

Znaczenie cytodiagnostyki płynu puchlinowego w rozpoznawaniu przyczyn wodobrzusza u psów

KAMILA GLIŃSKA, STANISŁAW DZIMIRA*, WOJCIECH HILDEBRAND,
JÓZEF NICPOŃ, MAŁGORZATA CZERW**

Katedra Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych z Kliniką Chorób Koni, Psów i Kotów
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, pl. Grunwaldzki 47, 50-366 Wrocław

*Katedra Anatomii Patologicznej, Patofizjologii, Mikrobiologii i Weterynarii Sądowej
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

**Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,
ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Glińska K., Dzimira S., Hildebrand W., Nicpoń J., Czerw M.

Significance of the cytodiagnosics of peritoneal effusion in determining the causes of ascites in dogs

Summary

The main causes of ascites in dogs are: cirrhosis of the liver, chronic circulatory insufficiency, peritoneum infections, metabolic disorders and new-growth tumors. The aim of the research was to assess the efficacy of cytological diagnosis of the peritoneal cavity fluid in 25 dogs of different breeds and both sexes, displaying symptoms of ascites. Morphological blood tests comprising the designation of the erythrocytes number, hematocrite value, hemoglobin concentration, MCV, MCH, MCHC values and platelets count were conducted in the examined dogs. The concentration of urea, creatinine, ALT, AST, AP, total bilirubin, protein, albumins, diastase and lipase were determined in the biochemical tests of blood serum. Abdominal cavity and heart USG was performed in all the animals and the abdominal fluid was collected for physical and biochemical examinations. The obtained sediment was subjected to cytological examinations. In the performed examinations new-grown tumors were diagnosed in 5 (20%) dogs the on the basis of the cytological fluid test. USG diagnosis suggested neoplastic lesions in 2 (8%) cases. Cytological diagnosis proved to be the most sensitive and specific method in establishing the neoplastic etiology of ascites.

Keywords: dogs, ascites, cytodiagnosics

Terminem wodobrzusze (*ascites*) określa się gromadzenie płynu w jamie otrzewnowej, w ilości przekraczającej możliwości jego wchłonięcia (5). Diagnostyka wodobrzusza często sprawia duże trudności w praktyce klinicznej. Wykonanie badań morfologicznych i biochemicznych krwi, uzupełnionych diagnostyką obrazową i badaniem kardiologicznym w wielu przypadkach nie pozwala ustalić etiologii choroby. W przypadku wodobrzusza o nieznannej przyczynie powinno wykonać się badania biochemiczne, mikrobiologiczne oraz cytologiczne płynu puchlinowego (3, 7).

Głównymi przyczynami gromadzenia się płynu puchlinowego u psów mogą być: przewlekła niewydolność krążenia (6, 10), marskość wątroby powiązana z nadciśnieniem wrotnym i obniżeniem poziomu albumin (1, 9, 11), stany zapalne otrzewnej (7), zaburzenia metaboliczne (hipoalbuminemia) oraz choroby nowotworowe (12). Patomechanizm wodobrzusza uwarunkowany jest czynnikiem etiologicznym. W niewydolności krążenia przeciążenie prawej komory serca prowadzi do wzrostu ciśnienia na obwodzie (10) i zastój krwi w wątrobowych sinusoidach (16). W dłu-

gotrwałej niewydolności krążenia wskutek aktywacji układu renina–angiotensyna–aldosteron dochodzi do wzrostu resorpcji zwrotnej sodu i wody w kanalikach nerkowych (6). W przewlekłych chorobach wątroby dochodzi do powstania nadciśnienia wrotnego, wzrostu uwalniania substancji o charakterze wazodylatoryjnym (NO, prostacykliny, cytokiny, prostaglandyny), poszerzenia łożyska naczyniowego oraz wystąpienia hipowolemi (13, 16). Do innych nienowotworowych przyczyn gromadzenia płynu puchlinowego w jamie brzusznej należą: uszkodzenie przewodu trzustkowego lub pseudocysty trzustki (7). Drażnienie otrzewnej wydzielanymi przez trzustkę enzymami prowadzi do powstania bogatobiałkowego przesięku. Podobny mechanizm ma wodobrzusze powstałe w wyniku uszkodzenia pęcherzyka żółciowego i przewodów żółciowych (1, 2, 4).

