

# Zastosowanie metod immunohistochemicznych na przykładzie badań nowotworów gruczołu sutkowego u psów

Anna M. Badowska-Kozakiewicz

z Zakładu Biofizyki i Fizjologii Człowieka Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Najwyższą swoistością charakteryzują się te oddziaływania między związkami chemicznymi, które polegają na wzajemnym dopasowaniu przestrzennym (komplementarności) wiążących się ze sobą cząsteczek. Są to tzw. oddziaływania stereospecyficzne, w wyniku których nie tworzą się wiązania kowalencyjne, natomiast cząsteczki łączą się ze sobą za pośrednictwem słabych, lecz licznych wiązań wynikających z bliskości atomów dopasowanych do siebie cząsteczek. W ten sposób dochodzi do połączenia między antygenem i przeciwciałem, między zasadami purynowymi i pirymidynowymi w kwasach nukleinowych czy między cukrowcami i niektórymi glikoproteidami. Techniki histochemiczne wykorzystujące ten charakter połączeń noszą nazwę histochemii powinowactwa i cechują się najwyższym stopniem specyficzności spośród wszystkich metod histochemicznych. Do histochemii powinowactwa należą: immunohistochemia, histochemia lektyn oraz hydrocytochemia.

Celem immunohistochemii jest ujawnienie swoistych antygenów w komórkach i tkankach na zasadzie wywoływania reakcji antygen-przeciwciała i uwidocznienie tego zjawiska w preparatach mikroskopowych. Prekursorem tej metody diagnostycznej był Albert Coons, który w 1940 r. zastosował technikę immunofluorescencji do wykrywania antygenów w mrożonych skrawkach. Później stopniowo udoskonalano te procedury w celu zwiększenia ich czułości i swoistości. W dzisiejszych czasach trudno wyobrazić sobie nowoczesną diagnostykę patomorfologiczną bez tego sposobu badań. Patologia mikroskopowa narządów wewnątrzwydzielniczych, w których procesy nowotworowe mogą współistnieć ze zmianami czynnościowymi należy do szczególnie trudnych działów histopatologii. Do bezbłędneho rozpoznawania procesów patologicznych gruczołów dokrewnych istotne wydaje się ustalenie, jakie hormony zawierają komórki zmiany. Osiągnąć to można poprzez wykorzystywanie przeciwciał skierowanych przeciwko hormonom i ich prekursorom. Większość tych antygenów można poszukiwać

w materiale tkankowym utrwalonym w formalinie zatopionym w parafinie albo rozmazach cytologicznych utrwalonych w alkoholu etylowym. Otwiera to drogę do stosowania badań immunohistochemicznych i immunocytochemicznych w ramach rutynowej diagnostyki patomorfologicznej. Jednak znaczna część biologicznie czynnych substancji obecna jest w różnych narządach i tkankach. Oznacza to, że nie można poprzestać na wykonaniu jednego odczytu, aby być pewnym słuszności sformułowanego rozpoznania. Im więcej przeprowadzi się takich reakcji, tym bliżej prawdy absolutnej znajdzie się wynik badania.

## Podstawy immunohistochemii

### Antygen i przeciwciała

Antygen jest to substancja, która wykazuje dwie właściwości: immunogenność i antygenowość. Immunogenność jest to zdolność do wywołania wytwarzania swoistych przeciwciał przez układ immunologiczny organizmu, zaś antygenowość to zdolność do swoistego wiązania się z przeciwciałem i do tworzenia z nim kompleksu.

Przeciwciała są immunoglobulinami wytwarzanymi przez w pełni zróżnicowane limfocyty B – plazmocyty, zdolnymi do swoistego łączenia się z antygenem.

### Przeciwciała poliklonalne

Przeciwciała poliklonalne to grupa przeciwciał rozpoznająca zasadniczo jeden antygen, ale reagująca z różnymi jego epitopami. W badaniach histochemicznych wybór rodzaju przeciwciał zależy od specyfiki celu, do jakiego mogą być użyte. Do wielu badań, które obejmują również niektóre zastosowania w diagnostyce i terapii, przeciwciała poliklonalne są w zupełności wystarczające. Ich dużym atutem jest niski w porównaniu z przeciwciałami monoklonalnymi koszt uzyskiwania. Zdolność do rozpoznawania różnych determinantów antygeny sprawia, że przeciwciała poliklonalne mają bardzo wysoką „zachłanność”, która wynika z faktu, że całkowita siła oddziaływania przeciwciał poliklonalnych

## Application of immunohistochemical methods for canine mammary gland tumor diagnosis

Badowska-Kozakiewicz A.M., Medical University of Warsaw, Department of Biophysics and Human Physiology

This article aims at the critical presentation of immunohistochemical techniques in the diagnosis of cancer in animals. Routine histopathological examination allows evaluate the type of tumor and the degree of tumor malignancy. It cannot however, reveal tumor markers what is very important for early diagnosis as well as for the evaluation of clinical stage and treatment monitoring of the disease in humans. Application of immunohistochemical methods is therefore supportive to histopathology in neoplastic diseases. However, these methods are not in routine use in veterinary oncology. This article presents and describes role of immunohistochemistry for evaluating not only changes in expression of tumor markers but also for the characterization of intermediate filaments in the canine mammary tumor cells. Other markers, important for monitoring the ongoing disease, such as estrogen receptors, p53 protein, heat shock proteins and cyclooxygenase-2 are good candidates for immunohistochemical techniques in veterinary oncology.

**Keywords:** immunohistochemical methods, tumor markers, canine mammary gland.

z wieloma różnymi epitopami antygeny jest znacznie większa niż prosta suma pojedynczych oddziaływań, ponieważ wiązanie przeciwciała zwiększa prawdopodobieństwo przyłączenia kolejnego przeciwciała przez sąsiedni epitop. Dzięki tej właściwości za pomocą przeciwciał poliklonalnych łatwo i z wysoką czułością można stwierdzić obecność lub brak danego antygeny oraz określić jego stężenie.

### Przeciwciała monoklonalne

Przeciwciała monoklonalne są produkowane przez nieróżnicujące się, stanowiące jeden klon limfocyty B; rozpoznają tylko jeden, ściśle określony determinant antygenowy (1). Produkcja przeciwciał monoklonalnych jest bardziej skomplikowana niż przeciwciał poliklonalnych. Jedną z metod jest metoda opracowana przez Kohlera i Milsteina w 1975 r., polegająca na fuzji komórki plazmatycznej produkującej przeciwciała z komórką szpiczaka (2). Przeciwciała monoklonalne używane są wszędzie tam, gdzie przede wszystkim wymagana jest wysoka specyficzność i powtarzalność reakcji z antygenem. Dlatego też ten typ przeciwciał znalazł zastosowanie w cytometrii przepływowej. Ważną zaletą przeciwciał monoklonalnych jest fakt,

że dzięki wysokiej specyficzności można używać ich w bardzo małych stężeniach, eliminując przy tym skłonność do krzyżowych reakcji z innymi białkami oraz wiązanie niespecyficzne dające tzw. tło. Dodatkowo przeciwciała monoklonalne umożliwiają odróżnienie od siebie minimalnie różniących się antygenów. Należy również wspomnieć, że przeciwciała monoklonalne mają również wady, które mogą wynikać z ich wysokiej specyficzności. Na przykład badanie wieloepitopowego antygeny za pomocą jednego rodzaju przeciwciał monoklonalnych mogącego wiązać się tylko do jednego epitopu może dać wyniki nieadekwatne do rzeczywistości.

