



UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Patologii
Zakład Patomorfologii i Weterynarii Sądowej

LEK. WET. Magdalena Marzec-Owczarek

**Ekspresja FOXP3 i Endosialiny we włókniakach
i włókniakomięsakach tkanek miękkich u psów**

Praca doktorska

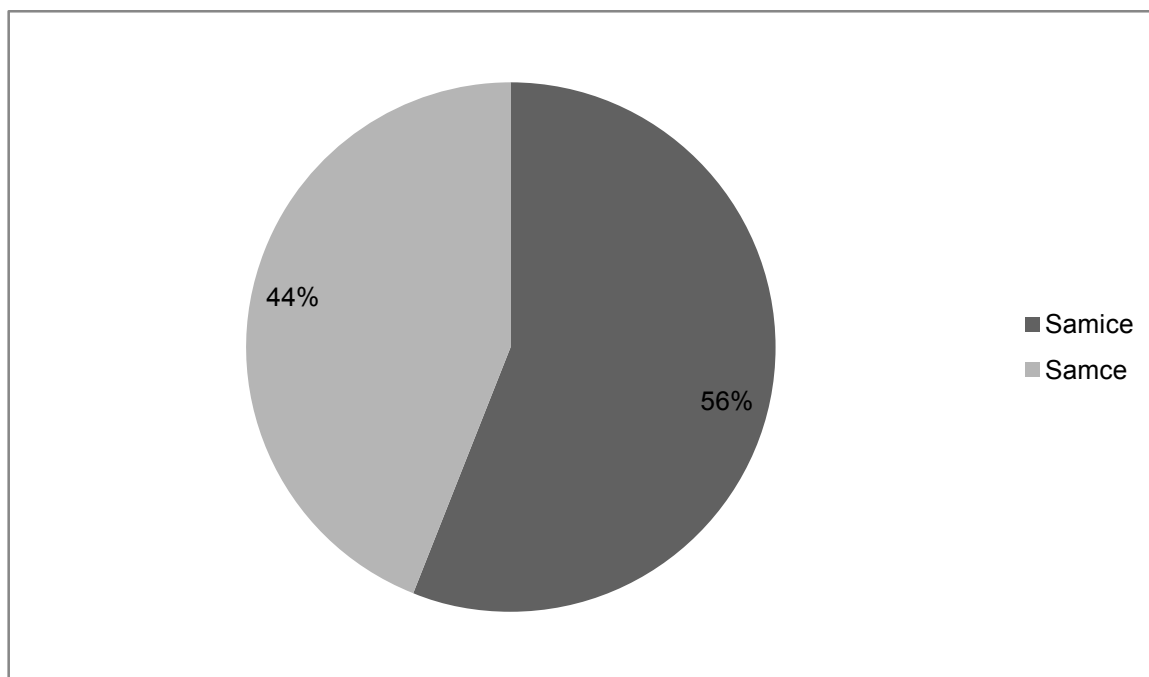
Promotor: Prof. Dr hab. Marcin Nowak
Promotor pomocniczy: Dr Małgorzata KanDEFER-GOLA

