

Apoptoza hepatocytów szczura – ocena histologiczna, ultrastrukturalna i immunohistochemiczna

ZBIGNIEW BORATYŃSKI, STANISŁAW FLIEGER,
AGNIESZKA PEDRYCZ*, MARCIN WIECZORSKI*

Zakład Anatomii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

*Katedra i Zakład Histologii i Embriologii AM, ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin

Boratyński Z., Flieger S., Pedrycz A., Wieczorski M.

Apoptosis in rat hepatocytes – histological, ultrastructural and immunohistochemical assessment

Summary

Programmed cell death used in multicellular organisms in order to naturally select cells in their body is today a widely investigated phenomenon. Precise knowledge about this phenomenon could be used in medicine to cause the death of unnecessary, ill cells (for example neoplastic cells) or to inhibit excessive cell death. Thus, all studies in this area which could shed more light on apoptosis are important.

The present study investigated the phenomenon of cellular death induced by Adriamycin – an antineoplastic antibiotic, using histological, ultrastructural and immunohistochemical methods. The investigation was performed on rat livers 7 weeks following intraperitoneal administration of the drug at a dose of 5 mg/kg of body weight.

Apoptosis and its localisation in liver lobule were evident in immunohistochemistry by the expression of proapoptotic protein BAX. Histological and ultrastructural investigations showed: lysis of cells, blurring of cellular organelles, orthodoxic state of mitochondria or their destruction, and fragmentation of rough endoplasmic reticulum, picnotic nuclei proved apoptosis after Adriamycin.

Keywords: apoptosis, Adriamycin, BAX

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki jest wynikiem szczególnie regulowanych procesów biochemicznych. Jest to zjawisko używane przez organizmy wielokomórkowe dla naturalnej selekcji komórek. Przyjęło się używać pojęcia „programowana śmierć komórki” w odniesieniu do fizjologicznej śmierci komórek podczas rozwoju, natomiast terminu apoptoza do śmierci komórek pod wpływem czynników zewnętrznych.

Już w połowie XIX wieku zauważono, że śmierć komórki gra istotną rolę w procesach fizjologicznych dotyczących organizmów wielokomórkowych, szczególnie podczas embriogenezy (10). W 1964 r. został wprowadzony termin „programowana śmierć komórki”. Zauważono wówczas, że w toku rozwoju programowana śmierć komórki nie jest zjawiskiem incydentalnym, ale zamierzonym, kontrolowanym, przebiegającym w kilku etapach (9). Po raz pierwszy terminu apoptoza użyli m.in. Kerr i wsp. w 1972 r., określając apoptozę jako podstawowe biologiczne zjawisko znacząco wpływające na kinetykę tkanek (8).

Dzisiaj wiadomo, że apoptozą (grec. *apoptosis* – opadanie liści, wędnięcie) oraz programowaną śmiercią komórki rządzą podobne mechanizmy. Obydwa zja-

wiska zachodzą poprzez uczynnianie genów, których produkty zabijają komórki. Programowana śmierć komórki ma miejsce wyłącznie wtedy, gdy komórki organizmów są zbędne, uszkodzone lub nie otrzymują bodźców z zewnątrz (15).

Zarówno programowana, jak i indukowana czynnikami zewnętrznymi śmierć komórki trwa kilka godzin. W czasie tym dochodzi do kondensacji jądra i cytoplazmy, a obumierająca komórka jest defragmentowana. Zostają utworzone otoczone błoną ciała apoptotyczne, które następnie są fagocytowane przez makrofagi bez wzbudzenia reakcji zapalnej. W ten sposób zostają szybko usunięte obumarłe komórki bez narażania tkanek na działanie toksycznych substancji z nich uwalnianych. Śmierć komórki w wym. mechanizmie dotyczy najczęściej pojedynczych komórek, w przeciwieństwie do śmierci wywołanej czynnikami toksycznymi lub chorobotwórczymi, w czasie której ginie wiele komórek jednocześnie (martwica).

Apoptoza jest obecnie procesem stale badanym i uzupełnianym o nowe odkrycia. Istotne wydaje się poznanie w pełni mechanizmów rządzących tym zjawiskiem, by móc je wykorzystać w medycynie w wymiarze ratującym życie.

