

stwierdzono żadnego szczepu opornego na ampicylinę i wankomycynę.

Informacje dotyczące oporności przeciwdrobnoustrojowej enterokoków wyizolowanych od bydła w przypadku izolatów *E. faecium* nadeszły tylko z 3 krajów UE (Austria, Estonia i Holandia) oraz Szwajcarii (zbadano łącznie 231 szczepów), natomiast *E. faecalis* badano tylko w Austrii, Holandii i Szwajcarii (razem 264 izolaty). Największy odsetek szczepów opornych dotyczył tetracyklin (średnio odpowiednio 21 i 26% w odniesieniu do *E. faecium* i *E. faecalis*) oraz erytromycyny (odpowiednio 20 i 13% badanych izolatów). Z drugiej strony, w przypadku obu gatunków badanych drobnoustrojów nie stwierdzono żadnego izolatu opornego na ampicylinę i wankomycynę.

Jak wspomniano, nieliczne informacje dotyczące oporności enterokoków izolowanych z żywności pochodziły jedynie z Danii i ze Szwecji. Wynika z nich, że w tych krajach zbadano odpowiednio 145 i 17 izolatów *E. faecium* oraz 59 i 81 szczepów *E. faecalis* wyosobnionych z mięsa drobiowego. Szczepy *E. faecium* były oporne na tetracykliny (10% izolatów tylko w Danii), natomiast *E. faecalis* wykazywał wysoki stopień oporności na tę grupę antybiotyków w obu krajach

(odpowiednio 46 i 41%). W przypadku pierwszego gatunku obserwowano duży odsetek izolatów opornych na erytromycynę w Danii (21% szczepów), natomiast niski w Szwecji (tylko 6% badanych izolatów). W odniesieniu do *E. faecalis* w obu krajach poziom oporności na erytromycynę był zbliżony (odpowiednio 17 i 23%). W obu krajach i w przypadku obu gatunków enterokoków tylko niewielka grupa izolatów (lub żaden z nich) była oporna na ampicylinę i wankomycynę.

W Danii zbadano również 29 szczepów *E. faecium* i 84 izolaty *E. faecalis* pochodzące z mięsa wieprzowego i stwierdzono, że niektóre z nich były oporne na tetracykliny (odpowiednio 17 i 13% szczepów). W przypadku *E. faecium* duży odsetek (31%) wykazywał oporność na erytromycynę, natomiast w grupie *E. faecalis* stwierdzono tylko 1% takich izolatów. Nie stwierdzono żadnego szczepu opornego na ampicylinę lub wankomycynę.

W tym samym kraju oznaczano też antybiotykooporność 20 szczepów *E. faecium* i 27 *E. faecalis*, obserwując stosunkowo wysoki odsetek (22%) izolatów opornych na tetracykliny w przypadku drugiego z tych gatunków drobnoustrojów. Pojedyncze izolaty wykazywały też oporność na erytromycynę i streptomycynę, natomiast

wszystkie były wrażliwe na ampicylinę i wankomycynę.

## Piśmiennictwo

1. <http://www.efsa.europa.eu>
2. Dyrektywa 2003/99/EC Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 17 listopada 2003 r. w sprawie monitorowania chorób odzwierzęcych i odzwierzęcych czynników chorobotwórczych, zmieniająca decyzję Rady 90/424/EWG i uchylająca dyrektywę Rady 92/117/EWG. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej 2003, L 325, 31-40.
3. Decyzja Komisji 2007/407/WE z dnia 12 czerwca 2007 r. w sprawie zharmonizowanego monitorowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe w przypadku *Salmonella* u drobiu i świń. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej 2007, L 153, 26-29.
4. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Definitions, <http://www.srga.org/Eucastwt/eucastdefinitions.htm>.
5. Aarestrup F.M.: Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: Principles and limitations. *J. Vet. Med. B* 2004, 51, 380-388.
6. Aarestrup F.M., Wegener H.C., Collignon P.: Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2008, 6, 733-50.
7. Kahlmeter G., Brown D.F., Goldstein F.W., MacGowan A.P., Mouton R.W., Osterlund A., Rodloff A., Steinbakk M., Urbaskova P., Vatopoulos A.: European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003, 52, 145-148.

Dr Kinga Wieczorek, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: kinga.wieczorek@piwet.pulawy.pl

## Zastosowanie immunocytochemii w onkologii weterynaryjnej

Rafał Sapieryński, Rafał Przeździecki

z Zakładu Patomorfologii Zwierząt Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Bezsporną kwestią zarówno dla lekarzy weterynarii klinicystów, jak i zajmujących się naukowymi aspektami onkologii weterynaryjnej jest fakt, że choroba nowotworowa u małych zwierząt to jedna z częstszych przyczyn wizyt w placówkach zajmujących się leczeniem psów i kotów. Lepsza opieka właścicieli, dostępność komercyjnych karm idealnie dopasowanych do potrzeb różnych grup zwierząt, a także fachowa i ogólnodostępna pomoc lekarsko-weterynaryjna sprawia, że małe zwierzęta towarzyszące człowiekowi częściej dożywają sędziwego wieku.

Biopsja cienkoigłowa aspiracyjna i nieaspiracyjna jest tania, szybka i wiarygodną techniką rozpoznawania nowotworów u zwierząt towarzyszących, w wielu przypadkach dającą możliwości ustalenia

precyzyjnego rozpoznania. Do nowotworów, w których ta metoda diagnostyczna jest szczególnie przydatna należą guzy skóry, zmiany zlokalizowane w obrębie jamy ustnej, jamy nosowej, mięsaki okrągłokomórkowe bez względu na lokalizację, a w szczególności chłoniaki (1, 2). W jednym z badań wykazano bardzo wysoką wartość biopsji cienkoigłowej w rozpoznawaniu guzkowatych zmian skóry i tkanki podskórnej; zgodność między wynikami badania cytologicznego i histopatologicznego w przypadku zmian wyniosła 90,9% (3). Niekiedy jednak, zwłaszcza w przypadkach zmian niskozróżnicowanych, zastosowanie podstawowych barwień cytochemicznych jest niewystarczające do postawienia rozpoznania. Wydaje się, że w takich przypadkach zastosowanie

technik immunocytochemicznych byłoby szczególnie przydatne.