### Otrzymywanie i oczyszczanie przeciwciał do badań immunohistochemicznych

Ponieważ istnieje międzygatunkowe zróżnicowanie układu immunologicznego, antygenem wywołującym tworzenie przeciwciał może być prawie każde białko osobnika innego gatunku. W warunkach fizjologicznych układ reaguje na „obce” antygeny, które dostały się do organizmu w sposób naturalny. Należy jednak mieć na uwadze, że układ immunologiczny zareagowałby podobnie na dowolne białko obcego gatunkowo organizmu, gdyby się z nim zetknął. Na tej podstawie można wywnioskować, że każda struktura komórkowa czy też tkankowa składająca się z białka ma potencjalnie właściwości antygenowe i to właśnie wykorzystuje immunohistochemia.

### Znakowanie przeciwciał

Uwidocznienie miejsca wiązania się przeciwciała z antygenem zlokalizowanym w komórce czy tkance możliwe jest jedynie pod warunkiem odpowiedniego znakowania przeciwciała. Przeciwciała mogą być znakowane fluorochromami, enzymami i metalami.

### Przygotowanie materiału do badań immunohistochemicznych

Odpowiednie przygotowanie materiału ma kluczowe znaczenie dla właściwego przebiegu reakcji immunohistochemicznych. Poszczególne etapy przygotowania materiału mogą zmienić konformację determinant antygenowych i w ten sposób uniemożliwić jego swoiste rozpoznanie przez przeciwciała.

### Utrwalanie materiału do badań

Celem utrwalania materiału jest natychmiastowe zatrzymanie procesów metabolicznych w komórkach i tkankach poprzez denaturację enzymów. Można w ten sposób zapobiec zmianom autolitycznym, czyli

samotrawieniu komórek przez ich własne enzymy lizosomowe oraz wtórnym zmianom rozkładowym i gnilnym wywołanym przez obecne w materiale lub też zawleczone z zewnątrz bakterie.

Stosowane utrwalacze, a zwłaszcza o charakterze aldehydów, wywierają niekorzystny wpływ na antygenowość materiału. Dlatego też zaleca się krótkotrwałe utrwalanie w szybko penetrujących utrwalaczach precypitacyjnych, jak np. alkohole. Czasami jedynym wyjściem jest przeprowadzenie reakcji immunohistochemicznej na materiale nieutrwalanym.

### Zatapianie materiału do badań

Aby uniknąć niekorzystnego wpływu zatapiania na antygenowość tkanki, można stosować technikę mrożeniową, zarówno na poziomie mikroskopu optycznego, jak i elektronowego. Obecnie istnieje jednak możliwość wykrywania wielu antygenów na skrawkach parafinowych, gdyż udało się uzyskać przeciwciała przeciw takim miejscom antygenowym, które nie ulegają deformacji pod wpływem procesu zatapiania w parafinie.

### Odsłanianie miejsc antygenowych

Utrwalenie i zatopienie materiału bardzo często powoduje zmiany w cząsteczkach antygeny, które utrudniają, a nawet uniemożliwiają rozpoznanie determinant antygenowych przez swoiste przeciwciała. Uzyskuje się wówczas słabą intensywność, a nawet całkowity brak reakcji immunohistochemicznej. W takich sytuacjach po pokrojeniu materiału i ewentualnym usunięciu środowiska zatapiającego należy stosować metody przywracające antygenom ich pierwotne cechy, co określa się mianem odsłaniania lub odmaskowywania determinant antygenowych. Do najczęściej stosowanych należą kontrolowane trawienie skrawków przy użyciu enzymów proteolitycznych i działanie na skrawki mikrofalami. Rodzaj postępowania zależy od charakteru antygeny i materiału. Należy je w każdym przypadku dobrać doświadczalnie.

### Typy reakcji immunohistochemicznych z uwzględnieniem reakcji kontrolnych

Reakcja bezpośrednia polega na inkubacji tkanki zawierającej antygen A ze znakowanym przeciwciałem anti-A. Znakowane przeciwciała tworzy kompleks z antygenem w tkance i umożliwia jego mikroskopową lokalizację. Należy wspomnieć, że reakcja bezpośrednia ma też istotną wadę, a mianowicie chemiczne połączenie przeciwciała ze znacznikiem za pośrednictwem wiązań kowalencyjnych z reguły zmienia

kształt cząsteczki przeciwciała, co może utrudniać jego zdolność rozpoznawania i przyłączania antygeny, czyli obniżyć powinowactwo przeciwciała do antygeny. Ten typ reakcji jest obecnie rzadko stosowany, głównie przy rutynowym wykonywaniu bardzo licznych preparatów immunohistochemicznych.

Reakcja pośrednia jest bardziej złożona i technicznie trudniejsza, ale pozbawiona głównej wady reakcji bezpośredniej. Przeciwciała wiążące antygen tkankowy nie jest znakowane, a zatem unika się ewentualnych zmian struktury przeciwciała wynikających z jego chemicznej koniugacji ze znacznikiem.

Mimo że reakcje immunohistochemiczne wykazują wysoką swoistość, to należy pamiętać, iż warunkiem koniecznym jest wykonanie reakcji kontrolnych zarówno negatywnych, jak i pozytywnych, które świadczą o wiarygodności uzyskanych wyników badań. Jako kontrolę negatywną może posłużyć tkanka, która nie ma interesującego nas antygeny, zaś kontrolę pozytywną wykonuje się na tkance, która ma interesujący nas antygen, jest to tzw. tkanka wzorcowa.