Do tej pory udało się wykorzystać zjawisko apoptozy, stymulując ją zewnątrzpochoodnymi środkami chemicznymi. Należą do nich chemioterapeutyki przeciwnowotworowe. Podejmowane są również próby wywołania apoptozy jedynie w tkankach docelowych. Niestety, apoptoza wywołana w ten sposób nie do końca jeszcze jest selektywna. W pierwszym rzędzie dotyczy komórek rozmnażających się (proliferyjących), młodych (płody – embriogeneza, komórki prekursorowe krwi itp.) niszczone są również komórki zdrowe, często niezbędne, a dopiero później komórki nowotworowe.

Jednym z chemioterapeutyków przeciwnowotworowych, wywołujących apoptozę jest adriamycyna (ADR). Wykorzystano ją w niniejszym doświadczeniu do wywołania apoptozy w wątrobie szczura. Wielokierunkowa obserwacja (histologiczna, histochemiczna, immunohistochemiczna, ultrastrukturalna) śmierci hepatocytów pod wpływem adriamycyny pomoże przybliżyć to zjawisko.

Adriamycyna, antybiotyk antacyklinowy o działaniu przeciwnowotworowym wiąże DNA i hamuje syntezę kwasów nukleinowych (11, 14). Ma zdolność interkalacji, czyli wtłaczania się między dwie pary sąsiadujących ze sobą zasad DNA (w płaszczyźnie prostopadłej do osi). Powoduje to wydłużenie podwójnej spirali DNA lub jej pęknięcie, zmianę właściwości biochemicznych, zahamowanie zdolności do replikacji i transkrypcji (3, 4, 12).

Innym cytotoksycznym mechanizmem działania adriamycyny jest jej wpływ na topoizomerazę II (gyrazę DNA), której aktywność ulega podwyższeniu w komórkach proliferujących. Zaburza to procesy replikacji i transkrypcji i w efekcie syntezę białek (3, 4). Ponadto uszkodzone zostają mechanizmy naprawy. Antracykliny wpływają na każdą fazę rozwoju komórki, jednak najskuteczniej działają w fazie S. Adriamycyna hamuje również aktywność enzymów decydujących o bioenergetyce komórki, tj. enzymów łańcucha oddechowego (dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy NADH) (12). W procesach transformacji adriamycyny powstają wolne rodniki, które są odpowiedzialne za cytotoksyczne, a głównie kardiotoksyczne działanie tego leku (16). Adriamycyna metabolizowana jest w mikrosomach, przy udziale NADPH reduktazy cytochromu P-450. W wyniku reakcji chemicznych katalizowanych przez ten układ enzymatyczny powstaje semichinon, który jest formą wolnego rodnika (redukcja ugrupowań chinonowych do hydrochinonowych w pierścieniu C). Antracykliny hamują również system enzymatyczny usuwający wolne rodniki, co dodatkowo nasila uszkodzenie komórki (13).

Celem badań jest histologiczna, ultrastrukturalna i immunohistochemiczna ocena apoptozy hepatocytów wątroby szczurów, które zostały poddane działaniu adriamycyny.

Material i metody

Doświadczenie przeprowadzono na białych szczurach, samicach szczepu Wistar, o początkowej masie ciała 200-250 g, w wieku od 2,5 do 3 miesięcy. Zwierzęta dobierano losowo. Szczury podzielono na 2 grupy – doświadczalną i kontrolną po 8 samic w każdej. Samicom z grupy doświadczalnej podano dootrzewnowo 5 mg/kg m.c. adriamycyny (Adriablastin SR – Farmitalia), a samicom z grupy kontrolnej podano tą samą drogą 0,5 ml 0,9% NaCl. Samice dekapitowano po 7 tygodniach, a do oceny histologicznej pobierano wycinki wątroby.

Na przeprowadzenie doświadczeń z wykorzystaniem zwierząt otrzymano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej przy Akademii Medycznej w Lublinie nr 32/2000.