W przypadku cytologicznej oceny niektórych tkanek rutynowe badanie cytopatologiczne może nie być satysfakcjonujące i niezbędne jest wprowadzanie nowych technik barwienia, które pozwalają ustalić lub sprecyzować wstępne rozpoznanie. Przykładowo, badanie cytopatologiczne biopłatów, pobranych pod kontrolą ultrasonografii, ze zmian ogniskowych obejmujących śledzionę psów i kotów pozwala na ustalenie rozpoznania cytopatologicznego w 61,3% przypadków, co może wydawać się wynikiem niezadowalającym (4).

Immunohistochemia (IHCH) jest techniką barwień o szerokim zastosowaniu w rozpoznawaniu chorób zwierząt i ludzi, o szczególnym znaczeniu w onkologii klinicznej. Podstawą tej metody jest reakcja wykrycia obecnego w tkance lub komórce antygenu dzięki zastosowaniu odpowiednio dobranych przeciwciał. W pierwszej kolejności stosowane specyficzne przeciwciała mono- lub poliklonalne wiążą się swoiście z antygenami obecnymi w badanym materiale (receptory, hormony, składniki struktury komórki itp.), a następnie te związane przeciwciała są traktowane przeciwciałami wtórnymi, oznakowanymi w taki sposób,

żeby uwidocznili miejsce reakcji antygen – przeciwciała (Ag-Ab). Najczęściej przeciwciała wtórne są oznaczone za pomocą enzymów lub fluorochromów. W tym pierwszym przypadku dodanie do układu substratu dla enzymu powoduje zaistnienie reakcji, w efekcie której w miejscu kontaktu przeciwciała z poszukiwanym antygenem pojawia się barwny produkt możliwy do zaobserwowania w mikroskopie świetlnym.

Barwienia immunohistochemiczne pozwalają zidentyfikować różne białka zlokalizowane w obrębie komórek zdrowych i chorobowo zmienionych. W ten sposób można też potwierdzić występowanie patogenów, których obecność jest brana pod uwagę. Zaletą barwienia immunocytochemicznego jest to, że, oprócz stwierdzenia braku lub obecności poszukiwanego antygeny, daje ona możliwość oceny nasilenia reakcji (ekspresja słaba do silnej), a tym samym ilości badanego antygeny, jej lokalizacji w obrębie badanej tkanki czy komórki (ryc. 1). Barwienia immunohistochemiczne w rozpoznawaniu nowotworów zwierząt wykorzystuje się najczęściej celem określenia pochodzenia guza – histogenezy. Zastosowanie odpowiednich przeciwciał przeciwko filamentom pośrednim umożliwia zakwalifikowanie danego rozrostu do odpowiedniej grupy histogenetycznej, np. komórki nabłonkowe wykazują ekspresję cytokeratyny, komórki mezenchymalne charakteryzują się pozytywną reakcją na wimentynę, komórki mięśniowe wykazują ekspresję desminy, miocyty gładkie także aktyny mięśni gładkich (smooth muscle action – SMA), a komórki glejaków – kwaśne białko glju itp.

### Badanie immunocytochemiczne

Zasada badania immunocytochemicznego (ICCH) jest identyczna, jak badania

immunohistochemicznego, przy czym barwienie prowadzi się nie na skrawkach tkanek, ale na rozmazach komórek pobranych w toku różnych procedur, np. biopsji cienkoigłowej, aspiracji płynu. Preparaty cytologiczne utrwalą się przez 5–10 minut w zimnym acetonie (4°C) i poddaje procedurze barwienia lub przechowuje w zamrażarce (temp. –25°C). Zaletą badania jest mała inwazyjność procedury pobierania materiału oraz fakt, że wynik barwienia może być uzyskany już po kilku godzinach. Barwieniu można też poddać preparaty wcześniej zabarwione, co jest niezwykle istotne w sytuacji, gdy dysponujemy małą liczbą rozmazów, a obraz mikroskopowy nie daje jednoznacznej odpowiedzi odnośnie do charakteru rozrostu. Autorzy z powodzeniem wykorzystywali rozmazy osadu komórkowego z jam ciała barwione wcześniej za pomocą barwnika Giemsy do oceny ekspresji w komórkach desminy i cytokeratyny (ryc. 2). Oceniano także możliwość wykrywania ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych w rozmazach pobranych z guzów gruczołu sutkowego, które były wcześniej zabarwione metodą Papanicolaou. Wyniki tych barwień porównano z barwieniem immunohistochemicznym guzów usuniętych chirurgicznie, jednak stwierdzono stosunkowo niską zgodność między barwieniem ICCH i IHCH, która wynosiła 50% dla receptorów estrogenowych i jedynie 29% dla receptorów progesteronowych (5).

### Zastosowanie immunocytochemii w onkologii weterynaryjnej

#### Ocena pochodzenia komórek

Najpowszechniejszym zastosowaniem immunocytochemii w onkologii weterynaryjnej jest określenie histogenetycznego pochodzenia komórek w badanych

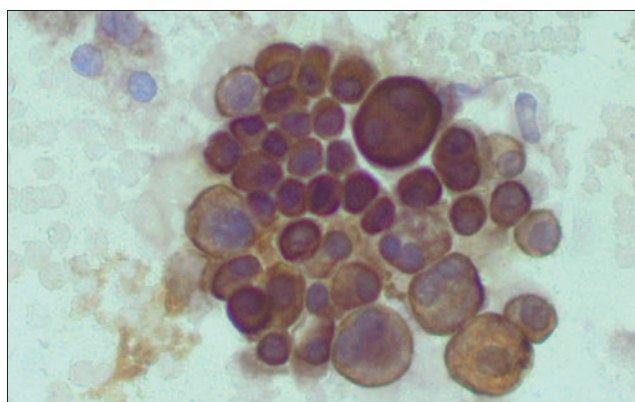
### Application of immunocytochemistry in veterinary oncology

Sapierzyński R., Przeździecki R., Division of Animal Pathomorphology, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

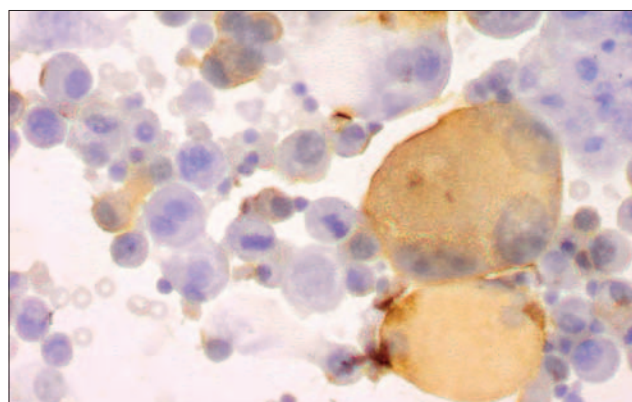
The purpose of this paper was to describe the use of immunocytochemistry in veterinary oncology. Cytopathology is important and useful method of pre-surgical examination of the mass considered as neoplastic. It is simple, cheap, of low invasiveness and results are obtained quickly, however not in all cases are unequivocal. Immunocytochemistry seems to be method of choice in confirmation of presumable diagnosis of routine cytopathological examination in veterinary oncology. Application of specific antibodies that recognize expression of epithelial (cytokeratin) or mesenchymal (vimentin) cells' markers allow to diagnosis of epithelial or mesenchymal tumors to be established. Additionally, other clinically important information can be obtained, for example estrogen receptors status, surviving and P-glycoprotein expression within neoplastic cells and also immunophenotyping of canine lymphomas can be easily established by immunocytochemistry.