### Przebieg badania immunohistochemicznego

Wycinki guzów utrwalane są w 8% formalinie buforowanej fosforanami. Po 24-godzinnym utrwalaniu materiał odwadniany jest w szeregu alkoholi o wzrastających stężeniach, kolejno: 50, 60, 70, 80, 90, 96%, oraz alkoholu absolutnym i ksylenie, a następnie zatapiany w parafinie. Błoczki parafinowe krojone są na skrawki o grubości 4 µm. Uzyskane skrawki są naklejane na szkiełka podstawowe pokryte 2% roztworem silanu w acetonie i suszone przez 24 godziny w temperaturze 42°C. Przed rozpoczęciem procedury immunohistochemicznej skrawki są poddawane rutynowemu procesowi odparafinowania w szeregu alkoholi o malejących stężeniach i płukane w wodzie destylowanej. W reakcjach immunohistochemicznych używa się mono- i poliklonalnych przeciwciał w odpowiednich rozcieńczeniach w 1% BSA. Należy tu wspomnieć, że w diagnostyce patomorfologicznej nowotworów sutka u psów rutynowo stosuje się myśie monoklonalne przeciwciała przeciwko filamentom pośrednim: wimentynie, cytokeratynie, aktynie, a także królicze poliklonalne przeciw bydłecemu białku S100. Również stosowane jest w diagnostyce patomorfologicznej myśie monoklonalne przeciwciała przeciw ludzkiemu antygenowi jądrowemu Ki-67. Dodatkowo w medycynie weterynaryjnej w celach naukowych stosowane są przeciwciała: myśie monoklonalne przeciw ludzkiemu białku

p53, mysie monoklonalne przeciw ludzkiemu receptorowi estrogenowemu alfa, mysie monoklonalne przeciw ludzkiemu receptorowi COX-2, mysie monoklonalne przeciw ludzkim białkom szoku cieplnego Hsp70 oraz Hsp90.

Następnie preparaty umieszczane są w buforze o pH 9 lub pH 6 w zależności od antygenu i poddawane obróbce termicznej w łaźni wodnej przez 30 minut w temperaturze 90°C lub w kuchence mikrofalowej (1 × 5 minut przy 600 W, 2 × 5 minut przy 300 W), również w zależności od rodzaju antygenu w celu odsłonięcia ich epitopu. Po odsłonięciu epitopu antygenów skrawki są studzone przez 20 minut, a następnie po dwukrotnym przepłukaniu wodą destylowaną i 5-minutowej inkubacji z 3% wodą utlenioną preparaty są przepłukiwane buforem TRIS o pH 8, następnie nakładane jest pierwsze przeciwciało w odpowiednim rozcieńczeniu i inkubowane w komorze wilgotnej przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty są płukane w buforze TRIS o pH 8 przez 10 minut. Do wizualizacji reakcji immunohistochemicznej stosuje się zestaw En Visio +™ System (monoklonalny lub poliklonalny odpowiednio dla przeciwciała). Następnie preparaty są płukane w buforze TRIS o pH 8 i nakraplany jest roztwór dwuaminobenzodiny (DAB). W kolejnym etapie kontroluje się stopień wybarwienia preparatów, a następnie płucze się je w wodzie wodociągowej i barwi przez 5 minut w hematoxylinie Ehrlicha. Następnie poddaje się preparaty różnicowaniu w 1% alkoholu kwaśnym i ponownie płucze w wodzie wodociągowej. W końcowym etapie preparaty są odwadniane w szeregu alkoholu o rosnących stężeniach i prześwietlane w ksylenie i zamykane w DPX mounting medium firmy Gurr®.

Celem tej publikacji jest przedstawienie wartości diagnostycznej przeciwciał monoklonalnych i poliklonalnych w patomorfologii nowotworów gruczołu sutkowego u psów, jak również przybliżenie podstaw technik immunohistochemicznych i ich znaczenia w rutynowej diagnostyce patomorfologicznej.

Techniki immunohistochemiczne są głównie stosowane w diagnostyce nowotworów. Badania histopatologiczne pozwalają jedynie na określenie typu nowotworu, stopnia histologicznej złośliwości, ale nie pozwalają na wykrywanie markerów nowotworowych, które mają duże znaczenie w szczegółowej diagnostyce nowotworów, w ocenie stanu zaawansowania choroby, a także w wyborze terapii i monitorowaniu pacjentów. Techniki immunohistochemiczne pełnią rolę wspomagającą dla technik histopatologicznych w onkologii weterynaryjnej, ale należy wspomnieć,

że w medycynie weterynaryjnej nie są one stosowane rutynowo, jak ma to miejsce w medycynie ludzkiej. Poprzez techniki immunohistochemiczne można dokonywać charakterystyki filamentów pośrednich, a także oznaczać markery proliferacji. W tym artykule zostaną przedstawione przykłady zastosowań immunohistochemii w diagnostyce weterynaryjnej na przykładzie nowotworów gruczołu sutkowego u psów, takie jak: charakterystyka filamentów pośrednich, markerów proliferacji, jak również charakterystyka innych markerów przydatnych w diagnostyce patomorfologicznej, np. receptory estrogenowe, białko p53, białka szoku cieplnego czy cyklooksygenaza-2.

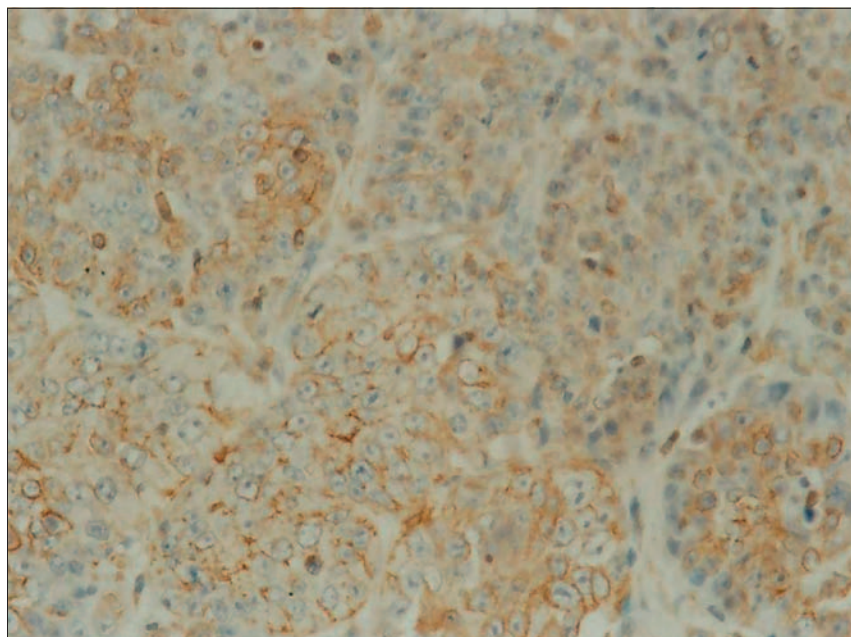
### Badania histochemiczne nowotworów gruczołu sutkowego psów

W diagnostyce patomorfologicznej bardzo istotne jest określenie pochodzenia nowotworu. W tym celu wykorzystuje się immunohistochemiczne oznaczanie ekspresji w tkance nowotworowej markerów filamentów pośrednich, np. cytokeratyny, wimentyny czy aktyny.