Pobrane do badań histologicznych wycinki wątroby utrwalano w 10% formalinie zbuforowanej do pH 7,4 (buforem fosforanowym) i po odwodnieniu we wzrastających stężeniach etanolu prześwietlano w ksylenie oraz zatapiało w parafinie. Krojono skrawki grubości 5 µm, które barwiono hematoksyliną i eozyną. Zabarwione preparaty oglądano pod mikroskopem świetlnym.

Pobrane do badań ultrastrukturalnych wycinki wątroby utrwalono w utrwalaczu o składzie: 2% paraformaldehyd, 2,5% glutaraldehyd w 0,1 M buforze fosforanowym Sorensena. Następnie działano czterotlenkiem osmu, dobarwiano w octanie uranylu, odwadniano we wzrastających stężeniach etanolu i zatapiało w żywicy Aralchit ACM Fliska. Skrawki krojono na preparaty półcienkie o grubości 0,5-0,7 µm oraz ultracienkie o grubości 60 nm przy pomocy ultramikrotomu Reichert Ultracut S.

Preparaty półcienkie barwiono 1% błękitem metylenowym z Azurem II w 1% wodnym roztworze czteroboranu sodu. Dokumentacji preparatów spod mikroskopu świetlnego dokonano przy pomocy mikroskopu optycznego Jenaval Contrast.

Skrawki ultracienkie barwiono 8% roztworem octanu uranylu w 0,5% kwasie octowym i cytrynianem ołowiu wg Raynoldsa. Dokumentacji dokonano za pomocą mikroskopu Tesla BS-500.

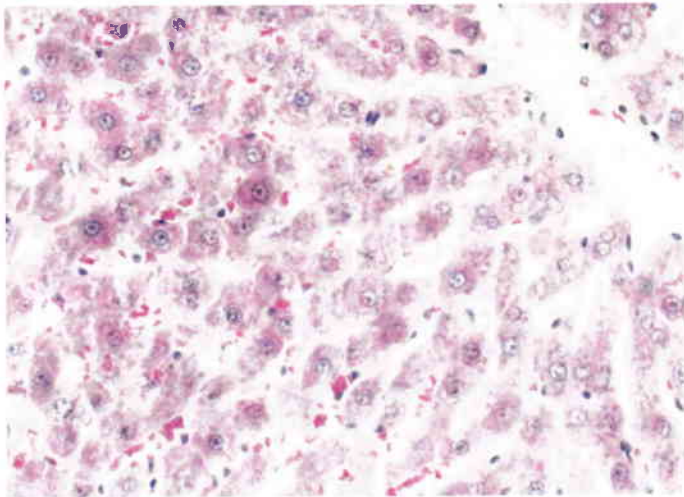
Wycinki pobrane do badań immunohistochemicznych zostały utrwalone w 10% formalinie, a po odwodnieniu oraz umieszczeniu w parafinie krojono na preparaty o grubości 7 µm. Białko BAX identyfikowano w preparatach z grupy kontrolnej i doświadczalnej. Dla każdego preparatu utworzono również negatywną kontrolę (preparat bez przeciwciała pierwotnego).

Do określenia ekspresji białka użyto standardowej trzy-stopniowej procedury immunohistochemicznej. Króliczego anty-BAX użyto jako pierwotnego przeciwciała. Następnie dodano biotynylowane wtórne przeciwciała, a później streptawidynę sprzęgniętą z peroksydazą chrzanową. Ponieważ streptawidyna ma duże powinowactwo do biotyny, wiąże się z nią w miejscach, gdzie przeciwciała pierwotne związało się z antygenem tkankowym, a po dodaniu chromotogenu (DAB lub AED) w tym miejscu powstaje czerwone zabarwienie na skutek jego reakcji z peroksydazą. Wyniki badań przedstawiono w formie opisowej.