**Keywords:** cytopathology, immunocytochemistry, oncology.

rozmazach. W obrazie cytologicznym wiele komórek wykazuje bardzo podobną morfologię, nawet wtedy, gdy ich histologiczne pochodzenie jest odmienne. Szczególnie odnosi się to do komórek nowotworowych, których w wyniku zmian genetycznych morfologia jest dodatkowo mniej typowa dla miejsca pochodzenia. W takiej sytuacji zastosowanie przeciwciał wykrywających filamenty pośrednie charakteryzujące poszczególne typy

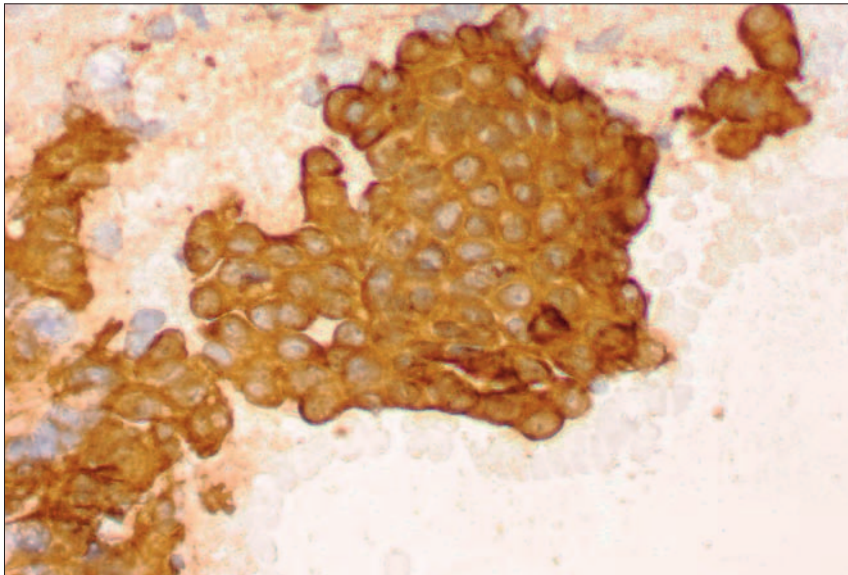


**Ryc. 1.** Różne nasilenie brązowej barwy w komórkach gruczolakoraka wskazuje na różną ekspresję cytokeratyny w komórkach nowotworu. Barwienie immunocytochemiczne z zastosowaniem przeciwciał przeciwko cytokeratynie; powiększenie 400 ×



**Ryc. 2.** Obraz cytopatologiczny gruczolakoraka gruczołu sutkowego z rozsiewem do jamy klatki piersiowej u psa – rozpoznanie postawiono na podstawie barwienia rutynowego preparatów barwionych barwnikiem Giemsy. Preparaty zostały odbarwione metanolem i zabarwione immunocytochemiczne z zastosowaniem przeciwciał przeciwko cytokeratynie; brązowa barwa świadczy o ekspresji tych filamentów pośrednich, a tym samym potwierdza nabłonkowe pochodzenie guza; powiększenie 400 ×





**Ryc. 3.** Obraz cytopatologiczny gruczolakoraka gruczołu sutkowego z rozsiewem do jamy klatki piersiowej u psa – widać silną ekspresję cytokeratyny (barwa brązowa). Barwienie immunocytochemiczne z zastosowaniem przeciwciał przeciwko cytokeratynie; powiększenie 400 ×

komórek daje jednoznaczną odpowiedź, czy komórka wywodzi się z nabłonka, mezenchymy lub tkanki barwnikotwórczej lub też gdy wykazuje cechy złośliwości cytologicznej, czy jest komórką raka (**ryc. 3**), mięsaka lub czerniaka.

Barwienie immunocytochemiczne było z powodzeniem stosowane w rozpoznawaniu **czerniaków** u psów (6). W badaniach oceniano możliwość użycia przeciwciała przeciwko antygenowi Melan-A do wykrywania guzów pozbawionych melaniny (czerniaków amelanotycznych), czyli tych, które sprawiają największe trudności diagnostyczne (**ryc. 4 i 5**). W dodatku komórki czerniaka mogą przybierać wygląd komórek mezenchymalnych (mięsakowych) lub nabłonkowych (rakowych), co może utrudniać różnicowanie tych nowotworów. Jak wykazały przeprowadzone badania, barwienia immunohistochemiczne z zastosowaniem przeciwciał anti-Melan-A cechuje

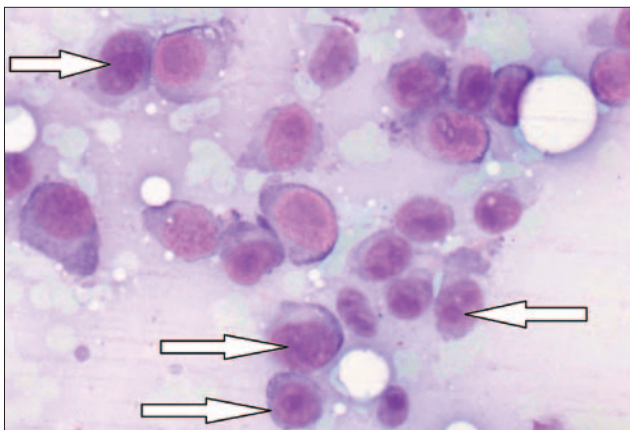
się wysoką specyficznością w stosunku do komórek pochodzenia melanocytarnego, w tym komórek czerniaka (6).