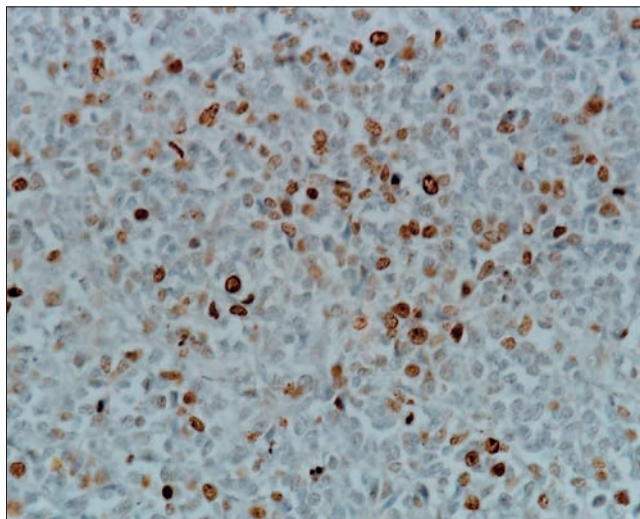
Filamenty pośrednie są najszybszymi i najbardziej wytrzymałymi elementami cytoszkieletu, zapewniają komórce zdolność przeciwstawiania się mechanicznym stresom. Tworzą wewnątrz cytoplazmy sieć oplatającą m.in. jądro komórkowe. Filamenty te są nazywane pośrednimi, ponieważ ich średnica (około 10 nm) jest większa od średnicy filamentów cienkich zawierających aktynę (około 7 nm), a mniejsza od mikrotubul (średnica około 25 nm). Filamenty pośrednie składają się z białek filamentów pośrednich, które

stanowią dużą i heterogenną rodzinę. Wyróżnia się wśród nich: laminy jądrowe wzmacniające otoczkę jądrową, neurofilamenty obecne w komórkach i wypustkach nerwowych, filamenty wimentynowe i wimentynopodobne, obecne m.in. w komórkach tkanki łącznej i mięśniowej oraz w komórkach glejowych układu nerwowego, filamenty keratynowe (cytokeratyny) obecne w komórkach nabłonkowych (3). Cytokeratyny są białkami o zasadniczym znaczeniu w rozwoju i różnicowaniu się komórek nabłonkowych. Filamenty cytokeratynowe różnią się pod względem składu protein i właściwości biochemicznych. Ich ekspresję zaobserwowano w różnych nabłonkach w odmiennych kombinacjach. Cytokeratyny o małej masie cząsteczkowej (40–54 kD) znajdują się głównie w komórkach współtworzących nabłonki walcowate i sześciennie, natomiast o masie cząsteczkowej rzędu 48–67 kD występują w nabłonkach płaskich. Cytokeratyny 8, 18, 19 występują w nabłonkach jednowarstwowych, z kolei cytokeratyny 1, 4, 6, 10, 11, 13, 14 są obecne w nabłonkach wielowarstwowych rogowaciejących (4, 5).

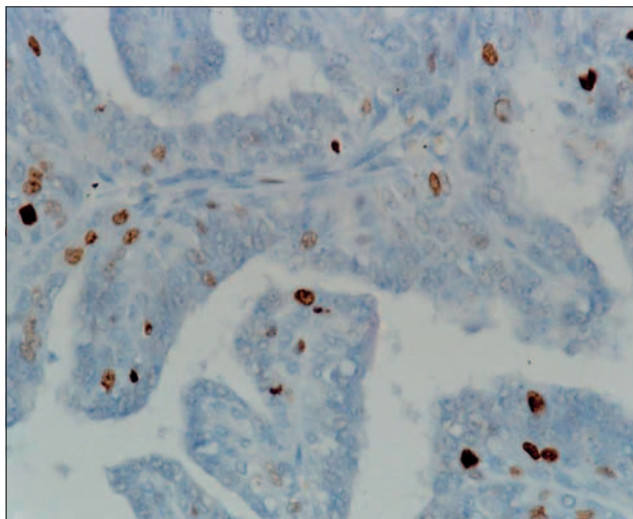
Za pomocą metod immunohistochemicznych, z użyciem przeciwciał przeciwko specyficznym cytokeratynom, można w badanych tkankach wykryć i ustalić rodzaj występujących cytokeratyn. Wiele przeciwciał dostępnych komercyjnie można stosować na skrawkach utrwalonych w formalinie, w niektórych przypadkach możliwe jest to jedynie na skrawkach mrożeniowych. Cytokeratyny mają ogromne znaczenie kliniczne. W odniesieniu do tkanek nowotworowych niejasnego pochodzenia wykrycie cytokeratyn pozwala potwierdzić nabłonkowe pochodzenie



Ryc. 1. Ekspresja cytokeratyny (Anti-Cytokeratin, Dako), w gruczolakoraku złożonym gruczołu mlekowego u psów, pow. 40×



Ryc. 2. Gruczolakorak prosty, metoda IHC, komórki Ki-67+, pow. 40×



Ryc. 3. Gruczolakorak złożony, metoda IHC, komórki Ki-67+, pow. 40×

tkanki, a przeprowadzenie tzw. identyfikacji różnicującej z wykorzystaniem panelu przeciwciał umożliwia dokładne ustalenie pochodzenia tej tkanki. Zastosowanie panelu przeciwciał przeciwko cytokeratynom umożliwia nie tylko określenie rodzaju tkanki nabłonkowej, z której wywodzi się rak, lecz również ocenę stopnia nieprawidłowego zróżnicowania tkanki. W badaniach prowadzonych na rakach psów i kotów stwierdzono, że zastosowanie panelu przeciwciał przeciwko cytokeratynom CK7 i CK20 pozwala określić profil CK7/CJ20 dla tkanki nabłonkowej, z której wywodzi się przerzut danego raka. Stwierdzono, że ekspresja CK20 jest szczególnie przydatna do klasyfikacji raków przewodu pokarmowego. W badaniach tych obserwowano niewielkie różnice w ekspresji CK7 i CK20. Wykazano, że u kotów profil CK7 (+)/CK20 (+) odpowiada gruczolakorakom trzustki, rakom z nabłonka przejściowego pęcherza moczowego, natomiast żaden z raków pochodzących od psów nie cechował się takim profilem (6). Również w diagnostyce patomorfologicznej gruczolu mlekowego u psów bardzo często, zwłaszcza w przypadku tkanek nowotworowych niejasnego pochodzenia, wykrycie cytokeratyn pozwala na potwierdzenie nabłonkowego pochodzenia badanej tkanki.