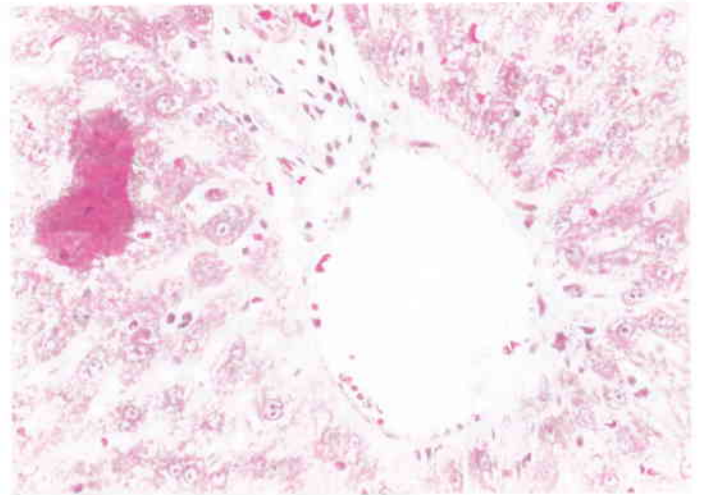
Wyniki i omówienie

W preparatach histologicznych samic szczura pochodzących z grupy doświadczalnej, oglądanych pod mikroskopem świetlnym, obserwowano wyraźne zatarcie konturów komórek mięszowych oraz ogniskową dezintegrację architektoniki dotyczącą kształtu i wielkości hepatocytów. W cytoplazmie hepatocytów występowały jądra o różnej wielkości, co było bardziej zaznaczone niż w grupie kontrolnej. Chromatyna jądrowa wykazywała cechy rozproszenia. Często stwierdzano zwiększoną liczbę jąderek. Cytoplazma hepatocytów w preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną była jaśniejsza w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 1). Obserwowano brak ziarnistości cytoplazmatycznych lub drobnoziarnistą oraz bardziej kwasochłoną cytoplazmę (ryc. 2). Było to także widoczne w barwieniach błękitem metylenowym i Azurem II (ryc. 3, 4). Bełeczki wątrobowe często ulegały defragmentacji. Widoczne były również „nagie jądra” świadczące o rozpadzie komórek.

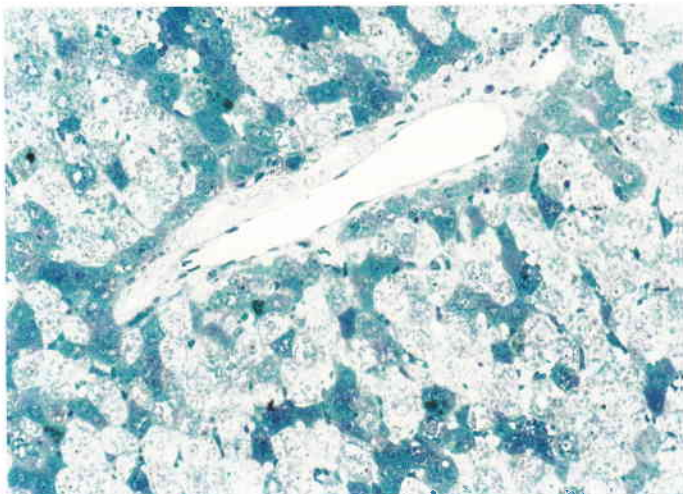
W komórkach mięszu wątroby u zwierząt poddanych działaniom adriamycyny, zaobserwowano pod mikroskopem elektronowym cechy dużego uszkodzenia. W niektórych spośród nich stwierdzono „wypłukaną” cytoplazmę, bez organelli – komórki „puste w środku” (ryc. 6). Mitochondria, o liczbie znacznie zmniejszonej, bardzo często były obrzmiałe z obecnym przejaśnieniem macierzy i częściową destrukcją grzebieni (ryc. 5, 6). Destrukcja niektórych mitochondriów była zaznaczona rozerwaniem ich błony zewnętrznej, a nawet wylaniem występującej w nich zawartości na zewnątrz. W uszkodzonych mitochondriach można było stwierdzić tworzenie się struktur mielinowych. Jądra hepatocytów wykazywały różnorodność kształtów i wielkości. W niektórych komórkach obserwowano piknotyczne jądra z chromatyną zagęszczoną na obwodzie świadczące o apoptozie (ryc. 5). Sieć śródplazmatyczna szorstka często była pofragmentowana, zwłaszcza w okolicy mitochondriów (ryc. 6). Zmniejszeniu uległa ilość ziaren gliko-