Rozrosty **komórek międzybłonka** (mezotelium wyściełające błony surowicze) mogą stanowić wyzwanie diagnostyczne z dwóch powodów. Po pierwsze trudne może być odróżnienie niezłośliwych (odczynowych) rozrostów tych komórek i nowotworów (międzybłoniaków), a po drugie poważne trudności może sprawić odróżnienie rozrzedzonego międzybłoniaka od rozrzedzonego do jamy surowiczej raka, a w szczególności gruczolakoraka. W rozwiązywaniu tego pierwszego problemu pomocne może być barwienie immunocytochemiczne wykrywające ekspresję CD146 (jedna z cząstek adhezyjnych), która zwiększa się wraz ze wzrostem złośliwości niektórych nowotworów złośliwych u ludzi (czerniaków, raków prostaty czy jajnika). Wykazano, że barwienie rozmazów płynu, który gromadzi się

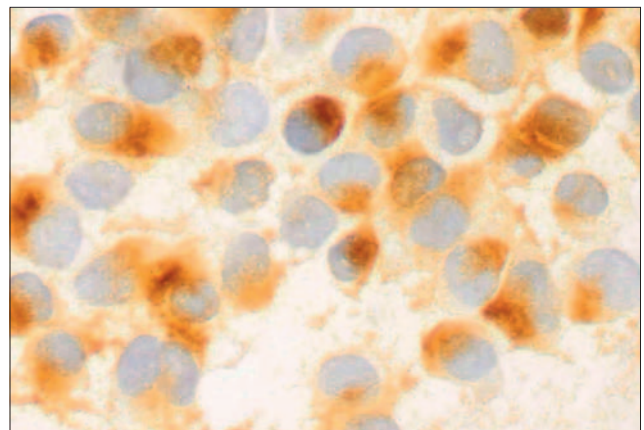
w przebiegu procesów rozrostowych międzybłonka z zastosowaniem przeciwciał anti CD146 umożliwia odróżnianie komórek złośliwej mezoteliomy od międzybłonka odczynowego (rozrostu niezłośliwego) ze 100% specyficznością (7). Pomocne w odróżnianiu rozsianych do jam ciała gruczolakoraków od odczynowego międzybłonka i międzybłoniaków jest ICCH z zastosowaniem przeciwciał przeciwko filamentom pośrednim cytokeratyny i wimentyny. Komórki guzów nabłonkowych (w tym raków i gruczolaków) niezmiennie wykazują reakcje z cytokeratyną i nie powinny jej wykazywać w stosunku do wimentyny. Z kolei komórki międzybłonka aktywowanego oraz komórki międzybłoniaków wykazują ekspresję zarówno cytokeratyny, jak i wimentyny. Spośród innych przeciwciał, które stosowano w celu identyfikacji komórek międzybłoniaka należy wymienić też: kalretyninę, antygen rakowo-zarodkowy, tromboomodulinę i białko guza Wilmsa (Wilms tumor protein-1; 7, 8, 9, 10, 11).

W przypadku **naczyniaków krwionośnych mięsakowych** pomocne może być barwienie z zastosowaniem przeciwciał przeciwko czynnikowi VIII (czynnik von Willebrandta), który jest markerem komórek śródbłonka naczyniowego. W bioptatach cienkoigłowych komórki naczyńniakomięsaka wykazują często morfologię atypowych komórek mezenchymalnych (komórek mięsaka), a ponadto mogą być bardzo nieliczne, co czyni rozpoznanie cytologiczne trudnym (12). Odróżnianie HSA od mięsaków jest niezwykle istotne z punktu widzenia klinicznego, bowiem rokowanie, a także proponowane schematy postępowania są w obu przypadkach inne. Pomocne w takich przypadkach mogą być właśnie barwienia z użyciem przeciwciał przeciwko czynnikowi VIII oraz antygenom CD31 i CD34 (12, 13).

Nie do przecenienia dla lekarza planującego leczenie pacjenta z rozpoznaniem



**Ryc. 4.** Obraz cytopatologiczny niskoroznicowanego guza jamy ustnej u psa – silna atypia jądrowa, bardzo wyraźne i duże jąderka komórkowe sugerują melanocytarne pochodzenie rozrostu, chociaż brak ziaren melaniny nie pozwala na jednoznaczne rozpoznanie czerniaka. Barwienie barwnikiem Giemsa; powiększenie 400 ×



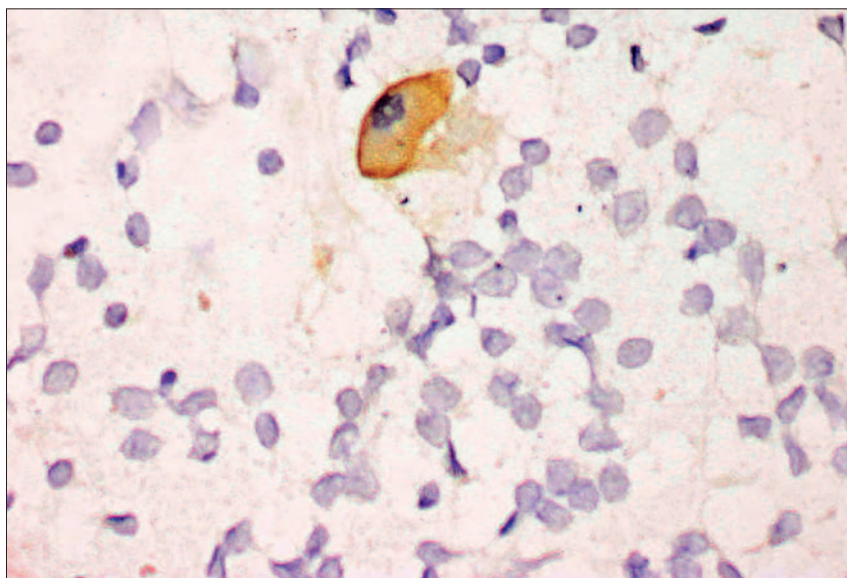
**Ryc. 5.** Ten sam przypadek, co na **ryc. 4** – barwienie immunocytochemiczne z zastosowaniem przeciwciała anti-Melan-A pozwala wykazać cytoplazmatyczną ekspresję (barwa brązowa) tego antygenu swoistego dla komórek pochodzenia melanocytarnego i tym samym potwierdza rozpoznanie czerniaka; powiększenie 400 ×