### Ocena markerów proliferacji komórek nowotworowych

Markerami, które stosowane są do oceny biologii nowotworów, nawet na poziomie molekularnym, są między innymi markery proliferacji komórkowej, np. Ki-67 czy jądrowy antygen proliferacji PCNA. Proliferacyjny antygen jądrowy jest kwasnym, niehistonowym białkiem pomocniczym dla polimerazy DNA (7). W komórce białko to pojawia się pod koniec fazy  $G_1$  cyklu komórkowego, maksymalne

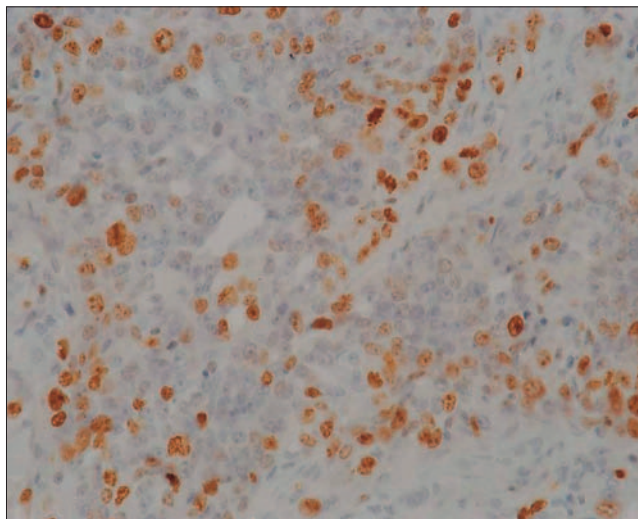
stężenie osiąga w fazie S, a następnie w fazie  $G_2$  stopniowo ulega zmniejszeniu. Drugim niehistonowym białkiem jądrowym jest antygen Ki-67, który jest ściśle związany z procesem proliferacji komórkowej. Jego obecność wykrywa się już w fazie  $G_1$  cyklu, następnie wyraźnie wzrasta w fazach S i  $G_2$ , ze szczytem w fazie M i gwałtownym zanikiem w fazie  $G_0$ . Czasowy układ ekspresji Ki-67 sprawia, że jest ono wykrywane tylko w komórkach proliferujących. Proliferacja może być oznaczana nie tylko za pomocą ekspresji białka Ki-67, ale także poprzez ocenę indeksu mitotycznego, pomiar znakowanej trytem tymidyny oraz ocenę odsetka komórek w fazie S za pomocą cytometrii przepływowej. Skuteczność tych markerów została potwierdzona wieloma badaniami, np. Giziński i wsp. (8), w których autorzy po przebadaniu guzów gruczolu sutkowego suk wykazali dodatnią korelację między wysoką wartością indeksu Ki-67 a małym stopniem zróżnicowania komórek, obecnością przerzutów, złym stanem ogólnym i krótkim czasem przeżycia po zabiegu. W badaniach własnych ekspresja białka Ki-67 obserwowana była w jądrach komórkowych komórek nowotworowych gruczolu mlekowego u psów, które ulegały podziałom (ryc. 2, 3). Analiza statystyczna obrazuje istotne różnice między poszczególnymi rodzajami nowotworów. Najniższa liczba komórek wykazujących ekspresję białka Ki-67 obserwowana była w gruczolakach, zaś najwyższa w rakach litych i rakach prostych oraz w nowotworach o najwyższym stopniu histologicznej złośliwości (III°).

Podstawową cechą nowotworów jest nieograniczony rozrost, będący między innymi skutkiem przewagi proliferacji nad apoptozą, stąd przydatne jako prognostyczne markery są badania nad mechanizmem apoptozy. Do białek, które na drodze odmiennych mechanizmów wpływają

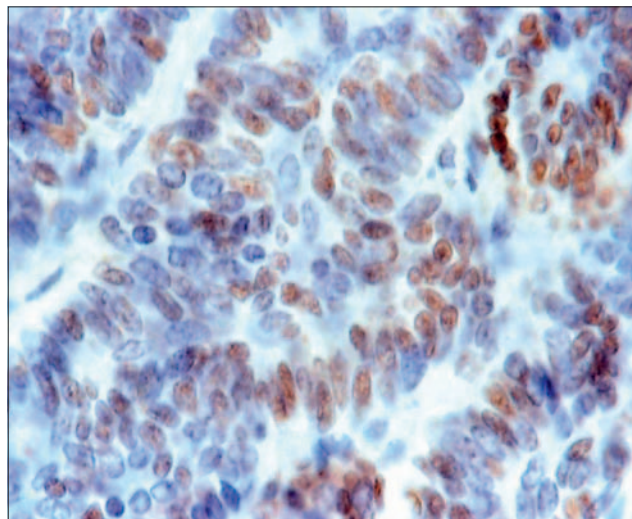
na proces apoptozy należą: p53 i Bcl-2. Białko p53 jest produktem genu *p53* występującego u psów na 5 chromosomie. Białko to jest jednym z czynników transkrypcyjnych odgrywających ważną rolę podczas aktywacji apoptozy. W komórkach nowotworowych p53 często ulega mutacji, co pozwala na niekontrolowany ich wzrost. Mutację genu *p53* uznaje się za niekorzystny czynnik zarówno predykcyjny, jak i prognostyczny. W badaniach własnych ekspresję białka p53 obserwowano w jądrach komórek nowotworowych gruczolu mlekowego u psów (ryc. 4). Ekspresję białka p53 stwierdzono również w gruczolakach. Największą liczbę nowotworów wykazujących pozytywną reakcję białka p53 stanowiły raki złożone i raki proste. Raki lite stanowiły grupę, w której nieczęsto notowano pozytywną reakcję jądrową p53. Pod względem stopnia histologicznej złośliwości ekspresję białka p53 obserwowano w większym procencie (66%) guzów o II° i III° złośliwości.

### Ocena ekspresji receptorów estrogenowych

Uznany markerem w raku sutka u kobiet są receptory estrogenowe. W prawidłowym nabłonku gruczolu sutkowego u kobiet receptor estrogenowy wykrywany jest w 7–17% komórek. Szacuje się, że około 70–80% guzów sutka kobiet wykazuje ekspresję ER, guzy te cechują się wolniejszym wzrostem, wyższym zróżnicowaniem i lepszym rokowaniem przy zastosowaniu odpowiedniego schematu terapeutycznego oraz koreluje z długością przeżycia po chirurgicznym usunięciu (9). Ravdin (10) w swoich badaniach opisał ponad 50% guzów sutka u kobiet jako ER-pozytywnych. Zaś w pozostałych nie stwierdził ich występowania. Badania ekspresji receptorów estrogenowych jak dotychczas dały niejednoznaczne wyniki. Martin



Ryc. 4. Gruczolakorak prosty, IHC, obraz komórek wykazujących ekspresję białka p53, pow. 40×



