They both constitute more realistic insight to the structural architecture and differentiated functions of human cancer cells and they could be successfully introduced into the research. These models provide a valuable, reliable alternatives to currently used animal models in studying the growth of mammalian tumors and tumor angiogenesis. They will also allow to minimize the number of animals used in preclinical trials in medical experiments.

Keywords: tumor *in vitro* models, tumor spheroids, *in ovo* model.

jego wzrostu i dlatego uważane są za formę pośrednią pomiędzy komórkami z hodowli typu jednowarstwowego a guzem wzrastającym spontanicznie (4, 5, 6). Pod względem morfologicznym hodowle komórkowe w kulturach 3D, a zwłaszcza sferoidy, składają się z komórek o zróżnicowanym fenotypie, będących w fazie spoczynkowej cyklu komórkowego, proliferujących oraz umiejscowionych w środku sferoidu komórek objętych zmianami martwiczymi (2, 7), gdyż ciśnienie parcjalne tlenu maleje w kierunku centralnej części sferoidu. Komórki dzielące się występują głównie w 3–5 warstwach zewnętrznych, natomiast komórki znajdujące się w fazie spoczynkowej – w pobliżu obszarów centralnych (4). Oprócz zbliżonej do guzów pobranych śródoperacyjnie morfologii, podobieństw sferoidów do guzów powstających spontanicznie należy również upatrywać w oddziaływaniach komórka-komórka, wewnątrzkomórkowych szlakach sygnałowych i ekspresji genów. Odpowiedź sferoidów i guzów wzrastających w warunkach *in vivo* na podane substancje przeciwnowotworowe jest zbliżona. Dawka IC_{50} (inhibitory concentration, dawka substancji

powodująca 50% maksymalnej inhibicji) komórek rosnących w formie jednowarstwowej, w klasycznych hodowlach 2D, jest niższa (7).

W celu ustalenia optymalnej dawki radioterapii oraz jej skutków na aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych sferoidy, po ich uprzednim napromienieniu, można także wszczepiać do mózgu dojrzałych płciowo szczurów (8). Domózgowe transplantacje sferoidów przeprowadza się także na płodach szczurzych (9). W badaniach nad angiogenezą w nowotworach sferoidy implantuje się również na błonę kosmówkowo-omocznową zarodków ptaków w hodowlach *ex ovo*. Rozpatrując wykorzystywanie sferoidów do tego typu doświadczeń należy wziąć pod uwagę rozmiar mikroguza. Uważa się, że najlepsze rezultaty, wyrażone m.in. wysokim potencjałem angiogennym formującego się w takich warunkach guza, otrzymuje się przeszczepiając sferoidy o rozmiarach od 500 μm do 1 mm (10). Ograniczenia wykorzystywania sferoidów do badań nad biologią nowotworów związane są z brakiem oddziaływań o charakterze parakrynnym pomiędzy komórkami guza a komórkami gospodarza. Na przykład braku wpływu czynników wzrostowych, oddziaływań pomiędzy komórkami nowotworowymi a komórkami układu krwiotwórczego lub komórkami nabłonkowymi oraz stresem komórek, który jest związany z ich hodowlą w nieograniczonej przestrzeni. Warto podkreślić, że hodowla sferoidów nie jest wskazana w przypadku komórek, które fizjologicznie przyjmują formę jednowarstwy, np. komórek nabłonka jelita grubego (6).

Hodowle *in ovo*

W ostatnich latach nastąpił znaczący wzrost zainteresowania badaniami na zarodkach ptasich, na których przeprowadza się badania embriologiczne (11), toksykologiczne (12), a także onkologiczne. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że model ten jest z powodzeniem stosowany do oceny skuteczności działania substancji o charakterze przeciwnowotworowym (13), jak również do badań nad mechanizmami angiogenezy w nowotworach (14) różnego pochodzenia.