Wrocław 2023

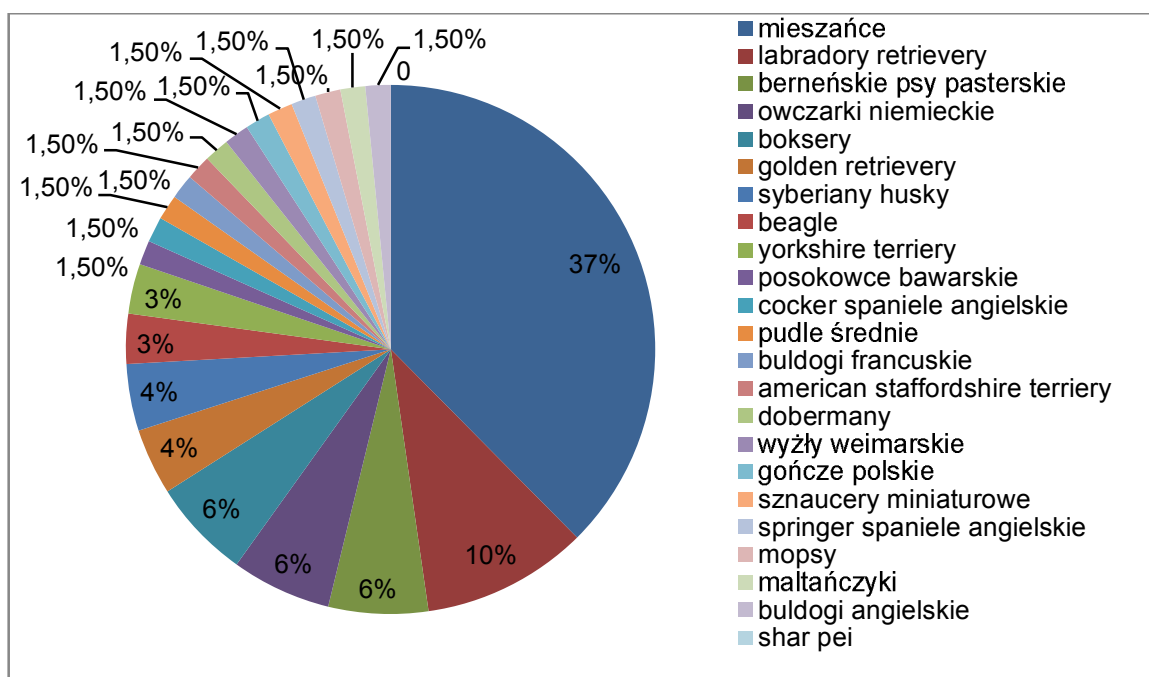
4. STRESZCZENIE

Materiał do badań pochodził ze zbiorów archiwalnych Katedry Patologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Badania przeprowadzono na łącznie 71 psich guzach skóry i tkanki podskórnej. Przebadano 31 guzów o typie *fibroma* oraz 40 guzów o typie *fibrosarcoma*. Zmiany pochodziły od psów w różnym wieku i różnych ras. Badany materiał pochodził w 56% od samic i w 44 % od samców (Ryc. 2). Najliczniejszą grupą biorącą udział w badaniu były mieszzańce, materiał pochodzący od nich stanowił 37% zebranych guzów, pozostałe rasy stanowiły odpowiednio: labradory retrievery 10%, po 6% berneńskie psy pasterskie, owczarki niemieckie, bokserzy, po 4% golden retrievery, syberian husky, po 3% beagle, yorkshire terriery oraz po 1,5% posokowce bawarskie, cocker spaniele angielskie, pudle średnie, buldogi francuskie, american staffordshire terriery, doberman, wyżły weimarskie, gończe polskie, sznauclery miniaturowe, springer spaniele angielskie, mopsy, maltańczyki, buldogi angielskie i shar pei (Ryc. 3).



Ryc. 2. Procentowy udział płci badanych psów, od których pochodził materiał.



Ryc. 3. Procentowy udział ras psów, od których pochodził materiał.

Guzy utrwalono w 7% roztworze formaliny następnie pocięto i zatopiono w bloczkach parafinowych. W dalszej kolejności materiał pocięty został na skrawki grubości 4-6µm i umieszczony na szkiełkach mikroskopowych.

Materiał został zabarwiony standardową metodą z użyciem hematoksyliny i eozyny. Następnie przez dwóch niezależnych patologów została przeprowadzona ocena histopatologiczna i określony został stopień złośliwości w 3-stopniowej skali. Metoda oceny stopnia złośliwości obejmowała trzy parametry: pierwszy to histologiczne zróżnicowanie komórek guza, gdzie 1 oznacza komórki dobrze zróżnicowane, 2 oznacza komórki słabo zróżnicowane, a 3 oznacza komórki nisko zróżnicowane; drugi - liczba mitoz widocznych na powierzchni 2,37mm², gdzie 1 odpowiada 0 – 9 figur podziału mitotycznego w 2,37mm² – 2 - 10 – 19 figur podziału mitotycznego w 2,37mm², 3 - >19 figur podziału mitotycznego w 2,37mm²; trzeci – rozległość obszaru martwicy, gdzie 0 oznacza brak martwicy w guzie, 1 oznacza obszar martwicy wielkości mniejszej lub równej 50% powierzchni guza, a 2 oznacza obszar martwicy obejmujący powyżej 50% powierzchni zmiany. Punkty określone dla każdego z kryteriów sumowano, określając stopień złośliwości (G): stopień G1 (2-3pkt), G2 (4-5pkt.), G3 (6-8pkt).