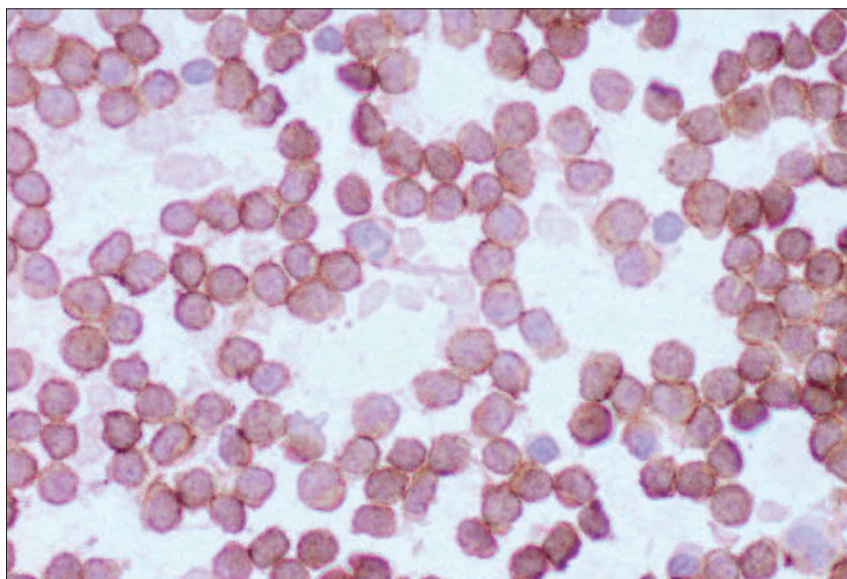
złośliwym guzem jest określenie stadium zaawansowania choroby, a w szczególności **ocena występowania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych** i narządów odległych. Badanie cytopatologiczne węzła chłonnego regionalnego w stosunku do rozpoznanego nowotworu jest podstawowym badaniem w takich przypadkach i stosunkowo często (choć nie zawsze jest to możliwe) pozwala ustalić, czy węzeł chłonny u danego pacjenta jest zajęty przez komórki nowotworowe czy nie (1). Jednak w niektórych przypadkach liczba komórek nowotworowych w obrębie zajętego węzła jest niewielka, a ich wykrycie w preparatach barwionych metodami rutynowymi bardzo trudne lub wręcz niemożliwe. Barwienie immunocytochemiczne rozmazów pobranych z węzła, co do którego istnieje prawdopodobieństwo, że jest on siedliskiem nielicznych komórek nowotworowych (niepowiększony makroskopowo węzeł w sąsiedztwie guza o wysokiej skłonności do dawania przerzutów) pozwala na wykrycie nawet pojedynczych komórek guza pośród licznych komórek utkania limfatycznego węzła (**ryc. 6**). Z doświadczeń własnych wynika, że do guzów, w których ICCH wydaje się najbardziej przydatna w kwestii wykrywania komórek nowotworowych w węzłach chłonnych są raki (ekspresja cytokeratyny) i czerniaki (ekspresja antygenu Melan-A).

### Ocena komórek tkanki hemolimfacyjnej

Określenie występowania określonych cząstek różnicowania (clusters differentiation – CD) na komórkach układu hemolimfacyjnego pozwala nie tylko na stwierdzenie, jaki typ czy podtyp komórek jest obecny w preparacie cytologicznym (immunofenotypowanie), ale także pozwala ustalić stadium zróżnicowania komórek. Jak wykazały przeprowadzone badania, istnieje ścisła korelacja pomiędzy oceną immunofenotypu komórek **chłoniaka** u psów określanego za pomocą badania immunocytochemicznego i immunohistochemicznego (2, 14, 15). Barwienia immunocytochemiczne to doskonała i czuła metoda oceny immunofenotypu komórek chłoniaka zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Dodatkowo metodę tę można stosować do odróżniania guzów pochodzenia limfocytarnego od innych guzów (szczególnie mięsaków okrągłokomórkowych – niskozróżnicowanych guzów z komórek tucznych, guzów histiocytarnych, a także niektórych czerniaków amelanotycznych i raków). Immunofenotypowania komórek chłoniaka można dokonać w oparciu o badanie immunocytochemiczne aspiratów cienkoigłowych (**ryc. 7**), jak również drogą cytometrii przepływowej. Jak wykazały badania, pierwsza metoda ma przewagę nad badaniem



**Ryc. 6.** Obraz cytopatologiczny przetrutu raka płaskonabłonkowego jamy ustnej do węzła chłonnego żuchwowego u psa. Pośród limfocytów węzła chłonnego (jasnofioletowe struktury) widoczna jedna komórka wykazująca ekspresję cytokeratyny (brązowa barwa cytoplazmy), co daje podstawę do rozpoznania zajęcia węzła chłonnego przez raka. Barwienie immunocytochemiczne z zastosowaniem przeciwciał przeciwko cytokeratynie; powiększenie 200 ×



**Ryc. 7.** Obraz cytopatologiczny chłoniaka z małych limfocytów T u psa. Ekspresja antygenu CD3 (barwa brązowa) w praktycznie wszystkich widocznych komórkach rozmazu wskazuje na immunofenotyp T rozrostu. Barwienie immunocytochemiczne z zastosowaniem przeciwciał przeciwko antygenowi CD3; powiększenie 200 ×

cytometrycznym, ponieważ pozwala dokonać analizy w oparciu o mniejszą próbkę komórek, co wydaje się szczególnie atrakcyjne, w przypadkach gdy węzły chłonne u pacjenta z chłoniakiem ulegają martwicy, co jest dość częstym zjawiskiem (16).

Podstawowe markery limfocytów B i T (odpowiednio CD 79α i CD3) pozwalają na określenie pochodzenia chłoniaka, a odpowiedni ich zestaw (dodatkowo CD8, CD4, CD21 itd.) daje możliwość ustalenia immunofenotypu komórek guza, co może być i zazwyczaj jest istotne w prognozowaniu przebiegu choroby i reakcji na leczenie (2, 16, 17 18). Barwieniu można poddać klasyczne rozmazy cytologiczne pobranego

drogą biopsji cienkoigłowej, zagęszczone wirowaniem zawiesiny komórkowej (tzw. cytospiny); preparaty można też poddać barwieniu w automatycznych aparatach do barwienia (2, 18). Powszechnie stosowaną metodą oceny immunofenotypu komórek limfocytarnych jest analiza za pomocą cytometrii przepływowej, kiedy materiał do badań można pobierać z krwi obwodowej, jak i drogą aspiracji powiększonych węzłów chłonnych (17, 19, 20). Ocena immunofenotypu w przypadku przewlekłej białaczki limfocytarnej jest istotnym czynnikiem rokowniczym i, co interesujące, przeprowadzone badania wskazały, że psy z białaczką z komórek T mają większą szansę



na długoterminowe okresy przeżycia niż pacjenci z białaczką B komórkową (21).