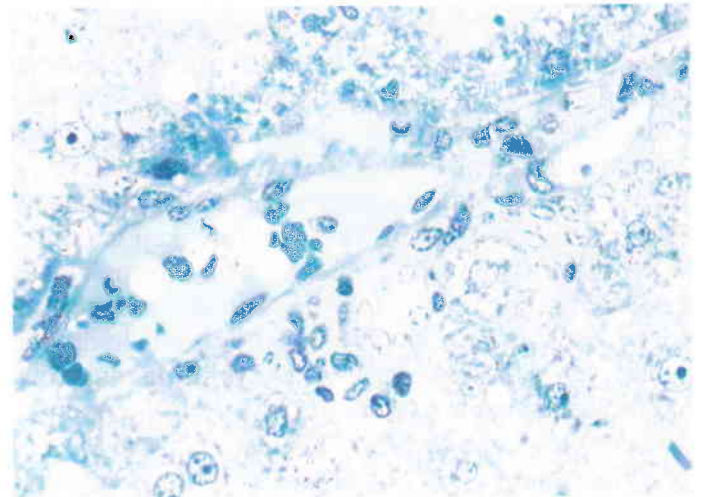
Ryc. 1. Wycinek wątroby szczura z grupy kontrolnej. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Powiększenie 280 ×



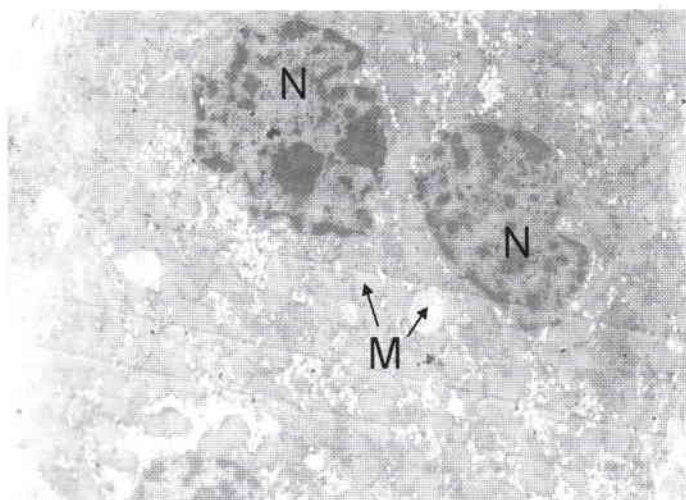
Ryc. 2. Wycinek wątroby szczura z grupy doświadczalnej. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Powiększenie 280 ×



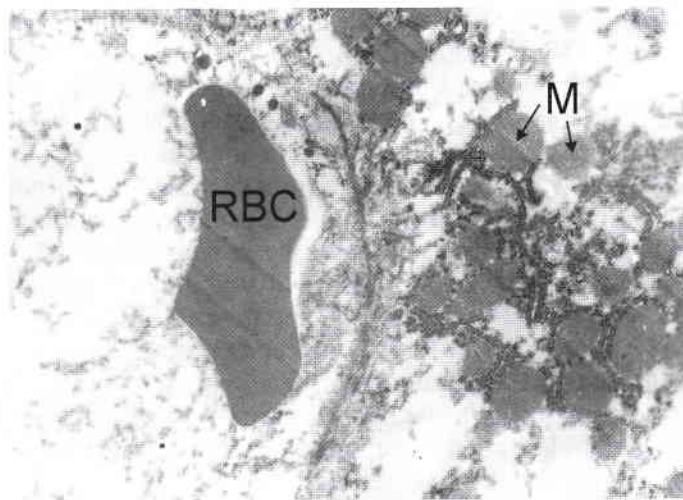
Ryc. 3. Wycinek wątroby szczura z grupy doświadczalnej. Preparaty półcienkie. Barwienie błękitem metylenowym z Azurem II. Powiększenie 280 ×



Ryc. 4. Wycinek wątroby szczura z grupy doświadczalnej. Preparaty półcienkie. Barwienie błękitem metylenowym z Azurem II. Powiększenie 280 ×