W kolejnym etapie zostały przeprowadzone badania immunohistochemiczne (IHC) z użyciem przeciwciał przeciwko białkom Ki-67, COX-2, wimentyna, Foxp3 oraz endosialina.

Badania IHC wykonywano na skrawkach parafinowych grubości 4-6µm, które umieszczono na szkiełkach (Menzel-Glaser®), a następnie skrawki odparafinowano w ksylenie i przeprowadzono przez szereg alkoholowy o malejących stężeniach, aż do wody. Antygeny tkanek utrwalonych w formalinie odkrywano w EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (Dako®) dla cyklooksygenazy 2 (COX-2), natomiast dla Ki-67, endosialiny, Foxp3 oraz wimentyny w EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH

(Dako®) wszystkie preparaty podgrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 96°C przez 20 minut. Endogenną peroksydazę blokowano przy użyciu EnVision™ FLEX Peroxidase-BlockingReagen przez 10 minut. Następnie na skrawki наносzono pierwotne przeciwciała: Dako® Monoclonal Mouse Anti-Vimentin, Clone V9, (rozcieńczenie 1:100), Dako® Monoclonal Mouse Anti – COX-2 (rozcieńczenie 1:100, CX-294), Monoclonal Mouse Anti-Ki-67 (rozcieńczenie 1:100, MIB-1), BioTechne Polyclonal Rabbit Anti-ednosialin (rozcieńczenie 1:400) oraz Novus Biologicals Polyclonal Rabbit Anti-FOXP3 (rozcieńczenie 1:200). Wszystkie inkubowane były przez 20 min. w temperaturze pokojowej. Kolejnymi czynnościami było płukanie w EnVision™ FLEX WashBuffer i nakrapianie na skrawki odczynniki systemu wizualizacji EnVision™ FLEX /HR SM802, inkubowanie 20 minut w temperaturze pokojowej. Reakcję IHC wizualizowano przy użyciu roztworu 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), EnVision™ FLEX DAB+ Chromoge (Dako®). Następnie skrawki płukano w wodzie destylowanej, podbarwiano jądra komórkowe hematoksyliną i odwadniano w szeregu alkoholowym.

Ekspresję badanych markerów oceniano przy użyciu mikroskopu świetlnego Olympus BX53 przy powiększeniu 400x wyposażonym w cyfrową kamerę Olympus ColorViewIIIa (Olympus, Japonia). Pomiary wykonano przy użyciu programu Cell^A and Cell^B software (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Niemcy).

Do oceny ekspresji białek, które charakteryzują się reakcją cytoplazmatyczną (COX-2, wimentyna, endosialina, Foxp3) została zastosowana 12-punktowa skala półilościowa IRS (immunoreactive score) zmodyfikowana wg Remmele i Stegner. Metoda ta uwzględnia zarówno odsetek komórek pozytywnych (A), jak i intensywność koloru reakcji (B), a ostateczny wynik jest iloczynem tych parametrów (AxB) i wynosi od 0 do 12 pkt.: brak reakcji – 0 pkt. [-]; słaba reakcja 1-2 pkt. [+], średnia reakcja 3-4 pkt. [++], intensywna

reakcja 6-12 pkt. [+++]. Ekspresja białek dających reakcję jądrową została oceniona na podstawie odsetka pozytywnych komórek: 0-5% - brak reakcji [-], 6-25% słaba reakcja [+], 26-50%, średnia reakcja [++], powyżej 50% intensywne reakcja [+++]. Następnie dokonano porównania stopnia ekspresji badanych markerów komórkowych w zmianach złośliwych (*fibrosarcoma*) oraz niezłośliwych (*fibroma*). Uzyskane wyniki zostały poddane obróbce statystycznej z wykorzystaniem pakietu StatSoft Polska Statistica i odpowiednich testów statystycznych.

Ekspresja jądrowa Ki-67 została odnotowana zarówno w guzach o typie *fibroma* jak i guzach o typie *fibrosarcoma*. 84% badanych przez nas *fibroma* nie wykazywało ekspresji Ki-67, co potwierdza, iż komórki tych guzów nie dzielą się tak intensywnie jak w przypadku nowotworów złośliwych. Ekspresję Ki-67 w przypadku badanych przez nas *fibrosarcoma* wykazano w 50% przypadków. Przeprowadzona przez nas analiza statystyczna wykazała dodatnią korelację między stopniem złośliwości a ekspresją Ki-67 (analiza korelacji Spearmana, $p < 0.05$; $r = 0.74$).