Do nowotworów, których rozpoznanie wymaga najczęściej zastosowania dodatkowych metod różnicowania należą **rozrosty z histiocytów i komórek histiocytopodobnych**. Zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko podjednostkom cząstek adhezyjnych typowych dla monocytów-histiocytów, np. CD11d, CD18, CD163, CD204, a także lizozymu i cząstek MHC klasy II, pozwala potwierdzić pochodzenie komórek, np. w niskozróżnicowanym mięsaku histiocytarnym czy histiocytozie odczynowej (22, 23, 24, 25). W literaturze opisano zastosowanie barwienia immunocytochemicznego cytospinów płynu mózgowo-rdzeniowego u psów z mięsakiem histiocytarnym zlokalizowanym w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (26). Według opinii autorów takie barwienie dało jedyną możliwość rozpoznania tego trudnego diagnostycznie rozrostu w trakcie badań przedoperacyjnych, mimo jego wyjątkowo „niekorzystnej” lokalizacji. Płyn mózgowo-rdzeniowy po pobraniu został poddany wirowaniu, a barwieniu poddano rozmazy z osadu komórkowego. Rozmazy zabarwiono zestawem przeciwciał monoklonalnych: CD1c, CD11b, CD11c, CD11d, CD3, CD18, CD79 alfa, wimentynie i pancytokeratynie. Komórki nowotworowe wykazywały silną ekspresję antygenu CD1c, CD11c, CD18 i wimentyny, jednocześnie nie wykazywały ekspresji markerów typowych dla limfocytów (CD3, CD79 alfa), czy komórek pochodzenia nabłonkowego (26), co dało podstawę do rozpoznania złośliwego rozrostu pochodzenia histiocytarnego (rozszianego mięsaka histiocytarnego).

Niekiedy problemem diagnostycznym może być odróżnianie **niskozróżnicowanych guzów z komórek tucznych** od mięsaków okrągłokomórkowych, rozrostów histiocytarnych, a nawet niektórych chłoniaków. W badaniach immunohistochemicznych przeprowadzonych na 48 przypadkach guzów z komórek tucznych, o różnym stopniu złośliwości rozpoznanych u psów, wykazano wysoką przydatność przeciwciał monoklonalnych (klon O10) reagujących z antygenem CD1a jako markera komórek tucznych u psów, bez względu na stopień złośliwości komórek guza (27). Autorzy używali przeciwciał swoistych dla komórek ludzkich i, co ciekawe, o ile u ludzi antygen CD1a jest markerem komórek Langerhansa w przypadku skórnej histiocytozy, o tyle u psów swoiście nie barwia komórki tuczne i jednocześnie nie reaguje z komórkami dendrytycznymi, histiocytami, komórkami plazmatycznymi, komórkami czerniaków amelanotycznych i limfocytami (27).

#### Ocena proliferacji komórek

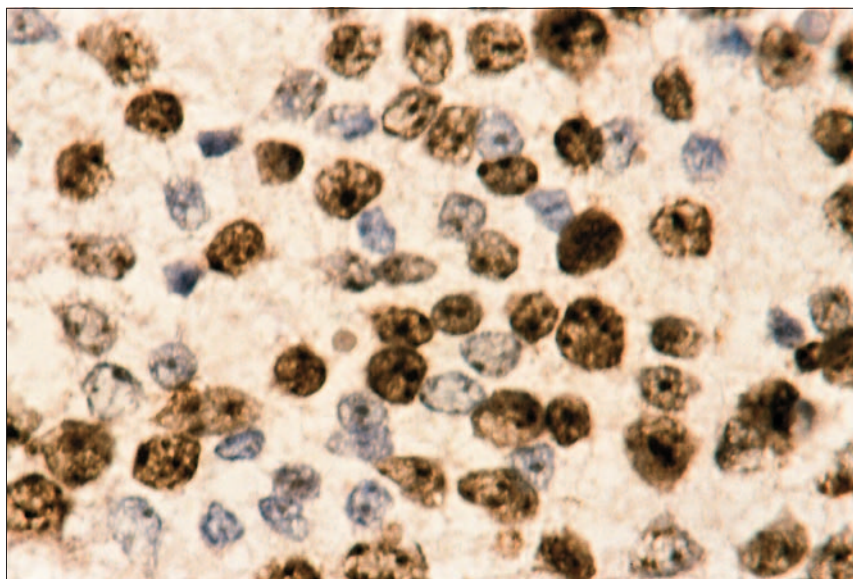
Intensywność **prolifracji komórek nowotworowych** jest w wielu przypadkach istotnym wyznacznikiem złośliwości guza, na podstawie którego można określać rokowanie. Dobrym przykładem jest tu guz z komórek tucznych, w których ocena odsetka komórek będących w cyklu podziałowym oznaczonych za pomocą przeciwciał MIB-1, wykrywających antygen Ki67 (antygen jąder komórek dzielących się; **ryc. 8**) koreluje z rokowaniem. Odsetek komórek Ki67 dodatnich oznaczony immunochemicznie w mastocytomach o różnym stopniu złośliwości

histologicznej usuniętych chirurgicznie koreluje ze stopniem złośliwości histologicznej i pozwala przewidzieć długookresowe wyniki leczenia (28). Dodatkowo, badanie wykazało, że odsetek komórek Ki67 dodatnich był znacząco wyższy u psów, które padły z powodu mastocytomy, niż u tych, u których zabieg chirurgiczny skutkowało wyleczeniem (śmierć zwierząt nie była związana z nowotworem; 28).

Ocena proliferacji komórkowej w preparatach cytologicznych, mierzona za pomocą barwienia z użyciem przeciwciała MIB-1, była także z powodzeniem stosowana do cytologicznej oceny chorób wątroby. Odsetek komórek Ki67 dodatnich w próbkach pobranych z nowotworów wątroby we wszystkich przebadanych przypadkach był większy niż 50%. W preparatach cytologicznych pobranych z wątrób objętych procesem nienowotworowym komórki zazwyczaj nie wykazywały dodatniej reakcji lub też reakcja była obecna w niewielkim odsetku komórek (29). Autorzy tego badania konkludują, że połączenie rutynowej cytologii z badaniem immunocytochemicznym biopłatów wątroby pozwala na zdecydowaną poprawę skuteczności rozpoznawania nowotworów złośliwych tego narządu, przy zminimalizowanej inwazyjności postępowania diagnostycznego (29). Podobne wnioski płyną z innych badań, w którym przedmiotem były nowotwory gruczołu sutkowego u suk, a więc guzy niezwykle rozpowszechnione u psów. Tradycyjna cytopatologiczna diagnostyka guzów sutka u zwierząt rzadko umożliwia przedoperacyjne odróżnienie zmian o charakterze niezłośliwym od gruczolakoraków i bywa wyzwaniem nawet dla doświadczonego cytopatologa. Podobnie jak w przypadku badań immunohistochemicznych ocena nasilenia proliferacji komórek w preparatach cytologicznych, określająca ekspresję antygenu Ki67, w dużym stopniu koreluje z charakterem rozrostu, a także rokowaniem (30). Przeprowadzone badania wykazały istotną statystycznie różnicę w wartości indeksów proliferacyjnych mierzonych za pomocą barwienia Ki67 pomiędzy guzami niezłośliwymi i złośliwymi. Dodatkowo wykazano też, że w przypadkach o najwyższych indeksach proliferacyjnych częściej obserwowano przerzuty, częściej śmierć zwierząt była wynikiem nowotworu, a także obserwowano krótszą długość okresu przeżycia (30).