Pierwsze opublikowane wyniki próby przeszczepiania komórek nowotworów złośliwych ssaków na błonę kosmówkowo-omocznową (chorioallantoic membrane – CAM) zarodków kury domowej pochodzą z 1912 r. (15), jednak rozwój prac traktujących o przydatności modelu *in ovo* do badań nad angiogenezą przypadł na przełom XX i XXI wieku (16). Z dostępnych źródeł wynika, że na błonie

kosmówkowo-omocznowej zarodków ptaków można hodować odpowiednio przygotowane komórki nowotworowe pozyskane śródoperacyjnie, np. gwiaździanka anaplastycznego, glejaka wielopostaciowego, skąpodrzewianka, oponianka, wyściółczaka i rdzeniaka (17). Innymi, szczególnie pre-dysponowanymi do wzrostu na modelu *in ovo* nowotworami są: kostniakomięsak (18), rak gruczołu krokowego (19), jak również złośliwe nowotwory układu hematopoetycznego, w tym chłoniaki (20). Modelami wykorzystywanymi w doświadczalnych badaniach onkologicznych są zarodki kury domowej: leghorn biały (21, 22, 23, 24) oraz ross 308 (25), a także przepiórki (26).

Błona kosmówkowo-omocznowa formuje się czwartego dnia rozwoju zarodkowego ptaka, poprzez połączenie kosmówki i omocznia. Szybkie tempo proliferacji komórek śródbłonka i różnicowanie naczyń krwionośnych oplatających tę błonę postępuje do 11 dnia życia zarodka (14). Błona kosmówkowo-omocznowa zbudowana jest z trzech warstw: ektodermy, która przylega do skorupy jaja, mezodermy pokrytej siecią naczyń krwionośnych i składnikiem podścieliska oraz endodermy położonej od strony jamy omocznia. Grubość wszystkich trzech warstw rzadko przekracza 100 μm (16). Błona kosmówkowo-omocznowa pełni funkcję narządu oddechowego zarodka, rezerwuaru produktów jego przemiany materii, a także transportuje elektrolity (sód i chlorki) z omocznia i wchłania jony wapnia ze skorupy jaja, które są niezbędne w procesie mineralizacji kości rosnącego zarodka. Rozpatrując możliwości uznania zarodków ptasich za potencjalny model wykorzystywany w trakcie koniecznych doświadczalnych badań onkologicznych należy nadmienić, że układ immunologiczny zarodka ptaka nie jest kompletnie rozwinięty aż do 10 dnia rozwoju. Obecność limfocytów B stwierdza się dopiero w 11 dniu rozwoju zarodkowego, natomiast limfocyty T we krwi obwodowej pojawiają się w 12 dniu. Z uwagi na lokalizację i łatwy dostęp do naczyń krwionośnych zarodka ptaka, jak również późny rozwój jego układu immunologicznego, implantacja komórek nowotworowych na błonę kosmówkowo-omocznową jest zabiegiem prostym technicznie i obciążonym niewielkim ryzykiem odrzucenia przeszczepu (27). Wydaje się, że jedynym czynnikiem ograniczającym znaczenie metody *in ovo* w badaniach onkologicznych są różnice w metabolizmie ptaka (biorcy komórek nowotworowych) i ssaka (dawcy tych komórek), a ściślej dotyczy to zjawiska lekooporności, choćby wrażliwości na chlormetynę, związku, na który ptaki są odporne (22).

Implantacji komórek nowotworowych zawieszonych w medium hodowlanym dokonuje się w miejscu występowania naczyń krwionośnych błony kosmówkowo-omoczniowej. Po zabiegu jaja zabezpiecza się plastrem przepuszczającym powietrze i ponownie umieszcza w aparacie lęgowym (25). Formowanie guza rozpoczyna się już 2–5 dni po inokulacji komórek nowotworowych; wkrótce potem guz zaczyna oplatać naczynia krwionośne. Proces angiogenezy obejmuje też mięsz nowotworu. Tak rozpoczyna się faza szybkiego wzrostu nowotworu (27). W zależności od pochodzenia i liczby przeszczepianych komórek nowotworowych, jak również ich aktywności proliferacyjnej, formujące się nowotwory osiągają masę nawet 500–600 mg już w niecały tydzień po implantacji. W tym czasie komórki nowotworowe mogą opuścić pierwotne ognisko i tworzyć mikroprzerzuty w narządach zarodka (16). W miejscu implantacji komórek nowotworowych stwierdza się silny obrzęk błony kosmówkowo-omoczniowej (28). Opisywano także przeszczep komórek ludzkiej linii kostniakomięsaka na błonę kosmówkowo-omoczniową w miejsce, w którym nie występowały naczynia krwionośne (29), a także wszczepianie komórek nowotworowych do woreczka żółtkowego zarodka (22). Komórki nowotworowe pochodzenia astrocytarnego można implantować także do komór mózgu zarodków ptaków. Morfologia tak uzyskanych guzów jest podobna do guzów powstających z przeszczepionych komórek tych samych linii do mózgu gryzoni laboratoryjnych (21).