COX-2 wykazywała reakcję cytoplazmatyczną wyłącznie w guzach typu *fibrosarcoma*. W przypadku *fibroma* nie odnotowano ekspresji COX-2 w żadnym z guzów. Ekspresja COX-2 wzrastała wraz ze stopniem złośliwości w *fibrosarcoma*. Ponadto wykazano dodatnią korelację pomiędzy ekspresją Ki-67 a ekspresją COX-2 (analiza korelacji Spearmana, $p < 0.05$; $r = 0.31$).

Ekspresja wimentyny potwierdziła mezenchymalne pochodzenie guzów we wszystkich badanych guzach.

Cytoplazmatyczna ekspresja endosialiny została stwierdzona zarówno we włókniakach jak i we włókniakomięsakach. W przypadku włókniaków zaobserwowano słabą reakcję w 16% badanych guzów oraz średnią w 19%. W przypadku włókniakomięsaków

17,5% wykazywało słabą reakcję, 17,5% średnią reakcję, a aż 47,5% silną reakcję. Ponadto w przypadku *fibrosarcoma* intensywność ekspresji endosialiny wyraźnie wzrastała wraz ze stopniem złośliwości badanych guzów, co potwierdza przeprowadzona analiza statystyczna (analiza korelacji Spearmana, $p < 0.05$; $r = 0.71$).

W przeprowadzonych badaniach uzyskaliśmy dodatnią korelację poziomu ekspresji endosialiny i Ki-67 (analiza korelacji Spearmana, $p < 0.05$; $r = 0.63$) oraz endosialiny i COX-2 (analiza korelacji Spearmana, $p < 0.05$; $r = 0.31$). Wynik ten oznacza, iż endosialina może mieć związek z potencjałem proliferacyjnym komórek guza oraz może brać udział w progresji nowotworzenia. Rezultaty naszych badań pozwalają przypuszczać, iż endosialina może brać udział w procesie kancerogenezy w *fibrosarcoma* u psów. Wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *In Vivo* ("Endosialin (CD248) Expression in Fibromas and Soft-tissue Fibrosarcomas in Dogs", *In vivo*, Maj- Czerwiec 2021, 35(3):1467-1472).

Ostatnim etapem badań była ocena ekspresji białka Foxp3 we włókniakach i włókniakomięsakach. W przypadku włókniaków nie uzyskaliśmy ekspresji Foxp3. Obserwowaliśmy ją jedynie w przypadku włókniakomięsaków. Białko Foxp3 wykazywało cytoplazmatyczną reakcję. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała pozytywną zależność pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej badanych guzów a intensywnością ekspresji Foxp3 (analiza korelacji Spearmana, $p < 0.05$; $r = 0.54$). Ponadto wykazano dodatnią korelację pomiędzy intensywnością ekspresji Foxp3 a Ki-67 (analiza korelacji Spearmana, $p < 0.05$; $r = 0.44$). Wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *In Vivo* ("Expression of Foxp3 in Fibromas and Fibrosarcomas of Skin and Subcutaneous Tissue in Dogs." *In Vivo*, Marzec-Kwiecień 2023; 37(2):618-624). Wynik ten, podobnie jak w przypadku endosialiny sugeruje związek obecności cytoplazmatycznego Foxp3 z procesem kancerogenezy *fibrosarcoma* u psów.

Uzyskane wyniki są obiecujące. pozwalają przypuszczać, że zarówno endosialina jak i Foxp3 biorą udział w progresji nowotworzenia. Jednak, aby dokładnie poznać ich rolę biologiczną w tym procesie, konieczne jest wykonanie dalszych badań.

5. ABSTRACT

The study was performed using specimens archived in the Department of Pathology in Wroclaw University of Environmental and Life Sciences.