Ryc. 5. Gruczolakorak prosty, obraz ekspresji receptorów estrogenowych, IHC, pow. 100×

i wsp. (11), badając 228 guzów u suk wykazali ekspresję ER zaledwie w 2,1% badanych nowotworów. Z kolei Pena i wsp. (12), diagnozując 21 przypadków raka, z jednocześnie toczącym się procesem zapalnym, nie stwierdzili ekspresji receptorów estrogenowych. Według Sartin i wsp. (13) największe szanse na długi okres przeżycia po zabiegu mają suki, u których w guzach wykazano ekspresję samego ER lub w koekspresji z PgR, bowiem przy braku ER i PgR badacze zaobserwowali najkrótszy okres przeżycia. Millanto i wsp. (14), w badanych 47 rakach sutka suk stwierdzili, że ekspresja ER oraz PgR w tych guzach nie koreluje z czasem przeżycia ani histologicznymi parametrami guza. Podobnie Sobczak-Filipiak i Malicka (15) wykazały brak korelacji między ekspresją receptorów estrogenowych a indeksem mitotycznym. W badaniach własnych stwierdzono ekspresję receptorów estrogenowych w 40% przebadanych nowotworów. Uzyskane wyniki wskazują najwyższą ekspresję ER alfa w rakach prostych (ryc. 5) oraz rakach o najwyższym stopniu złośliwości. Wykazano istotną statystycznie korelację między indeksem mitotycznym a ekspresją receptorów estrogenowych. Nowak (16) w swoich badaniach spośród 48 guzów od suk w wieku od 7 do 15 lat stwierdził ekspresję ER tylko w 6%. Mulas (17) uzyskał odmienne wyniki, stwierdził on ekspresję ER alfa w nowotworach niezłośliwych. Podobnie McEwen i wsp. (18) wykazali ekspresję receptorów estrogenowych w około 50% przypadków, a poziom ekspresji znacząco wyższy był w nowotworach niezłośliwych. Wyniki Nieto i wsp. (19) są odmienne, gdyż ich badania pokazują korelację pomiędzy ekspresją antygenu jądrowego Ki-67 a ekspresją ER. Autorzy tych badań najwyższy poziom ekspresji obserwowali w rakach prostych i złożonych, podobnie jak w badaniach własnych. Inaczej uważają

Rutteman (20), Sartin (13) oraz Gerald (21), którzy twierdzą, że wysoka ekspresja ER jest obecna w gruczolakach, a gruczolakoraki wykazują niższy poziom ekspresji tego markera.

Literatura prezentuje rozbieżne wyniki badań immunohistochemicznych ekspresji ER alfa w nowotworach gruczołu sutkowego. Zdania co do receptorów estrogenowych jako czynników rokowniczych są bardzo podzielone, niektórzy autorzy uznali je za pozytywny czynnik (17, 22), ale też istnieją głosy postulujące, iż są one negatywnym markerem rokowniczym (23). Ciekawe wydaje się, że w badaniach własnych niska ekspresja ER alfa korelowała ujemnie z wysoką ekspresją antygenu jądrowego Ki-67, tego samego zdania jest Pena (12), która prowadziła badania w nowotworach sutka u suk, oraz Ding (24) badający raki sutka kobiet. Na podstawie badań własnych można wnioskować, że ekspresja receptorów estrogenowych może mieć znaczenie w ocenie złośliwości nowotworów, lecz nie wykazano znaczących powiązań z innymi markerami.

Podsumowując, należy zaznaczyć, że wyniki te są tylko częściowo zbieżne z rezultatami innych autorów lub są wyraźnie odmienne, należy pamiętać o dużej zależności procesów kierujących karcynogenezą. Wobec rozbieżności w wynikach różnych badań wydaje się, że receptory estrogenowe nie mogą stanowić markera prognostycznego w nowotworach sutka u suk.

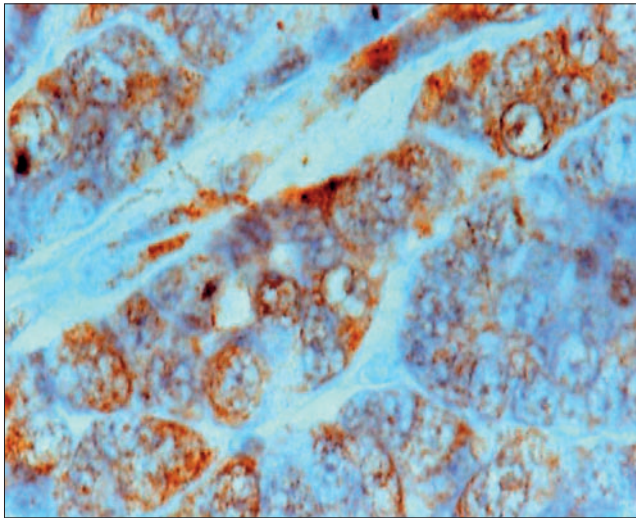
### Ocena ekspresji białek szoku cieplnego

Z badań prowadzonych w medycynie ludzi wynika, że ważnym czynnikiem prognostycznym nowotworów sutka mogą być białka szoku cieplnego. Niewiele jest danych literaturowych dotyczących ekspresji białek szoku cieplnego w nowotworach

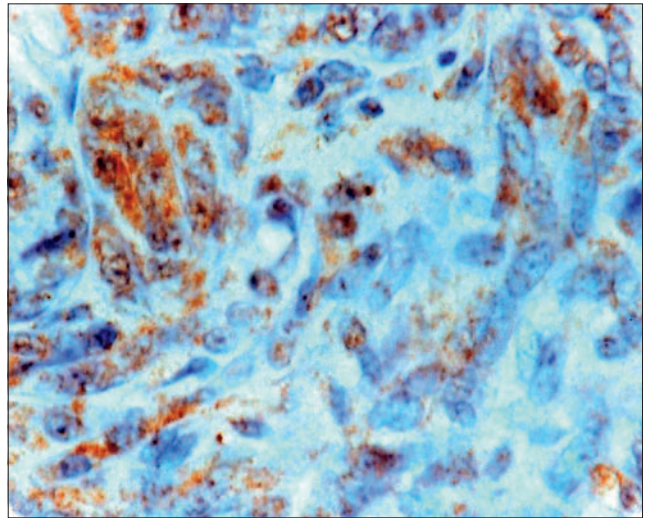
gruczołu sutkowego u suk, jak również nie została precyzyjnie określona rola tych białek w procesie karcynogenezy. Na podstawie dotychczas prowadzonych badań stwierdzono jedynie, że ekspresja białek szoku cieplnego w nowotworach sutka u suk ma miejsce, lecz nie wykazano powiązań tych białek z innymi markerami nowotworowymi.

U psów ekspresję białek szoku cieplnego badano w prawidłowej skórze i raku płaskonabłonkowym skóry oraz w zakaźnym guzie wenerycznym (guz Stickera). Również w raku sutka u suk podobne badania prowadziła Romanucci (25), która stwierdziła ekspresję białek z rodziny Hsp70 i Hsp90 w gruczolakorakach prostych i złożonych oraz litych. Ekspresję tych białek obserwowała w cytoplazmie, ale też w jądrach komórek nowotworowych. Romanucci (25) w swoich badaniach nad rakami gruczołu sutkowego suk nie podjęła próby sprawdzenia, czy istnieją zależności między białkami szoku cieplnego a innymi markerami nowotworowymi. Swoją uwagę autorka skupiła na określeniu stopnia ekspresji białek i ich lokalizacji w komórkach nowotworowych. Romanucci (25) ekspresję Hsp90 stwierdziła we wszystkich badanych guzach (raki proste i złożone) i wykazała, że białka te wiążą się ze złą prognozą i biorą udział w karcynogenezie, podobnie jak białko Hsp27. Autorka na podstawie wyników, które uzyskała w badaniach, zasugerowała, że białka Hsp mogą odgrywać ważną rolę w procesie karcynogenezy. Dane literaturowe świadczą, iż w komórkach raka sutka nadekspresja Hsp70 również wiąże się ze złą prognozą.