W chorobach nowotworowych patogeneza wodobrzusza uzależniona jest od typu i lokalizacji zmian (8). Gromadzenie się płynu w jamie otrzewnowej może być bezpośrednim skutkiem rozrostu nowotworowego w obrębie błon surowiczych, kiedy komórki nowo-

tworowe uszkodzają naczynia krwionośne i chłonne, zamykając ich światło, powodując powstanie odczyn zapalny i złuszczenie się komórek do płynu. W innych przypadkach może być skutkiem ucisku mas nowotworowych na naczynia żyłne i chłonne (12). Niekiedy w procesach nowotworowych dochodzi do gromadzenia się płynu w następstwie wtórnych zmian zapalnych lub zaawansowanej niewydolności krążenia (3, 8, 14).

Celem badań było określenie przydatności diagnostyki cytologicznej płynu z jamy otrzewnowej i porównanie jej skuteczności w wykrywaniu zmian nowotworowych z diagnostyką ultrasonograficzną.

Materiał i metody

Badania płynu puchlinowego wykonano u 25 psów pacjentów Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych AR we Wrocławiu (11 owczarków niemieckich, 2 bernardynów, 1 rottweilera, 2 dobermanów, 1 boksera oraz 9 mieszańców) obu płci (15 samców, 10 samic) w wieku od 3 do 8 lat z objawami wodobrzusza. U wszystkich zwierząt zebrano wywiad i wykonano badanie kliniczne oraz badania morfologiczne krwi obejmujące: oznaczanie liczby erytrocytów i płytek krwi, wielkości hematokrytu, stężenia hemoglobiny, wartości MCV, MCH, MCHC (aparatem ABC Vet Animal Blood Counter), badania biochemiczne surowicy krwi obejmujące oznaczano wartość: mocznika, kreatyniny, ALT, AST, AP, bilirubiny całkowitej, białka, albumin, oraz aktywność diastazy, lipazy (Point 180, Kodak DT 60, Epoll 2, Spekoll 11). Badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej (Hitachi EUB-405) i przekładowe badanie echokardiograficzne serca.

W celach diagnostycznych oraz terapeutycznych u wszystkich zwierząt wykonano punkcję jamy brzusznej (abdominocentezy). Do tego zabiegu układano psy na prawym boku. Miejsce wykonania punkcji dokładnie wygolonno i dezynfekowano. Punkcję jamy brzusznej wykonywano (tylnie od pępka) w linii białej, przy użyciu igieł o średnicy 1,6 mm. Do badań przeznaczano 60 ml upuszczonego z jamy brzusznej płynu, który poddano analizie fizycznej, biochemicznej i cytologicznej. Płyn do badań biochemicznych i oceny cech fizycznych pobierano do próbki na skrzep. W celu wykonania badań cytologicznych płyn pobierano do próbek na wersenian dwusodowy (EDTA-K2) w stężeniu 1,5 mg/ml płynu. W badanym płynie określano: barwę, przejrzystość, ciężar właściwy, pH, ilość białka. Płyn pobrany na wersenian dwusodowy poddawano ilościowej ocenie mikroskopowej (cytoza) oraz ocenie cytologicznej preparatów barwionych (cytodiagnostyce) (3, 14).

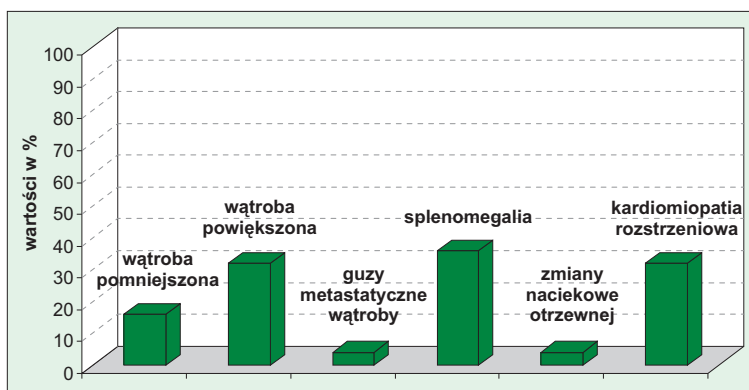
Płyn do badań cytologicznych odwirowano w wirowce przy prędkości 3500 obrotów w ciągu 5 minut. Z osadu wykonano rozmaz na szkiełku podstawowym i utrwalono preparatem Cytotfix. Uzyskany preparat barwiono metodą hematoksylina-eozyna. Cytodiagnostyka płynu puchlinowego polega na ocenie ilościowej i jakościowej komórek w płynie puchlinowym (14), a przede wszystkim na stwierdzeniu obecności komórek atypowych w przypadku podejrzenia zmian

nowotworowych. Jej wysoka specyficzność przy wykryciu komórek zmienionych nowotworowo umożliwia postawienie definitywnej diagnozy i ustalenia dalszego leczenia. Dokładność oceny cytologicznej płynu uzależniona jest od ilości komórek „złuszczonych” i czasu trwania procesu chorobowego.