The study was conducted on 71 canine skin and subcutaneous tumors including 31 fibromas and 40 fibrosarcomas. The specimens were obtained from dogs in various age and breed; 56% of studied animals were females (Fig. 4). The most common breed among studied animals was mongrel dogs (37%), followed by labrador retriever (10%), Bernese Mountain Dog, German Shepherd, boxer dogs (6% each), golden retriever, Siberian Husky (4% each), beagle, Yorkshire Terrier (3% each), Bavarian Mountain Hound, English Cocker Spaniel, medium poodle, French Bulldog, American Staffordshire Terrier, Doberman pinscher, Weimaraner, Polish Hound, miniature schnauzer, English springer spaniel, pug, Maltese, English Bulldog and shar pei (1.5% each; Fig. 5).

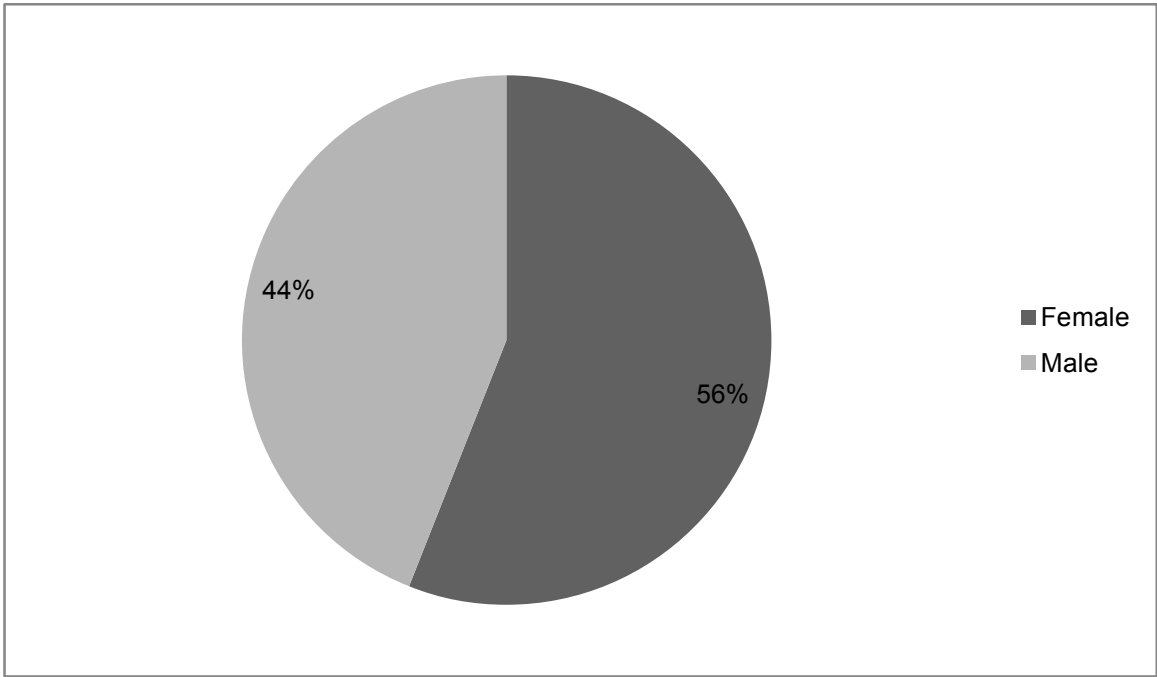


Fig. 4. The sex distribution in dogs included in the study.