#### Inne zastosowania immunocytochemii

Immunocytochemiczna ocena występowania **receptorów estrogenowych** w komórkach rozrostów może znaleźć



**Ryc. 8.** Obraz cytopatologiczny chłoniaka z dużych limfocytów u psa. Widoczna ekspresja antygenu Ki67 (barwa brązowa) w obrębie jąder komórkowych większości komórek wskazuje na wysoki potencjał proliferacyjny, a tym samym wysoki stopień złośliwości rozrostu. Barwienie immunocytochemiczne z zastosowaniem przeciwciała MIB-1; powiększenie 400 ×

zastosowanie w określaniu rokowania oraz potencjalnej odpowiedzi na leczenie z użyciem antyestrogenów. Liczne badania prowadzone nad guzami sutka u suk wykazały zależność między jądrową ekspresją receptorów dla estrogenów a stopniem złośliwości nowotworu (31). Ekspresja receptorów estrogenowych –  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) była istotnie niższa w guzach złośliwych w porównaniu do zmian niezłośliwych, a także w zmianach z większym nasileniem proliferacji komórek (tym samym bardziej agresywnym charakterem nowotworu; 31). Ekspresja ER- $\alpha$  była także niższa w przypadku gruczolakoraków, w przebiegu których doszło do powstania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych lub/i rozwinęły się przerzuty, w porównaniu do tych guzów złośliwych, w których zajęcia węzłów chłonnych lub/i przerzutów nie obserwowano (31). Oceny ekspresji receptorów estrogenowych, ale też i progesteronowych można próbować dokonać na podstawie barwienia immunocytochemicznego w rozmazach uprzednio zabarwionych innymi metodami, jak np. metodą Papanicolaou, czy barwnikiem Giemsa (5).

Potencjalne korzyści dla pacjentów z rozpoznaniem nowotworem, u których rozważa się chemioterapię, może przynieść immunocytochemiczna ocena występowania **glikoproteiny P (P-gp)**, która jest wiązana z występowaniem oporności wielolekowej komórek nowotworowych. P-gp jest pompą zlokalizowaną w błonie komórkowej, która odpowiada za wypompowywanie z komórki różnych ksenobiotyków, w tym leków stosowanych w chemioterapii, co skutkuje opornością. Obecność glikoproteiny P wykazano w wielu złośliwych guzach nowotworowych u psów (guzy gruczołu sutkowego, chłoniak) i kotów (w tym guzów gruczołu sutkowego, chłoniakach, guzach z komórek tucznych, rakach płaskonabłonkowych; 32, 33, 34).

Białkami, które poprzez hamowanie apoptozy odgrywa istotną rolę w procesach proliferacji i przeżycia komórek oraz często ulega ekspresji w komórkach nowotworowych jest **surwiwina**. Badania immunohistochemiczne wykazały jej stosunkowo wysoką aktywność nie tylko w prawidłowych proliferujących tkankach, ale także w rozrostach złośliwych, między innymi w chłoniakach (35). Taką ekspresję wykryto w co najmniej 5% komórek badanych chłoniaków, niezależnie od podtypu rozrostu. Co więcej, w badaniach immunocytochemicznych wykazano, że wysoka ekspresja surwiwiny w komórkach chłoniaków może być traktowana jako marker wczesnego nawrotu choroby po leczeniu chemioterapeutycznym (36).

Małoinwazyjne metody pobierania materiału, stosunkowo niski koszt i krótki

czas oczekiwania na wyniki takiego badania sprawiają, że barwienie immunocytochemiczne rozmazów cytologicznych wydaje się doskonałą alternatywą dla przedoperacyjnego badania histopatologicznego. Jak przedstawiono powyżej, ta metoda diagnostyczna nie tylko pozwala na sprecyzowanie rozpoznania, ale także może wnieść wiele potencjalnie istotnych informacji i to odnośnie do możliwości leczenia, jak i rokowania.