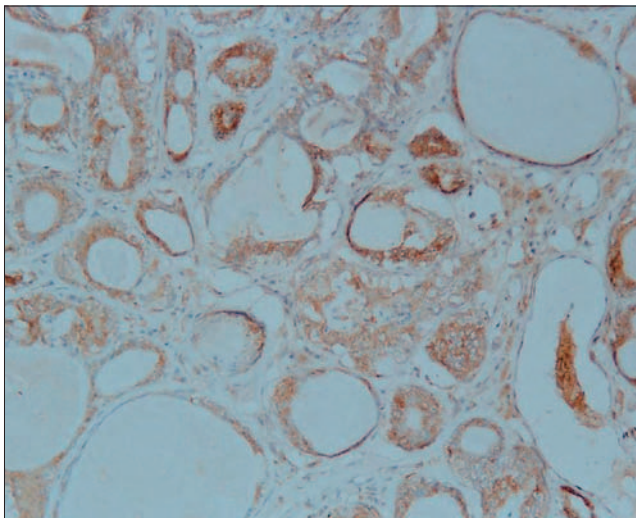
Z badań własnych wynika, że ekspresja białek szoku cieplnego stwierdzana jest w cytoplazmie i w jądrach komórek nowotworowych. Najczęściej ekspresję białek szoku cieplnego stwierdzano



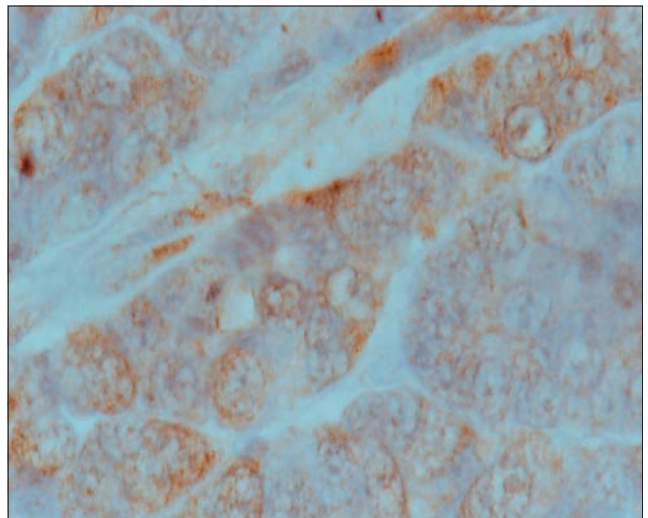
**Ryc. 6.** Gruczolakorak prosty, IHC, obraz komórek wykazujących ekspresję Hsp70, pow. 100×



**Ryc. 7.** Gruczolakorak złożony, IHC, obraz komórek wykazujących ekspresję Hsp70, pow. 40×



**Ryc. 8.** Gruczolak, obraz komórek wykazujących ekspresję cyklooksygenazy-2, pow. 20×



**Ryc. 9.** Gruczolakorak prosty, IHC, obraz komórek wykazujących ekspresję cyklooksygenazy - 2, pow. 10×

w rakach złożonych i prostych gruczołu sutkowego u suk (**ryc. 6, 7**). Bardzo rzadko ekspresja tych białek występowała w rakach litych.

### Cyklooksygenaza-2 – marker nowotworów gruczołu sutkowego u suk

W medycynie ludzkiej stwierdzono ekspresję COX-2 w wielu nowotworach, głównie w raku gruczołowym jelita grubego, niektórych rakach gruczołowych sutka, jak i w raku przewodowym *in situ* w sutku. Ponadto ekspresję cyklooksygenazy-2 stwierdzono w raku gruczołowym płuc (26), raku płaskonabłonkowym i gruczołowym przelyku oraz w pierwotnym czerniaku złośliwym (27). Ostatnie lata przyniosły wiele nowych danych na ten temat także w onkologii weterynaryjnej. Stwierdzono ekspresję COX-2 u psów w raku płaskonabłonkowym (28), raku pęcherza moczowego (29), raku nerki (30), gruczolakorakach jelita (31) i w raku

gruczołu krokowego (32), w guzach komórek tłuszczowych (33) oraz w nowotworach gruczołu sutkowego (34) (**ryc. 8, 9**). Badania ekspresji COX-1 i COX-2 prowadzone były także w rakach sutka na modelu zwierząt laboratoryjnych oraz w hodowlach komórkowych (35). Z tych ostatnich badań wynika, że ekspresję COX-2 wiąże się ze złą prognozą.

Mimo licznych badań dotyczących ekspresji COX-2 w nowotworach, nadal nie jest znany mechanizm działania tego enzymu. Z badań u ludzi wiadomo, że ekspresja COX-2 wiąże się ze złą prognozą. Wysoka ekspresja COX-2 jest powszechna w nowotworach pochodzenia nabłonkowego i przypuszcza się, że może brać udział w karcynogenezie poprzez blokowanie apoptozy i promowanie ekspresji antyapoptotycznego białka bcl-2. Ponadto COX-2 ma wpływ na angiogenezę nowotworową i ekspresję metaloproteinaz, przez co promuje wzrost raków sutka, a także ich inwazyjność. Dotychczasowe

badania prowadzone w nowotworach gruczołu sutkowego suk wykazały ekspresję COX-2, lecz nie uzyskano odpowiedzi, co do związku tej ekspresji z innymi czynnikami uważanymi za markery prognostyczne, jak aktywność proliferacyjna, stopień histologicznej złośliwości czy ekspresja receptorów estrogenowych.

Cyklooksygenaza-2 wydaje się niezwykle interesująca z punktu widzenia nowego markera w diagnostyce patomorfologicznej nowotworów u zwierząt towarzyszących człowiekowi. Dane literaturowe na temat cyklooksygenazy-2 i jej diagnostycznej wartości w różnicowej ocenie histopatologicznej nowotworów u zwierząt są skąpe.

Z badań własnych wynika, że ekspresja cyklooksygenazy-2 oceniana jest w cytoplazmie komórek nowotworowych gruczołu sutkowego suk. Ekspresję tego markera stwierdza się w gruczolakach (**ryc. 8**), rakach litych, a także w rakach prostych (**ryc. 9**).