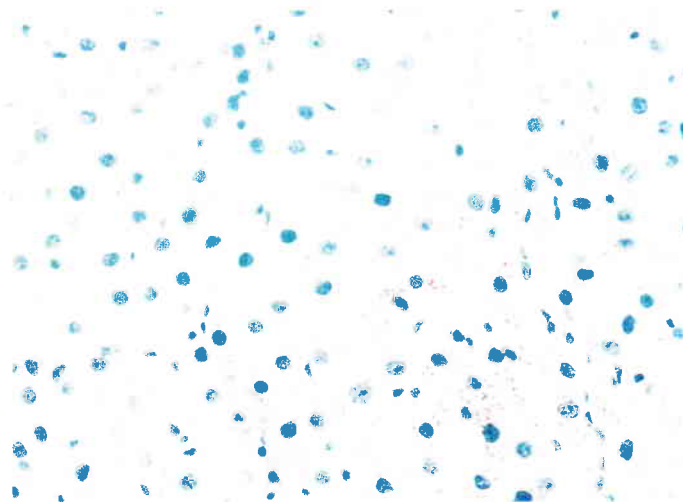
Ryc. 5. Elektronogram hepatocytu wątroby szczura z grupy doświadczalnej. Mitochondria z jasną macierzą i destrukcją grzebieni (M). Piknotyczne jądra (N). Powiększenie ok. 6000 ×



Ryc. 6. Elektronogram hepatocytu wątroby szczura z grupy doświadczalnej. „Pusta” cytoplazma, uszkodzone mitochondria (M). Pow. ok. 6000 ×



Ryc. 7. Wycinek wątroby szczura z grupy kontrolnej. Odczyn immunohistochemiczny. Brak widocznych miejsc ekspresji białka BAX. Pow. 280 ×



Ryc. 8. Wycinek wątroby szczura z grupy doświadczalnej. Odczyn immunohistochemiczny. Miejsca ekspresji białka BAX wybarwione na różowo. Pow. 280 ×

geny. Zaobserwowano nieregularne rozproszenie oraz wzrost liczby lizosomów. W sąsiedztwie kanalików żółciowych spostrzegano natomiast liczne autofagosome. Przestrzenie okołozatokowe często były poszerzone i obrzmiałe z zawartością uszkodzonej cytoplazmy hepatocytów, w których występował rozplam tkanek łącznej, co świadczy o uszkodzonej błonie komórkowej. Uszkodzenie błony komórkowej przejawiało się także obecnością erytrocytów w cytoplazmie hepatocytu (ryc. 6).

W badaniu immunohistochemicznym komórek wykazujących odczyn BAX(+) obserwowano ziarnisto-rozłany odczyn cytoplazmatyczny (ryc. 8). Zabarwienie ziarnistości było od jasno- do ciemnoróżowego. Ekspresja białka BAX była znacznie bardziej zaznaczona w preparatach z grupy doświadczalnej, w porównaniu z preparatami wątroby z grupy kontrolnej (ryc. 8), w których nie zauważono odczynu BAX(+).

W celu określenia występowania apoptozy w wątrobie samic szczura poddanych działaniu adriamycy-

ny w niniejszym doświadczeniu posłużono się oceną ekspresji proapoptotycznego białka BAX. Metody immunohistochemicznej użyto w celu określenia obecności apoptozy oraz jej immunolokalizacji w wątrobie. Obecność czerwono zabarwionych miejsc ekspresji białka uznano za dowód występowania apoptozy. Białko BAX należy do rodziny białek BCL-2, które biorą udział w regulacji procesów apoptozy. Szczególna ich rola zaznaczona jest w przebiegu wewnętrznego toru apoptozy zwanego mitochondrialnym. Tor ten jest odpowiedzią na wewnątrz- i zewnątrzpochodne czynniki inicjuje zniszczenie nici DNA. Białko BAX zwane jest proapoptotycznym. W rodzinie białek BCL-2 występuje też białko antyapoptotyczne BCL-2. Apoptoza inicjowana wewnętrznym torem pojawia się w przypadku przewagi aktywacji proapoptotycznych białek (w tym BAX) nad białkami antyapoptotycznymi. Drogę zewnętrzną zapoczątkowuje przyłączenie ligandu do receptora zawierającego domenę śmierci w wyniku czego dochodzi do aktywacji

prokaspazy 8. Obydwa tory apoptozy łączą się na poziomie aktywacji kaspazy 3.