## Piśmiennictwo

- Sapierzynski R., Micuń J.: Lymphadenomegaly in dogs – cytological study. *Pol. J. Vet. Sc.* 2009, **12**, 263-268.
- R. Sapierzynski: Practical aspects of immunocytochemistry in canine lymphomas. *Pol. J. Vet. Sc.* 2010, **13**, 653-659.
- Ghisleni G., Roccabianca P., Ceruti R., Stefanello D., Bertazzolo W., Bonfanti U., Caniatti M.: Correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology in the evaluation of cutaneous and subcutaneous masses from dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.* 2004, **45**, 191-198.
- Ballegger E.A., Forrest L.J., Dickinson R.M., Schutten M.M., Delaney E.A., Young K.M.: Correlation of ultrasonographic appearance of lesions and cytologic and histologic diagnoses in splenic aspirates from dogs and cats: 32 cases (2002-2005). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2007, **230**, 690-696.
- Radhika K., Prayaga A.K.: Estrogen and progesterone hormone receptor status in breast carcinoma: comparison of immunocytochemistry and immunohistochemistry. *Indian. J. Cancer* 2010, **47**, 148-150.
- Hoinghaus R., Mischke R., Hewicker-Trautwein M (2002) Use of immunocytochemical techniques in canine melanoma. *J. Vet. Med. A*, **49**, 198-202.
- Sato T, Miyoshi T, Shibuya H, Fujikura J, Kole H, Miyazaki Y: Peritoneal biphasic mesothelioma in a dog. *J. Vet. Med. A* 2005, **52**, 22-25.
- Sato A., Torii I., Okamura Y., Yamamoto T., Nishigami T., Kataoka T.R., Song M., Hasegawa S., Nakano T., Kamei T. Tsujimura T.: Immunocytochemistry of CD146 is useful to discriminate between malignant pleural mesothelioma and reactive mesothelium. *Mod. Pathol.* 2010, **23**, 1458-1466.
- Reggati F, Brisson B, Ruotolo K, Southorn E, Bienzele D: Invasive epithelial mesothelioma in a dog. *Vet. Pathol.* 2005, **42**, 77-81.
- Brisson BA, Reggati F, Bienzele D: Portal site metastasis of invasive mesothelioma after diagnostic thoracoscopy in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2006, **229**, 980-983.
- Morini M, Bettini G, Morandi F, Burdizzo R, Marcato PS: Deciduioid peritoneal mesothelioma in a dog. *Vet. Pathol.* 2006, **43**, 198-201.
- Bertazzolo W., Dell'Orco M., Bonfanti U., Ghisleni G., Caniatti M., Masserdotti C., Antoniazzi E., Crippa L., Roccabianca P.: Canine angiosarcoma: cytologic, histologic, and immunohistochemical correlations. *Vet. Clin. Pathol.* 2005, **34**, 28-34.
- Boucher L.D., Swanson P.E., Stanley M.W., Silverman J.F., Raab S.S., Geisinger K.R.: Cytology of angiosarcoma. Findings in fourteen fine-needle aspiration biopsy specimens and one pleural fluid specimen. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000, **114**, 210-219.
- Fisher D.J., Naydan D., Wemer L.L., Moore P.F.: Immunophenotyping lymphomas in dogs: a comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy samples. *Vet. Clin. Pathol.* 1995, **24**, 118-123.
- Vail D.M., Kravis L.D., Kisseberth W.C., Ogilvie G.K., Volk L.K.: Application of rapid CD3 immunophenotype analysis and argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) frequency to fine needle aspirate specimens from dogs with lymphoma. *Vet. Clin. Pathol.* 1997, **26**, 66-69.
- Simsir A., Fetsch P., Stetler-Stevens M., Abati A.: Immunophenotypic analysis of non-Hodgkin's lymphomas in cytologic specimens: a correlative study of immunocytochemical and flow cytometric techniques. *Diagn. Cytopathol.* 1999, **20**, 278-284.
- Gibson D., Aubert L., Woods J.P., Abrams-Ogg A., Kryth S., Wood R.D., Bienzele D.: Flow cytometric immunophenotype of canine lymph node aspirates. *J. Vet. Intern. Med.* 2004, **18**, 710-717.
- Aulbach A.D., Swenson C.L., Kiupel M.: Optimized processing of fine-needle lymph node biopsies for automated immunostaining. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2010, **22**, 383-388.

- Comazzi S., Gelain M.E.: Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *Vet. J.* 2011, **188**, 149-155.
- Laane E., Bjorklund E., Elbemberg G., Evaraus H., Skoog L., Porwit-MacDonald A.: Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma. *Cytometry Clin Cytom.* 2005, **64**, 34-42.
- Comazzi S., Gelain M.E., Martini V., Riondato F., Miniscalco B., Marconato L., Stefanello D., Mortarino M.: Immunophenotype predicts survival time in dogs with chronic lymphocytic leukemia. *J. Vet. Intern. Med.* 2011, **25**, 100-106.
- Thio T., Hilbe M., Grest P, Pospisil A.: Malignant histiocytosis of the brain in three dogs. *J. Comp. Pathol.* 2006, **134**, 241-244.
- Soare T., Noble P.J., Hetzel U., Fonara S., Kipar A.: Paraneoplastic syndrome in hemaphagocytic histiocytic sarcoma in a dog. *J. Comp. Pathol.* 2011, **146**, 168-174.
- Ide T., Uchida K., Kagawa Y., Suzuki K., Nakayama H.: Pathological and immunohistochemical features of subdural histiocytic sarcomas in 15 dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011, **23**, 127-132.
- Comegliani L., Gracis M., Ferro S., Vercelli A., Roccabianca P.: Sublingual reactive histiocytosis in a dog. *J. Vet. Dent.* 2011, **28**, 164-170.
- Tzipory L., Vernau K.M., Sturges B.K., Zabka T.S., Highland M.A., Petersen S.A., Wisner E.R., Moore P.F., Vernau W.: Antemortem diagnosis of localized central nervous system histiocytic sarcoma in 2 dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2009, **23**, 369-374.
- Yhee J.Y., Hong S.W., Doster A.R., Blas-Machado U., Lyoo Y.S., Sur H.H.: Immunohistochemical application of an antibody specific for human CD1a to the diagnosis of canine mast cell tumour. *J. Comp. Pathol.* 2008, **139**, 40-46.
- Abadie J.J., Amardeilh M.A., Delverdiere M.E.: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1999, **215**, 1629-1634.
- Neumann S., Kaup F.J.: Usefulness of Ki-67 proliferation marker in the cytologic identification of liver tumors in dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 2005, **34**, 132-136.
- Zuccari D.A., Santana A.E., Cury P.M., Cordeiro J.A.: Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet. Clin. Pathol.* 2004, **33**, 23-28.
- Nieto A., Pena L., Perez-Alenza M.D., Sanchez M.A., Flores J.M., Castano M.: Immunohistological detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet. Pathol.* 2000, **37**, 239-247.
- Lee J.J., Hughes C.S., Fine R.L., Page R.L.: P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer* 1996, **77**, 1892-1898.
- Petterino C., Rossetti E., Bertonecchio D., Martini M., Zappulli V., Baggelloni L., Castagnaro M.: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (clone c494) in canine mammary gland tumours. *J. Vet. Med. A* 2006, **53**, 174-178.
- Van der Hayden S., Chiers K., Vercauteren G., Daminet S., Wegge B., Paeppe D., Ducatelle R.: Expression of multidrug resistance-associated P-glycoprotein in feline tumours. *J. Comp. Pathol.* 2011, **144**, 164-169.
- Wimmershoff J., Palkinghome A., Grest P., Schade B., Marschal T., Keller S.M., Gussetti F.: Immunohistochemical detection of survivin in canine lymphoma. *J. Comp. Pathol.* 2010, **142**, 311-322.
- Rebhun R.B., Lana S.E., Ehrhart E.J., Charles J.B., Thamm D.H.: Comparative analysis of surviving expression in untreated and relapsed canine lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 2008, **22**, 989-995.

Dr hab. Rafał Sapierzynski,  
e-mail: rafal\_sapierzynski@sggw.pl