Wyniki i omówienie

U wszystkich psów w wywiadzie stwierdzono duszność, spadek apetytu i aktywności fizycznej. W badaniu klinicznym obserwowano: powiększenie powłok brzusznych oraz stłumienie odgłosu opukowego (w dolnej części) jamy brzusznej. Wodobrzusze może pojawiać się gwałtownie lub powstawać powoli, w długim czasie. Badaniem fizykalnym wodobrzusze wykrywa się, gdy objętość nagromadzonego płynu w jamie brzusznej wynosi od 0,5 do 1,5 litra, w zależności od wielkości psa. W badaniu tym stwierdza się powiększenie powłok brzusznych (żabi brzuch), zmianę jego obrysu w zależności od pozycji zwierzęcia oraz falę odbicia przy opukiwaniu powłok brzusznych. U psów otyłych umiarkowane ilości płynu mogą być trudne do wykrycia (5, 7). W celu potwierdzenia rozpoznania wykonuje się badanie ultrasonograficzne, które pozwala wykryć już 100-150 ml płynu w jamie brzusznej. Małe ilości gromadzącego się płynu można najwcześniej zaobserwować w zachyłku między wątroby a prawą nerką oraz w przestrzeniach okołokręniczych. Przy masywnym wodobrzuszu hipoechogeny płyn wypełnia całą jamę brzuszną. Diagnostyka nowotworów jamy brzusznej opiera się na badaniu rentgenowskim i ultrasonograficznym oraz na badaniu cytologicznym osadu płynu puchlinowego (3).

W badaniu ultrasonograficznym jamy brzusznej, klatki piersiowej i serca u wszystkich zwierząt stwierdzono obecność płynu w jamie brzusznej i w klatce piersiowej, a u 8 osobników występowało ponadto wodosierdzie. W badaniu przeglądowym jamy brzusznej (ryc. 1) u 4 (16%) psów wątroba była pomniejszona o zmiennoechogeniczną strukturę, u 8 (32%) wątroba była powiększona. U jednego psa (4%) stwierdzono guzy metastatyczne w okolicy wnęki wątroby, a u dziewięciu osobników (36%) stwierdzono splenomegalię. U jednego psa (4%) występowały zmiany na ciękach otrzewnej.



Ryc. 1. Zmiany w badaniu USG u psów z objawami wodobrzusza

Tab. 1. Parametry fizyczne i biochemiczne badanych płynów wysiękowych i przesiękowych

Badane parametry	Prześiek	Wysięk
Liczba psów	8 (32%)	17 (68%)
Barwa	od słomkowej do różowej	od ciemnoróżowej do czerwono-brunatnej
Klarowność	klarowny	mętny
Leukocytoza	100-500 komórek/ μ l	600-2400 komórek/ μ l
pH	7,3-7,5	7,5 -8,0
Ciężar właściwy	1,003-1,015	1,015-1,030
Białko w płynie	3-20 g/l	30-48 g/l
Białko w płynie /białko w surowicy	< 0,5	> 0,5
Osad	ubogokomórkowy	bogatokomórkowy

otrzewnej nasuwające podejrzenie nacieków nowotworowych otrzewnej trzewnej i ściennej. U 8 (32%) pacjentów w badaniu ultrasonograficznym serca rozpoznano kardiomiopatię rozstrzeniową (ryc. 1).

Na podstawie przeprowadzonych badań morfologicznych i biochemicznych u 16 osobników (64%) stwierdzono niedokrwistość. U dwóch psów występowała leukopenia (8%), a u 12 (48%) leukocytoza. Trombocytopenie stwierdzono u 17 psów (68%), u 3 (12%) trombocytozę. Na podstawie badań biochemicznych w 4 osobników (16%) stwierdzono wzrost aktywności AST 1-2-krotnie przekraczający normę (15) oraz ALT, której wartości przekraczały 5-7-krotnie górną granicę normy, aktywność AP była 3-5-krotnie podwyższona przy zachowanych wartościach bilirubiny całkowitej. Poziom moczownika był podwyższony u 10 osobników (40%), a kreatyniny u 4 (16%). U 15 psów występowała hipalbuminemia. U wszystkich badanych zwierząt poziom diastazy i lipazy mięśni się w zakresie wartości norm referencyjnych (15).