W ostatnich latach w medycynie weterynaryjnej w określeniu cech nowotworów wprowadza się badania molekularne w oparciu o technikę badania mikromacierzy DNA, która umożliwia jednoczesną ocenę ekspresji wielu tysięcy genów, jednak mimo tego metody immunohistochemiczne od wielu lat cieszą się dużym uznaniem wśród diagnostów medycznych. W szczególności metody immunohistochemiczne znajdują szerokie zastosowanie w diagnostyce patomorfologicznej. Metody immunohistochemiczne pozwalają na ocenę ilościową zabarwionych komórek, ale również na ocenę intensywności reakcji i jej lokalizację w komórce. Metody immunohistochemiczne stanowią uzupełnienie dla rutynowej diagnostyki histopatologicznej. Należy pamiętać, że oznaczanie markerów za pomocą metod immunohistochemicznych należy do jednych z ważniejszych metod w diagnostyce nowotworów. Odkrywanie nowych markerów pozwala na doskonalsze metody diagnozowania nowotworów oraz stwarza podłoże do opracowywania nowych strategii leczenia.

## Piśmiennictwo

- Sędek Ł., Mazur B.: Przeciwciała monoklonalne i poliklonalne i ich zastosowanie w cytometrii przepływowej. *Post. Biol. Kom.* 2008, **24**, 17-34.
- Kohler G., Milstein C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975, **256**, 445-497.
- Dolka I.: Immunohistochemia w diagnostyce weterynaryjnej – szerokie spektrum zastosowań. *Med. Weter.* 2009, **65**, 752-757.
- Gonzalez-Quintela A., Garcia J., Campos J.: Serum cytokeratins in alcoholic liver disease: contrasting levels of cytokeratin-18 and cytokeratin-19. *Alcohol* 2006, **38**, 45-49.
- Galus R., Włodarski K.: Znaczenie cytokeratyny w rozpoznawaniu chorób nowotworowych. *Pol. Merk. Lek.* 2007, **23**, 135, 209-211.
- Espinosa de los Monteros A., Fernandez A., Millon M. Y.: Coordinate Expression of cytokeratins 7 and 20 in feline and canine carcinomas. *Vet. Pathol.* 1999, **36**, 179-190.
- Brown D.C., Gatter K.C.: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990, **17**, 489-503.
- Giziński S., Boryczko Z., Katkiewicz M., Bostedt H.: Białko Ki-67 jako wskaźnik prognostyczny w nowotworach gruczołu sutkowego u suk. *Med. Weter.* 2003, **59**, 888-891.
- Bacus S.S., Goldschmidt R., Chin D., Moran G., Weinberg D., Bacus J.W.: Biological grading of breast cancer using antibodies to proliferating cells and other markers. *Am J Pathol.* 1989, **135**, 783-792.
- Ravdin P.M., Green S., Dorr T.M.: Prognostic significance of progesterone receptor in estrogen-receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 1992, **10**, 1284-1291.
- Martin P.M., Cotard M., Mialot J.P., Andre F., Raynaud J.P.: Animal models for hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 1984, **12**, 13-70.
- Peña L., Nieto A., Perez-Alenza D.: Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: Relationship to clinical and pathologic variables. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998, **10**, 237-246.
- Sartin E.A., Barnes S., Kwapien R.P., Wolfe L.G.: Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1992, **53**, 2196-2200.
- Millanta F., Calandrella M., Bari G., Niccolini M., Vanzo I., Poli A.: Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res. Vet. Sci.* 2005, **70**, 225-232.
- Sobczak-Filipiak M., Malicka E.: Diagnostyka nowotworów gruczołu mlekowego z uwzględnieniem metod immunocytochemicznych. *Materiały Konferencyjne. Onkologia Weterynaryjna*. pod red. Rotkiewicz T., Olsztyn 1997, s. 100-107.
- Nowak R., Tarasiuk J.: Hamowanie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków przeciwnowotworowych. *Post. Bioch.* 2004, **50**, 330-343.
- Mulas J.M., Millán Y., Dios R.: A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet. Pathol.* 2005, **42**, 200-212.
- McEwen E.G., Patnaik A.K., Harvey H.J., Panko W.B.: Estrogen receptor in canine mammary tumors. *Cancer Res.* 1982, **42**, 2255-2259.
- Nieto A., Pena L., Perez-Alenza M.D., Sanchez M.A., Flores J.M., Castano M.: Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet. Pathol.* 2000, **37**, 239-247.
- Rutteman G.R., Withrow S.J., MacEwen E.G.: Tumors of the mammary gland. W: *Small Animal Clinical Oncology*. Withrow S.J., MacEwen E.G. (edit.), 3<sup>rd</sup> ed., Philadelphia 2001, s. 455-477.
- Geraldes M., Gärtner F., Schmitt F.: Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumors. *Vet. Rec.* 2000, **146**, 403-406.
- Rodo A.: *Ekspresja receptorów HER-2, kadheryny E oraz białka p53 w nowotworach gruczołu sutkowego suk*. Rozprawa na stopień doktora, SGGW, Warszawa 2007.
- Skrzypczak M.: *Angiogeneza w nowotworach gruczołu sutkowego suk*. Rozprawa na stopień doktora, SGGW, Warszawa 2004.
- Ding I., Huang K., Snyder M.L., Cook J., Zhang L., Weston N., Okunieff P.: Tumor growth and tumor radiosensitivity in mice given myeloprotective doses of fibroblast growth factors. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996, **88**, 1399-1404.
- Romanucci M., Bongiovanni L., Marruchella G., Maria M., di Guardo G., Preziosi R., Della Salda L.: Heat shock proteins expression in canine intrauterine squamous cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *Vet. Dermatol.* 2005, **16**, 108-116.
- Crofford L.J.: COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *Rheumatol.* 1997, **24**, 15-19.
- Dean A.M., Dean F.M.: Carbonations in the synthesis of prostaglandins by the cyclooxygenase of PGH synthase? A radical departure! *Protein Sci.* 1999, **8**, 1087-1098.
- Pestili de Almeida E.M., Piché C., Sirois J., Doré M.: Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J. Histochem. Cytochem.* 2001, **49**, 867-875.
- Khan K.M., Stanfield K.M., Trajkovic D., Knapp D.W.: Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet. Pathol.* 2001, **38**, 116-119.
- Khan K.N., Knapp D.W., Denicola D.B., Harris R.K.: Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 2000, **61**, 478-481.
- McEntee M.F., Cates J.M., Neilsen N.: Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. *Vet. Pathol.* 2002, **39**, 428-436.
- Tremblay C., Doré M., Bochsler P.N., Sirois J.: Induction of prostaglandin G/H synthase-2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999, **91**, 1398-1403.
- Heller D.A., Clifford C.A., Goldschmidt M.H., Holt D.E., Manfredi M.J., Soren K.U.: Assessment of cyclooxygenase-2 expression in canine hemangiosarcoma, histiocytic sarcoma, and mast cell tumor. *Vet. Pathol.* 2005, **42**, 350-353.
- Doré M., Lanthier I., Sirois J.: Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 2003, **40**, 207-212.
- Nowak M., Madej J.A., Dziegiel P.: Immunohistochemical localization of cox-2 in cells of mammary adenocarcinomas in bitches as related to tumour malignancy grade. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2005, **49**, 433-437.