Skuteczność hodowli nowotworów w warunkach *in ovo* zależy m.in. od liczby komórek nowotworowych, które pasażuje się na błonę kosmówkowo-omoczniową zarodka ptaka. Jak wynika z badań, wraz ze wzrostem stężenia inokulowanych komórek maleje współczynnik przeżycia zarodków ptaków. Powodzenie hodowli komórek nowotworowych na modelu *in ovo* uwarunkowane jest także odpowiednim momentem pasażu komórek na błonę kosmówkowo-omoczniową (29). Innym czynnikiem limitującym jest rodzaj nowotworu. Najintensywniejszy rozwój guza obserwuje się po wszczepieniu nowotworów łagodnych, które nie są pochodzenia neuroektodermalnego, np. oponiak. Dynamika wzrostu glejaka jest znacznie mniejsza, jakkolwiek glejaki o większym stopniu złośliwości rosną szybciej w porównaniu do guzów sklasyfikowanych jako mniej złośliwe (17). Za pozytywny wynik doświadczenia z wykorzystaniem błony kosmówkowo-omoczniowej do hodowli komórek nowotworowych uznaje się obecność guzów o rozmiarach

powyżej 2 mm, z widocznym obszarem waskularyzacji na jego powierzchni (27). Zakoczenie hodowli nowotworu z wykorzystaniem zarodków ptasich przeprowadza się 17, 18, 19 lub 20 dnia rozwoju zarodkowego (23, 25), choć opisano także przypadki wyklucenia się piskląt z zaimplantowanymi wcześniej komórkami nowotworowymi (21). Wydaje się, że decydujący wpływ na morfologię guza uformowanego w wyniku implantacji komórek nowotworowych na błonę kosmówkowo-omoczniową (a także w innych układach doświadczalnych, na przykład do mózgu gryzoni laboratoryjnych) ma rodzaj wykorzystanej linii nowotworowej. Nie wszystkie dostępne komercyjnie linie mają bowiem fenotyp guza pierwotnego. Za predykcjonującą linię nowotworową chętnie wykorzystywaną w badaniach przedklinicznych uznaje się np. U251, której komórki, a także guz z nich uformowany wykazuje wszystkie najważniejsze cechy genetyczne i fenotypowe glejaka wzrastającego spontanicznie (30). W warunkach *in ovo* można także hodować fragmenty guzów pozyskanych śródoperacyjnie (31, 32).

Podsumowanie

Zasadność wykorzystywania zwierząt do badań onkologicznych od lat wzbudza kontrowersje. Wydaje się, że badania w warunkach *in vitro* stanowią alternatywę dla badań na zwierzętach. Dzięki zastosowaniu tego rodzaju modeli doświadczalnych można prowadzić prace m.in. nad genami i szlakami molekularnymi zaangażowanymi w proces onkogenyzy czy pewne badania dotyczące oceny skuteczności substancji o działaniu przeciwnowotworowym. Jednakże takie układy doświadczalne nie są w stanie odtworzyć wielu skomplikowanych interakcji jakie zachodzą pomiędzy komórkami wzrastającego guza nowotworowego a organizmem gospodarza, takie jak oddziaływanie na poziomie komórka-podścielisko guza, reakcji układu odpornościowego czy działań niepożądanych nowych leków przeciwnowotworowych. Stąd też nie da się całkowicie wykluczyć badań prowadzonych na zwierzętach.