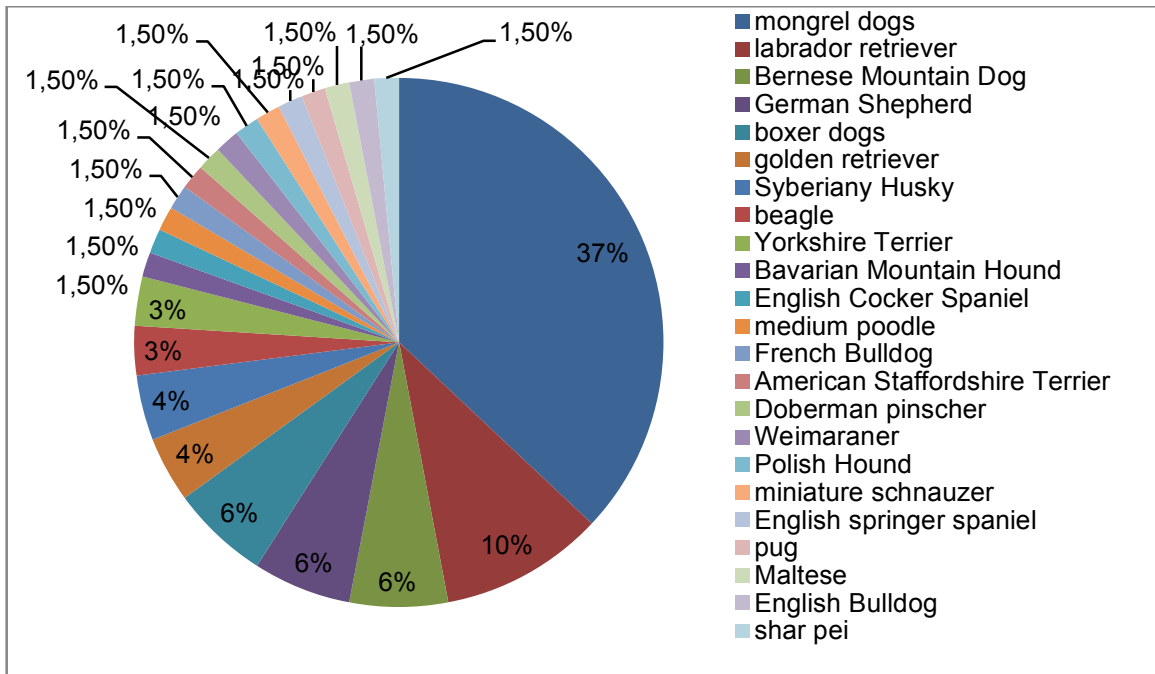


Fig. 5. The distribution of breeds among dogs included in the study.

The tumors were fixed in 7% buffered formalin, cut into and embedded in paraffin blocks. Subsequently, the material was cut into 4-6 μ m slices and placed on microscopic slides.

The material was stained with standard hematoxylin-eosin method and examined by two independent pathologists. The evaluation included the histopathological assessment and grading in 3-degree scale. Grading was based on three parameters: a) the histological differentiation of the tumour cells (1: well-differentiated cells; 2: poorly-differentiated cells; 3: cells without signs of differentiation), b) the number of mitoses in 2,37mm² (1: 0-9 mitoses/2,37mm²; 2: 10-19 mitoses/2,37mm²; 3: >19 mitoses/2,37mm²), c) the area of necrosis (0: no necrosis in the tumor; 1: necrosis \leq 50% of tumor area; 2: necrosis >50% of tumor area). The points for each criterion were summed to assess the malignancy grading (G): G1 (2-3 points), G2 (4-5 points), G3 (6-8 points).

The next stage of the study involved immunohistochemical (IHC) examination using antibodies against: Ki-67, COX-2, vimentin, Foxp3 and endosialin.

The IHC examination was performed on 4-6 μ m paraffin slices placed on microscopic slides (Menzel-Glaser[®]), deparaffinized and dehydrated. The tissue antigens were visualized using EnVision[™] FLEX Target Retrieval Solution, High pH (Dako[®]) for cyclooxygenase-2 (COX-2), or EnVision[™] FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (Dako[®]) for Ki-67, endosialin, Foxp3 and vimentin. All specimens were incubated in water bath in 96°C for 20 minutes. The endogenous peroxidase was blocked using EnVision[™] FLEX Peroxidase-BlockingReagen for 10 minutes. The primary antibodies were put on slides, including: Dako[®] Monoclonal Mouse Anti-Vimentin, (dilution 1:100, clone V9), Dako[®] Monoclonal Mouse Anti-COX-2 (dilution 1:100, clone CX-294), Monoclonal Mouse Anti-Ki-67 (dilution 1:100, clone MIB-1), BioTechne Polyclonal Rabbit Anti-ednosialin (dilution 1:400) and Novus

Biologicals Polyclonal Rabbit Anti-FOXP3 (dilution 1:200). All antibodies were incubated for 20 minutes in room temperature. Further, the slides were washed in EnVision™ FLEX WashBuffer and visualized using EnVision™ FLEX /HR SM802 and incubated for 20 minutes in room temperature. The IHC reaction was visualized using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) solution, EnVision™ FLEX DAB+ Chromoge (Dako®). The slides were then rinsed in distilled water, counterstained with hematoxylin and dehydrated in row of alcohol.