Wykazano, że adriamycyna indukuje apoptotyczną defragmentację DNA poprzez aktywację kaspazy 3 (1). Obecność w niniejszej pracy wzmożonej ekspresji białka BAX w wątrobie szczura z grupy doświadczalnej w porównaniu z grupą kontrolną może świadczyć o tym, iż sygnał do apoptozy wywołanej ADR przebiega drogą mitochondrialną. Nie wyklucza to jednak możliwości inicjacji tego procesu przez ADR również innymi drogami, w tym drogą zewnętrzną.

Obecność drogi mitochondrialnej potwierdzają również obrazy z mikroskopu elektronowego, gdzie widoczne były uszkodzone mitochondria, z przejaśniałą macierzą i niskimi grzebieniami. Taki obraz mitochondriów odpowiada ich formie ortodoksyjnej, czyli wysokoenergetycznej. Adriamycyna ma zdolność hamowania procesu oddychania komórkowego poprzez zmniejszanie aktywności mitochondrialnej ATP-azy i oksydacyjną fosforylację ADP (2, 5). Mitochondria w formie ortodoksyjnej są więc charakterystyczne dla działania ADR.

Wykazano doświadczalnie, że ADR powoduje w wątrobie wzrost wychwytu tlenu proporcjonalnie zależny od podanej dawki leku w regionach okołowrotnych zrazików wątrobowych, które są bogate w tlen. ADR nie wpływa natomiast na wychwyt tlenu w hepatocytach, które leżą wokół żyły środkowej (obszary te są ubogie w tlen) (7).

W wątrobie szczurów z grupy doświadczalnej nie zaobserwowano w hepatocytach leżących w okolicach żyły środkowej wzrostu ekspresji białka BAX. Potwierdzałoby to wcześniejsze doniesienia autorów, że toksyczność adriamycyny jest tlenozależna (7). Należałoby jednak przeprowadzić szczegółową analizę wyników immunohistochemicznych obecnej pracy przy użyciu analizatora obrazów w celu określenia istotności statystycznej.

Obserwowane w przeprowadzonych badaniach: liza komórki, zatarcie struktur komórkowych, stan ortodoksyjny mitochondriów lub ich destrukcja, defrag-

mentacje sieci śródplazmatycznej szorstkiej potwierdzają również doniesienia innych autorów (2, 5, 6). Są dowodem występowania apoptozy hepatocytów, którą wywołała jedna dawka adriamycyny.

Piśmiennictwo

1. Asakura T., Sawai T., Hashidume Y., Yokoyama S., Ohkawa K.: Caspase-3 activation during apoptosis caused by glutathione-doxorubicin conjugate. *Br. J. Cancer.* 1999, 80, 711-715.
2. Bagnato A., Bianchi C., Caputo A., Silvestrini B., Florich A.: Enhancing effect of lonidamide on the inhibition of mitochondrial respiration by adriamycin. *Anticancer Res.* 1987, 7, 799-802.
3. Blum R. H., Carter S. K.: Adriamycin, a new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann. Int. Med.* 1974, 80, 249-259.
4. Drzewoski J., Matuszewicz W.: Farmakologia kliniczna Doksorubicyny (adriamycyny). *Pol. Tyg. Lek.* 1982, 37, 1071-1073.
5. Floridi A., Bianchi C., Bagnato A., Gambacurta A., Paggi M. G., Silvestrini B., Caputo A.: Lonidamine-induced outer membrane permeability and susceptibility of mitochondria to inhibition by adriamycin. *Anticancer Res.* 1987, 6, 1149-1152.
6. Franke H.: Substructural alterations of the liver parenchymal cells induced by xenobiotics. *Exp. Pathol.* 1990, 39, 139-155.
7. Ganey P. E., Kauffman F. C., Thurman R. G.: Oxygen-dependent hepatotoxicity due to doxorubicin: role of reducing equivalent supply in perfused rat liver. *Mol. Pharmacol.* 1988, 34, 695-701.
8. Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. H.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972, 26, 239-257.
9. Lockshin R. A., Williams C. M.: Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect. Physiol.* 1964, 10, 643-649.
10. Lockshin R. A., Zakeri Z.: Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002, 7, 545-550.
11. Matuszewicz W., Robak T.: Leki antrycylkinowe. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1985, 73, 242-249.
12. Meriwether W. D., Bachur N. R.: Inhibition of DNA and RNA metabolism by daunorubicin and adriamycin in L1210 mouse leukemia. *Cancer Res.* 1972, 32, 1137-1142.
13. Skomra D., Chibowski D.: Assessment of Daunorubicin nephrotoxicity and effect of tocopherol and ascorbic acid on lesions induced in rat's kidneys. Part I. Histological, histochemical and biochemical studies. *Ann. UMCS* 1993, 98, 181-188.
14. Speth P. A., Van Hoesel Q. G., Haanen C.: Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin. Pharmacokinet.* 1988, 15, 15-31.
15. Wieczorski M.: Skutki jednorazowego podania adriamycyny na wątrobę płodową i dojrzłą szczura – ocena zmian cytomorfologicznych. Praca dokt. AM Lublin 2003.
16. Zima T., Tesar V., Cekovska J., Stejskalova A., Platenik J., Teminova J., Nemecek K., Janebova M., Stipek S.: ICRF-187 (dexrazoxan) protects from adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998, 12, 1975-1979.