Piśmiennictwo

1. Pinho S.S., Carvalho S., Cabral J., Reis C.A., Gärtner F.: Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl. Res.* 2012, **159**, 165–172.
2. Zhang X., Wang W., Yu W., Xie Y., Zhang X., Zhang Y., Ma X.: Development of an *in vitro* multicellular tumor spheroid model using microencapsulation and its application in anticancer drug screening and testing. *Biotechnol. Prog.* 2005, **21**, 1289–1296.
3. Becher O.J., Holland E.C.: Genetically Engineered Models Have Advantages over Xenografts for Preclinical Studies. *Cancer Res.* 2006, **66**, 3355–3358.

4. Madsen S.J., Sun C.H., Tromberg B.J., Cristini V., De Magalhães N., Hirschberg H.: Multicell tumor spheroids in photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* 2006, **38**, 555–564.
5. Anada T., Masuda T., Honda Y., Fukuda J., Arai F., Fukusa T., Suzuki O.: Three-dimensional cell culture device utilizing thin membrane deformation by decompression. *Sens. Actuators B. Chem.* 2010, **147**, 376–379.
6. Santini M.T., Rainaldi G., Indovina P.L.: Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000, **36**, 75–87.
7. Kim J.B.: Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin. Cancer Biol.* 2005, **15**, 365–377.
8. Thorsen F., Enger P.Ø., Wang J., Bjerkgvig R., Pedersen P.H.: Human glioblastoma biopsy spheroids xenografted into the nude rat brain show growth inhibition after stereotactic radiosurgery. *J. Neurooncol.* 2007, **82**, 1–10.
9. Khoshyomn S., Penar P.L., McBride W.J., Taatjes D.J.: Four-dimensional analysis of human brain tumor spheroid invasion into fetal rat brain aggregates using confocal scanning laser microscopy. *J. Neurooncol.* 1998, **38**, 1–10.
10. De Magalhães N., Liaw L.-H.L., Berns M.: An instruction on the *in vivo* shell-less chorioallantoic membrane 3-dimensional tumor spheroid model. *Cytotechnology.* 2010, **62**, 279–283.
11. Waldo K.L., Willner W., Kirby M.: Origin of the proximal coronary artery stems and a review of ventricular vascularization in the chick embryo. *Am. J. Anat.* 1990, **188**, 109–120.
12. Prakash Reddy N.C., Anjaneyulu Y., Sivasankari B., Ananda Rao K.: Comparative toxicity studies in birds using nimesulide and diclofenac sodium. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2006, **22**, 142–147.
13. Uchibayashi T., Egawa M., Nakajima K., Hisazumi H., Tanaka M., Endo Y., Sasaki T.: Responses of tumour cell lines implanted onto the chorioallantoic membrane of chick embryo to anticancer agents in combination with hyperthermia. *Urol. Res.* 1992, **20**, 233–239.
14. Ribatti D.: Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2008, **270**, 181–224.
15. Murphy JB, Rous P.: The behavior of chicken sarcoma implanted in the developing embryo. *J. Exp. Med.* 1912, **15**, 119–132.
16. Deryugina E.I., Quigley J.P.: Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cells metastasis. *Histochem. Cell Biol.* 2008, **130**, 1119–1130.
17. Shoin K., Yamashita J., Enkaku F., Sasaki T., Tanaka M., Endo Y.: Chick embryo assay as chemosensitivity test for malignant glioma. *Jpn. J. Cancer Res.* 1991, **82**, 1165–1170.
18. Balke M., Neumann A., Kersting C., Agelopoulos K., Gebert C., Gosheger G., Buerger H., Hagedorn M.: Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. *BMC Res. Notes.* 2010, **3**, 58.
19. Kunzi-Rapp K., Genze F., Küfer R., Reich E., Hautmann RE, Gschwend JE.: Chorioallantoic membrane assay: vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate cancer cells as an animal substitute model. *J. Urol.* 2001, **166**, 1502–1507.
20. Grinberg I., Reis A., Ohana A., Taizi M., Cipok M., Tavor S., Rund D., Deutsch V.R., Goldstein R.S.: Engraftment of human blood malignancies to the turkey embryo: a robust new *in vivo* model. *Leuk. Res.* 2009, **33**, 1417–1426.
21. Cretu A., Fotos J.S., Little B.W., Galileo D.S.: Human and rat glioma growth, invasion, and vascularization in a novel chick embryo brain tumor model. *Clin. Exp. Metastasis.* 2005, **22**, 225–236.
22. Dagg C.P., Karnofsky D.A., Roddy J.: Growth of transplantable human tumors in the chick embryo and hatched chick. *Cancer Res.* 1956, **16**, 589–597.
23. Durupt F., Koppers-Lalic D., Balme B., Budel L., Terrier O., Lina B., Thomas L., Hoeben R.C., Rosa-Calatrava M.: The chicken chorioallantoic membrane tumor assay as model for qualitative testing of oncolytic adenoviruses. *Cancer Gene Ther.* 2012, **19**, 58–68.
24. Mangieri D., Nico B., Coluccia AM, Vacca A, Ponzoni M, Ribatti D.: An alternative *in vivo* system for testing