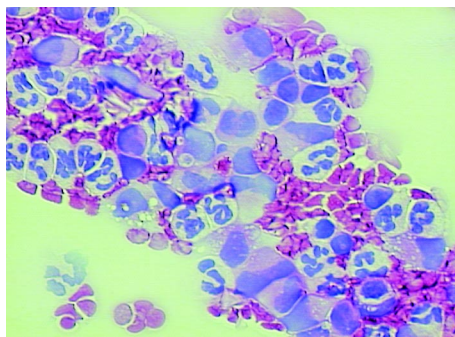
Pobrane płyny z jamy brzusznej psów na podstawie badań fizycznych i biochemicznych podzielono na prześiek i wysięk (tab. 1). U 8 (32%) psów stwierdzono płyn o charakterze przesiękowym. U 17 (68%) psów stwierdzono wysięk.

W badaniu mikroskopowym rozmazów płynów z jam ciała określano skład komórek oraz ich cechy morfologiczne. Z komórek nienowotworowych w płynach stwierdzono prawidłowe oraz uszkodzone komórki międzybłonka, monocyty, makrofagi, limfocyty, plazmocyty, granulocyty. Komórki między-

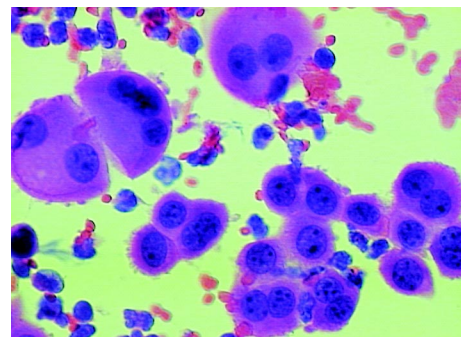
błonka charakteryzowały się dużym jądrem otoczonym niebiesko barwiącą się, często piankową cytoplazmą. W rozmazach znajdowały się liczne komórki międzybłonka, które różnicowano na pobudzone i prawidłowe. Monocyty charakteryzowały się szarą zwakuolizowaną cytoplazmą, w której ekscentrycznie było ułożone nieregularne jądro. Makrofagi różnicowano na makrofagi duże, małe, komórki piankowe. W 3 preparatach stwierdzono liczne komórki syngnetowate, powstałe z komórek piankowych w wyniku zlania wodniczek. Jedna duża wodniczka wypełniała centralną część komórki, spychając jądro na obwód. Świadczyły one o długotrwałym wysięku z równocześnie toczącym się stanem zapalnym. Z limfocytów w badanych płynach różnicowano limfocyty małe i duże. W rozmazach znajdowały się liczne neutrofile, w jednym płynie stwierdzono dużą ilość komórek eozynofilnych.

Klasyczny podział płynów na płyn wysiękowy i przesiękowy często nie jest przydatny w praktyce lekarskiej, dlatego bardziej użyteczną klasyfikacją płynu jest podział dokonywany na podstawie badania cytologicznego na: płyn nienowotworowy (prześiek i wysięk) oraz płyn nowotworowy (prześiek nowotworowy oraz wysięk nowotworowy).

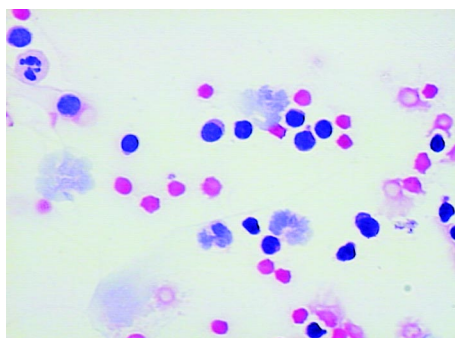
Spośród 25 badanych płynów psów w 5 znaleziono komórki o cechach nowotworowych. U 20 psów, od których pobrano płyn nienowotworowy 8 płynów miało cechy przesięku (ryc. 4), a 12 płynów było płynem