Adres autora: Zbigniew Boratyński, ul. Jesienna 7 m. 18, 20-337 Lublin; e-mail: zborat@agros.ar.lublin.pl

HERMOSILLA C., HETZEL U., BAUSCH M., GRÜBL J., BAUER C.: Pierwszy rodzimy przypadek onchocerkozji ocznej u psów w Niemczech. (First autochthonous case of canine ocular onchocercosis in Germany). *Vet. Rec.* 156, 450-452, 2005 (14)

W lutym 2002 r. u psa rasy syberyjski husky w wieku 7 lat wystąpiły zmiany ziarniniakowate w twardówce lewego oka. Materiał patologiczny usunięto chirurgicznie. Po roku wystąpiły zmiany w twardówce i w trzeciej powiece. Badanie histopatologiczne usuniętych chirurgicznie zmian wykazało obecność samców i ciężarnych samic *Onchocerca* otoczonych naciekiem komórkowym, w którego skład wchodziły granulocyty kwasochłonne, komórki plazmatyczne, fibroblasty, histiocyty i nowo wytwarzane naczynia krwionośne. Część dorosłych pasożytów otaczała otoczka kolagenowa. Średnia długość samców wynosiła 87 µm, samic 213 µm. Macicę samic o długości 178-187 µm wypełniały jajeczka lub mikrofilarie. W rozpoznaniu różnicowym chorób oczu u psów należy też uwzględniać możliwość występowania onchocerkozji nie tylko w USA i wschodniej Europie, ale i w Europie Środkowej.

G.

RÜFENACHT S., SAGER H., MÜLLER N., SCHAEERER V., HEIER A., WELLE M. M., ROOSJE P. J.: Dwa przypadki leishmaniozy u kotów w Szwajcarii. (Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland). *Vet. Rec.* 1456, 542-545, 2005 (17)

Opisano dwa przypadki leishmaniozy skóry u kotów. Pierwszy przypadek zdiagnozowano u kocura w wieku 6 lat, u którego występowały wrzodzące guzki w skórze kończyny tylnej, utrzymujące się przez okres roku. Leczenie *per os* amoksylicyną z kwasem klawulanowym przyniosło jedynie przejściową poprawę stanu zdrowia. Badanie histologiczne patologicznego materiału wykazało obecność nacieku makrofagów zawierających leishmanie, komórki plazmatyczne, granulocyty obojętne. Ostateczne rozpoznanie oparto o wynik testu PCR. Zastosowanie allopurinolu *per os* w dawce 10 mg/kg nie dało efektu. Zmiany w skórze usunięto chirurgicznie. Drugi kot w wieku 9 lat uprzednio przebywał w Hiszpanii i Szwajcarii. Zmiany chorobowe dotyczyły skóry głowy i szyi, i towarzyszyło im tworzenie pęcherzy liściastych. Rozpoznanie leishmaniozy oparto na wyniku testu ELISA i PCR.

G.