- angiogenic potential of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett.* 2009, **277**, 199-204.
25. Samid M., Urbańska K., Grodzik M., Orłowski P., Sawosz E., Wierzbicki M., Sysa P.: Morphology of human glioblastoma model cultured *In ovo*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*. 2012, **56**, 261-266
26. Papoutsis M., Sleeman JP, Wilting J.: Interaction of rat tumor cells with blood vessels and lymphatics of the avian chorioallantoic membrane. *Microsc. Res. Tech.* 2001, **55**, 100-107.
27. Vargas A., Zeisser-Labouébe M., Lange N., Gurny R., Delie F.: The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, **59**, 1162-1176.
28. Hagedorn M., Javerzat S., Gilges D., Meyre A., de Lafarge B., Eichmann A., Bikfalvi A.: Accessing key steps of human tumor progression *in vivo* by using an avian embryo model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005, **101**, 1643-1648.
29. Wang J., Wang L., Cai L.: Establishment of a transplantation tumor model of human osteosarcoma in chick embryo. *Chin-Ger. J. Clin. Oncol.* 2009, **8**, 531-536.
30. Radaelli E., Ceruti R., Patton V., Russo M., Degrossi A., Croci V., Caprera F., Stortini G., Scanziani E., Pesenti E., Alzani R.: Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease. *Histol. Histopathol.* 2009, **24**, 879-891.
31. Balčiūnienė N., Tamašauskas A., Valančiūtė A., Deltuva V., Vaitiekaitis G., Gudiničiūnė I., Weis J., Graf von Keyserlingk D.: Histology of human glioblastoma transplanted

on chicken chorioallantoic membrane. *Medicina (Kaunas)*. 2009, **45**, 123-131.

32. Teresevičiūtė N., Tamasauskas A., Valančiūtė A., Deltuva V., von Graf K.D.: Evaluation of morphological issues of central nervous system glioblastoma on chicken embryo chorioallantoic membrane. *Pol. J. Vet. Sci.* 2007, **10**, 173-178.

Mgr Kaja Urbańska, Zakład Histologii i Embriologii, Katedra Nauk Morfologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, e-mail: kaja.urbanska@onet.eu

Obesity in dogs from the endocrine point of view

Gołyński M.¹, Lutnicki K.¹, Adamek Ł²,
Sub-Department of Internal Medicine of Livestock and Horses¹, Sub-Department of Clinical Diagnostics and Veterinary Dermatology², Department and Clinic of Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

The aim of this paper was to present the endocrine aspects of obesity in dogs. Obesity may cause numerous diseases including endocrinopathy and many endocrine diseases are accompanied by obesity. These relationships and ties associated with the hormonal activity can be evaluated and applied in clinical practice. Most important problems of the influence of dogs' obesity on the clinical picture of endocrinopathy and endocrinotherapy are presented and discussed.

Keywords: dogs, endocrinopathies, obesity.