The expression of examined markers was performed using light microscope Olympus BX53, equipped with digital camera Olympus ColorViewIIIa (Olympus, Japan) with 400x magnification. The measurements were performed using Cell^A and Cell^B software (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Germany).

The evaluation of proteins with cytoplasmic reaction (COX-2, vimentin, endosialin, Foxp3) was performed using modified 12-point semiquantitative immunoreactive score according to Remmele and Stegner. The method takes into account both the percentage of positive cells (A) and the intensity of reaction (B). The final result is a product of these parameters (AxB) from 0 to 12 points: 0 points – no reaction; 1-2 points – weak reaction (+); 3-4 points – moderate reaction (++); 6-12 points – strong reaction (+++). The evaluation of protein with nuclear reaction (Ki-67) was determined basing on the percentage of positive cells: 0-5% - no reaction (-); 6-25% - weak reaction (+); 26-50% - moderate reaction (++); >50% - strong reaction (+++).

The results of protein expression was compared between benign (fibroma) and malignant (fibrosarcoma) tumors. The obtained results were subjected to statistical analysis using Statistica software (StatSoft, Poland) and appropriate statistical tests.

The nuclear expression of Ki-67 was noted in both fibromas and fibrosarcomas, although 84% of examined fibromas did not show the expression of that marker, what is consistent with the expected lower mitotic activity in that type of tumor as compared to the malignant form. The expression of Ki-67 was noted in 50% of fibrosarcomas. The statistical analysis showed a positive correlation between the malignancy grade and Ki-67 expression (Spearman correlation analysis; $p < 0.05$; $r = 0.74$).

COX-2 showed cytoplasmic reaction only in fibrosarcomas; in fibromas no expression of COX-2 was noted. The expression of COX-2 was higher with increasing malignancy grade in fibrosarcomas. Moreover, a positive correlation was noted between the expression of Ki-67 and COX-2 (Spearman correlation analysis; $p < 0.05$; $r = 0.31$).

The presence of positive reaction of vimentin confirmed a mesenchymal origin of all examined tumors.

The cytoplasmic reaction of endosialin was noted in both fibromas and fibrosarcomas. In fibromas weak reaction was noted in 16% of tumors and moderate reaction was noted in 19% of tumors. In fibrosarcomas, 17.5% showed weak reaction, 17.5% showed moderate reaction and 47.5% showed strong reaction. Moreover, in fibrosarcomas the intensity of endosialin reaction increased with tumour malignancy grade, what was confirmed with the statistical analysis (Spearman correlation analysis; $p < 0.05$; $r = 0.71$).

Our study showed also a positive correlation between the expression of endosialin and Ki-67 (Spearman correlation analysis; $p < 0.05$; $r = 0.63$) and endosialin and COX-2 (Spearman correlation analysis; $p < 0.05$; $r = 0.31$). In our opinion, endosialin can be associated with the proliferation potential of the tumor and may play a role in the neoplastic progression. The obtained results suggest that endosialin is involved in the cancerogenesis in fibrosarcomas in

dogs. The results were published in “Endosialin (CD248) Expression in Fibromas and Soft-tissue Fibrosarcomas in Dogs”, *In vivo*, May-June 2021, 35(3):1467-1472.

The final stage of our study was an assessment of Foxp3 expression in fibromas and fibrosarcomas. In fibromas no expression of the protein was noted, while in fibrosarcomas Foxp3 protein showed a cytoplasmic reaction. The statistical analysis showed a positive correlation between the intensity of Foxp3 reaction and tumour malignancy grade (Spearman correlation analysis; $p < 0.05$; $r = 0.54$). Moreover, a positive correlation between the expression intensity of Foxp3 and Ki-67 was noted (Spearman correlation analysis; $p < 0.05$; $r = 0.44$). The results were published in “Expression of Foxp3 in Fibromas and Fibrosarcomas of Skin and Subcutaneous Tissue in Dogs.” *In Vivo*, March-April 2023; 37(2):618-624. Similarly to endosialin, the results suggest a relationship of cytoplasmic presence of Foxp3 and cancerogenesis in fibrosarcomas in dogs.

The obtained results are promising and allow to draw an assumption that both endosialin and Foxp3 take a part in the progression of neoplastic process in fibrosarcomas in dogs. Nonetheless, further studies are required to better understand the role of the abovementioned proteins in that process.