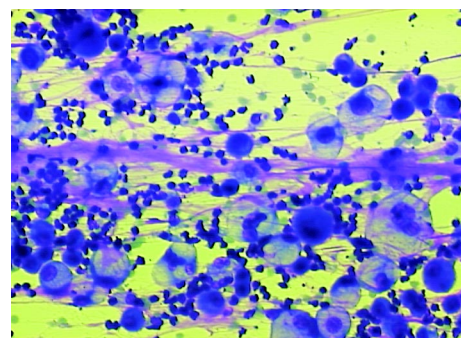
Ryc. 2. Wysięk nienowotworowy w przebiegu kardiomiopatii rozstrzeniowej. W obrazie widoczne liczne komórki otrzewnej oraz neutrofile. Barwienie HE, 600 \times



Ryc. 3. Wysięk nowotworowy. Komórki gruczolakoraka w jamie otrzewnej, przerzuty z sutka. Barwienie HE, 600 \times



Ryc. 4. Prześiek nienowotworowy. Widoczne erythrocyty, limfocyty oraz cienie komórkowe. Barwienie HE, 600 \times

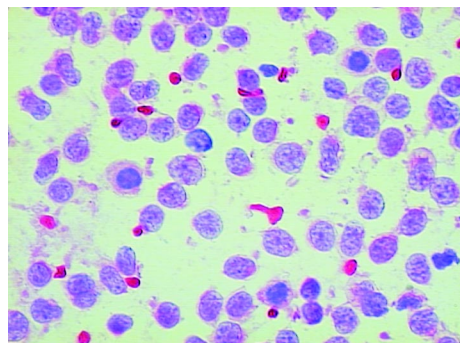


Ryc. 5. Wysięk nowotworowy. Komórki gruczolakoraka żołądka. Widoczna anizocytoza oraz obfity naciek zapalny. Barwienie HE, 600 \times

wysiękowym (ryc. 2). W płynach przesiękowych znajdowały się pojedyncze złuszczone komórki międzybłonka. W płynach od 2 psów występowały liczne pobudzone komórki międzybłonka zawierające od 1 do 3 jąder, charakteryzujące się nadbarwliwością jądra. Występowały pojedyncze limfocyty i granulocyty obojętnochłonne. W płynach wysiękowych nienowotworowych występowały liczne erytrocyty. Stwierdzono liczne limfocyty i granulocyty obojętnochłonne oraz makrofagi. W jednym płynie znajdowały się liczne eozynofile cechujące wysięki alergiczne (które mogłyby przemawiać za pasożytniczą etiologią wodobrzusza). W 3 badanych rozmazach znajdowały się komórki sygnetowe oraz liczne komórki piankowate charakterystyczne dla długotrwałego wysięku. Cztery badane preparaty zawierały liczne makrofagi i komórki piankowate charakterystyczne dla etiologii miażdżycowej.

Pięć płynów nowotworowych miało cechy wysięku. Były to płyny o zabarwieniu krwistym, wysokobiałkowe (35-49 g/l) o wartości pH 7,5-8 i ciężarze właściwym > 1,020. W badaniu cytologicznym określano obrys i kształt komórek, stosunek jądra do cytoplazmy, zmiany kształtu jądra, zmiany cytoplazmy oraz tendencje komórek do tworzenia gniazd. W dwóch badanych płynach nowotworowych znaleziono komórki gruczolakoraka (ryc. 3, ryc. 5). Komórki te charakteryzowały się tendencją do tworzenia gniazd i pakietów. Widoczny był wyraźny polimorfizm komórkowy i cechy anizokariozy. W jednym płynie występowały komórki rakowe cechujące się dużymi różnicami w kształcie oraz wielkości komórek i ich jąder. Obserwowano komórki duże oraz bardzo małe z ciemnym, pyknotycznym jądrem. Obok komórek nieregularnie owalnych oraz okrągłych obserwowano komórki wieloboczne oraz cylindryczne. Na podstawie powyższego obrazu oraz licznych figur podziałów mitotycznych postawiono podejrzenie nowotworu o agresywnym charakterze.

W dwóch badanych płynach stwierdzono chłoniaka na podstawie obecności bardzo licznych nowotworowo transformowanych limfocytów (ryc. 6). Komórki te cechowały się dużym jądrem z licznymi jąderkami leżącymi pod błoną jądrową oraz małym rąbkem słabo barwiącej się cytoplazmy.