Otyłość u psów, podobnie jak i u ludzi, jest chorobą powodowaną przewlekłym dodatnim bilansem energetycznym i objawia się nagromadzeniem nadmiernej ilości tkanki tłuszczowej. W populacji ludzkiej jest ona zagrożeniem szczególnym, gdyż osób z nadmierną masą ciała jest więcej niż niedożywionych (1, 2). Otyłość może być przyczyną pierwotnych zaburzeń czynności czy struktury tkanek oraz narządów lub jedynie im towarzyszyć. Dwoma podstawowymi typami otyłości są: otyłość regulacyjna, będąca wypadkową genotypu i zaburzeń behawioralnych, oraz otyłość metaboliczna. Celem artykułu jest przedstawienie endokrynogeny przyczyn i skutków drugiego z wymienionych typów otyłości u psów. Szacuje się, że u ponad 80% psów otyłych występują zaburzenia hormonalne, takie jak: niedoczynność tarczycy, zespół Cushinga, cukrzyca oraz wyspiak trzustki (1, 3, 4). Nie można jednak tego faktu uogólniać i należy

Otyłość u psów z endokrynologicznego punktu widzenia

Marcin Gołyński¹, Krzysztof Lutnicki¹, Łukasz Adamek²

z Zakładu Chorób Wewnętrznych Zwierząt Gospodarskich i Koni¹ oraz Zakładu Diagnostyki Klinicznej i Dermatologii Weterynaryjnej² Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

pamiętać, że zaburzenia w układzie dokrewnym mogą występować razem z otyłością i być od niej niezależne. Poznanie tych relacji pozwala endokrynologowi na prawidłowe leczenie przyczynowe otyłości. Ułatwia również farmakologiczne kontrolowanie apetytu i nadzór nad ilością spożywanych kalorii.

Jak stwierdzić otyłość?

W naukach medycznych istnieją rozmaite metody oceny otyłości i otłuszczenia, jak np. chociażby najbardziej popularne obliczanie u ludzi współczynnika masy ciała (body mass index – BMI). W praktyce weterynaryjnej u psów przyjęło się po prostu uważać, że nadwaga (nadmierna masa ciała) występuje wtedy, gdy masa ciała jest o 15% wyższa od optymalnej dla danego osobnika, natomiast z otyłością mamy do czynienia po przekroczeniu jej o 30% (ryc. 1; 1). Wśród licznych dodatkowych metod oceny masy ciała u psów zwraca uwagę coraz bardziej popularny, półilościowy i subiektywny wskaźnik – BCS (body condition scoring). W skali 9-stopniowej stosowany jest on zazwyczaj przez lekarzy weterynarii, zaś w 7-stopniowej przez właścicieli zwierząt (5, 6). Metoda ta opiera się na wizualnej i palpacyjnej ocenie tkanki tłuszczowej podskórnej oraz oszacowaniu otyłości brzusznej i stopnia wykształcenia mięśni. Ważne jest jednak doświadczenie i subiektywna ocena lekarza badającego, gdyż u psów trudno określić

właściwą masę ciała, nawet u osobników rasowych spełniających kryteria podawane przez organizacje kynologiczne.

Wzrost masy ciała nie powinien być w znaczeniu klinicznym zawsze utożsamiany z otyłością. Rzadkim zaburzeniem endokrynologicznym niezwiązanym z otyłością, lecz koniecznym do uwzględnienia w rozpoznaniu różnicowym jest akromegalia, która występuje u psów dorosłych i polega na przeroście tkanki łącznej, kości oraz narządów jamy brzusznej w odpowiedzi na wzrost stężenia hormonu wzrostu (7). U pacjentów stwierdza się zwykle postępującą sztywność chodu, sztywność szyi, wzrost masy ciała, zwiększone pragnienie i wielomocz, duszność wdechową, przerost skóry w okolicy głowy i szyi, przerost języka i poszerzenie przestrzeni międzyzębowych. W większości przypadków choroba ta powikłana nietolerancją glukozy występuje u suk, u których prowadzona jest antykoncepcja hormonalna za użyciem gestagenów lub w fazie *metoestrus*. Doprowadza to do nadprodukcji somatotropiny w gruczole mlekowym (8, 9, 10). Choroba może być również, aczkolwiek bardzo rzadko, wywołana obecnością gruczolaka somatotropowego przysadki (11).

Co jest pierwotne, otyłość, czy zmiany w układzie dokrewnym?

Odpowiedź na to pytanie zawsze zależy od konkretnego rozpatrywanego przypadku.