Ryc. 6. Chłoniak złośliwy. Nowotworowo transformowane limfocyty charakteryzujące się dużym jądrem i małym rąbkem cytoplazmy. Barwienie HE, 600 ×

W przeprowadzonych badaniach 5 (20%) przypadków wodobrzusza było wywołane zmianami nowotworowymi. W większości zwierząt występowała anemia i hypoalbuminemia. Diagnostyka

ultrasonograficzna umożliwiła postawienie podejrzenia zmian nowotworowych w 2 (8%) spośród 25 badanych przypadków. Niezwykle cenna okazała się diagnostyka cytologiczna, charakteryzująca się wysoką czułością. U zwierząt z rozpoznaną etiologią nowotworową wodobrzusza brak było charakterystycznych zmian w obrazie morfologicznym i biochemicznym krwi.

Cytologia płynu puchlinowego psów ma szczególne znaczenie w diagnostyce i określenia etiologii wodobrzusza. Znalezienie i określenie pochodzenia histologicznego komórek nowotworowych jest ważne dla postawienia właściwego rozpoznania, wyboru metody leczenia i rokowania stanu pacjenta. Jednak brak obecności komórek nowotworowych w badaniu cytologicznym płynu puchlinowego nie jest równoznaczny z wykluczeniem nowotworowej etiologii wodobrzusza. W przypadku uzyskania wyników negatywnych lub wątpliwych zaleca się powtórne badanie płynu. Badanie cytologiczne, mimo że pozwalające postawić pewną diagnozę w przypadku obecności komórek nowotworowych, powinno zawsze być uzupełnione dodatkowymi badaniami morfologicznymi, biochemicznymi i fizycznymi płynu popartymi diagnostyką obrazową.

Piśmiennictwo

1. Bunch S.: Clinical manifestations of hepatobiliary disease, [w:] Nelson R. W., Mosby Couto C. G.: Essentials of Small Animal Internal Medicine. St. Louis 1992, 369-378.
2. Bromel C., Leveille R., Scrivani P. V., Smeak D. D., Podell M., Wagner S. O.: Gallbladder perforation associated with cholelithiasis and cholecystitis in a dog. J. Small. Anim. Pract. 1998, 39, 541-544.
3. Dzimira S.: Cytodiagnostyka płynów z jam ciała. Magazyn Wet. 2004, 3, 17-19.
4. Dennler R., Grundmann S.: Traumatic rupture of the common bile duct in a dog. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 2003, 145, 181-187.
5. Fry M. M., DeCock H. E., Greeley M. A., Vernau W.: Abdominal fluid from a dog. Vet. Clin. Pathol. 2003, 32, 77-80.
6. Kitagawa H., Kitoh K., Inoue H., Ohba Y., Suzuki F., Sasaki Y.: Plasma renin activities, angiotensin II concentrations, atrial natriuretic peptide concentrations and cardiopulmonary function values in dogs with severe heartworm disease. J. Vet. Med. Sci. 2000, 62, 453-455.
7. Kooistra H. S.: Dogs with ascites. Tijdschr. Diergeneesk. 1994, 15, 119-175.
8. Krus S., Skrzypek-Fakhoury E.: Patomorfologia kliniczna. PZWL, Warszawa 1996, 469-473.
9. Lucena R., Mozos E., Bautista M. J., Ginel P. J., Perez J.: Hepatic cirrhosis in a five-month-old dog. J. Small. Anim. Pract. 2001, 42, 239-242.
10. Mohr A. J., Kirberger R. M.: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in a dog. J. S. Afr. Vet. Assoc. 2000, 71, 125-130.
11. Rallis T. S., Tontis D., Adamama-Moraitou K. K., Mylonakis M. E., Papazoglou L.: Hepatic haemangioma associated with ascites in a dog. Vet. Rec. 1998, 20, 142, 700-701.
12. Rosenthal R. C.: Veterinary oncology secrets. Hanley and Belfus Inc. Medical Publishers, Philadelphia 2001.
13. Sevelius E.: Diagnosis and prognosis of chronic hepatitis and cirrhosis in dogs. J. Small Anim. Pract. 1995, 36, 521-528.
14. Woyke S.: Wybrane działy cytodiagnostyki. PZWL, Warszawa 1973.
15. Winnicka A.: Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych. SGGW, Warszawa 1997.
16. Zhang R. P., Zhang W. H., Xue D. B., Wei Y. W.: Morphology of portal hypertension at the early stage of liver damage induced by CCl4: an experimental study with dogs. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2004, 84, 1118-1121.

Adres autora: lek. wet. Kamila Glińska, pl. Grunwaldzki 47, 50-366 Wrocław; e-mail: kamilaglińska@o2.pl