

# Immunohistochemiczna analiza obłoniaków u psów

AGNIESZKA JASIK, WOJCIECH ŁOPUSZYŃSKI\*,  
ZBIGNIEW NOZDRYN-PŁOTNICKI\*, WOJCIECH KOZACZYŃSKI

Zakład Anatomii Patologicznej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

\*Katedra Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Jasik A., Łopuszyński W., Nozdryn-Płotnicki Z., Kozaczyński W.

## Immunohistochemical analysis of canine haemangiopericytomas

### Summary

The aim of the study was an attempt to elucidate canine haemangiopericytoma histogenesis based on immunohistochemical analysis using a range of commercially available antibodies. Seventeen canine haemangiopericytomas were examined. Histological analysis revealed the presence of spindle cells arranged in a circular pattern around capillaries ("fingerprint" pattern) or interlacing bundles. Fingerprint patterns were the distinguishing feature in all examined haemangiopericytomas. Immunohistochemical analysis revealed positive expressions of vimentin, neuron-specific enolase (NSE), glial fibrillary acidic protein (GFAP), S-100 protein (S-100) and smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). Negative reactions in tumor cells were observed for cytokeratin (CK), desmin (DES), epithelial membrane antigen (EMA) and VIII-related antigen factor (FVIII). Positive expressions of neuronal markers may not necessarily reflect the neural origin of tumors due to their low specificity. Immunoreactivity for  $\alpha$ -SMA and DES negativity may suggest the presence of vascular smooth muscle cells or cells of pericytic origin. Moreover, the  $\alpha$ -SMA antibody may be useful for a differential diagnosis of canine haemangiopericytomas.

**Keywords:** canine haemangiopericytoma, muscle actin

Obłoniak (*haemangiopericytoma*) jest nowotworem występującym u ludzi i psów. Według obowiązującej klasyfikacji WHO zaliczany jest do grupy złośliwych guzów mezenchymalnych skóry i tkanki podskórnej (6). Prawdopodobnie wywodzi się z perycytów, co potwierdzono badaniami ultrastrukturalnymi jedynie u ludzi.

W przypadku psów histogeneza tego guza nie jest do końca wyjaśniona. Mimo że cechy przypisane obłoniakom, takie jak: słabo wykształcona błona podstawna, szczątkowe połączenia międzykomórkowe, pęcherzyki pinocytarne są zgodne z ultrastrukturą perycytów, nie można jednak wykluczyć pochodzenia tego guza z fibroblastów nerwicy, ponieważ posiadają one identyczne cechy ultrastrukturalne (7, 8, 11, 14).

Nowotwory te u psów występują dosyć często, stanowiąc 3,2-4,2% wszystkich guzów skórnych (2, 5). Pojawiają się głównie na kończynach w okolicy stawów, chociaż stwierdzano je również w śledzionie (10) i żołądku (13). Natomiast u ludzi odnotowano przypadki występowania obłoniaka także w śródpiersiu, macicy, wątrobie i płucach (4).

Są to zwykle guzy pojedyncze, wolno rosnące, osiągające rozmiary od 0,6 do 25 cm średnicy. Dotyczą psów w wieku 7-10 lat, głównie dużych ras. Skóra pokrywająca guz może być bezwłosa z obecnością

owrzodzeń. Obłoniaki mogą być spistości twardej, gumowatej lub podobnej do tkanki tłuszczowej (2, 5, 6, 8, 12, 14). Mimo że są zmianami dobrze odgraniczonymi od sąsiadujących tkanek, otaczająca masę guza pseudotorebka umożliwia im rozprzestrzenianie się wzdłuż powięzi i mięśni. Sprawia to trudności w ustaleniu właściwego marginesu cięcia chirurgicznego, a tym samym jest przyczyną wysokiego odsetka wznowy, 26-60% (8, 9, 12). Z każdą wznową wiąże się wzrost aktywności mitotycznej komórek guza, co zwiększa jego zdolność do dawania przerzutów, która w przypadku pierwotnej zmiany jest bardzo niska.

Histologicznie cechą charakterystyczną obłoniaków występujących u psów jest obecność warstw wrzecionowatych komórek ułożonych w koncentryczny wzór dookoła centralnego naczynia określane jako „odcisk palca” (fingerprinting). U człowieka możemy zaobserwować ciasno upakowane owalne lub wrzecionowate komórki ułożone dookoła cienkościennych naczyń krwionośnych (4, 7, 11).

Wzór „odcisku palca” jest cechą dominującą w obłoniakach psów, ale może również występować w innych nowotworach, jak: nerwiakowłókniaku, włóknistej histiocytomie, włókniakomięsaku (7, 11). Sprawia to duże trudności w diagnostyce histopatologicznej i skłania do poszukiwania dodatkowych metod diag-

nostycznych. Obecność specyficznych markerów tkankowych w obłoniaku, a brak ich w innych guzach o podobnym wyglądzie histologicznym, mogłaby ułatwić rozpoznanie. Jak dotąd nie określono dokładnie profilu immunohistochemicznego obłoniaków u psów, być może dlatego, że większość przeciwciał stosowanych w diagnostyce ludzkiej nie wykazuje specyficznego powinowactwa do tkanki zwierzęcej. Dlatego też celem pracy była analiza immunohistochemiczna obłoniaków u psów z zestawem dziewięciu powszechnie dostępnych przeciwciał i próba wyjaśnienia na podstawie ich ekspresji w tkance nowotworowej, histogenezy tego guza.

### Materiał i metody

Badaniom poddano 17 usuniętych chirurgicznie guzów, pochodzących od psów w różnym wieku i różnych ras. Materiał przekazano do Katedry Anatomii Patologicznej AR w Lublinie. Pobrane z każdego guza wycinki tkankowe utrwalone w 10% obojętnej formalinie, a następnie przeprowadzono rutynowo do bloczków parafinowych i krojono na skrawki histologiczne o grubości 5 µm. Rozpoznanie preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną dokonano w oparciu o klasyfikację guzów łącznotkankowych skóry i tkanek miękkich wg WHO. Do badania immunohistochemicznego (IHC) 5 µm skrawki nanoszono na silanizowane szkiełka, które następnie odparafinowano i uwodniono. Blokowanie endogennej peroksydazy przeprowadzono przez inkubację preparatów w 3% roztworze wody utlenionej przez 10 minut. Następnie skrawki inkubowano z zestawem 9 przeciwciał (tab. 1). Celem odmaskowania anty-

Tab. 1. Przeciwciała wykorzystane w badaniu immunohistochemicznym obłoniaków

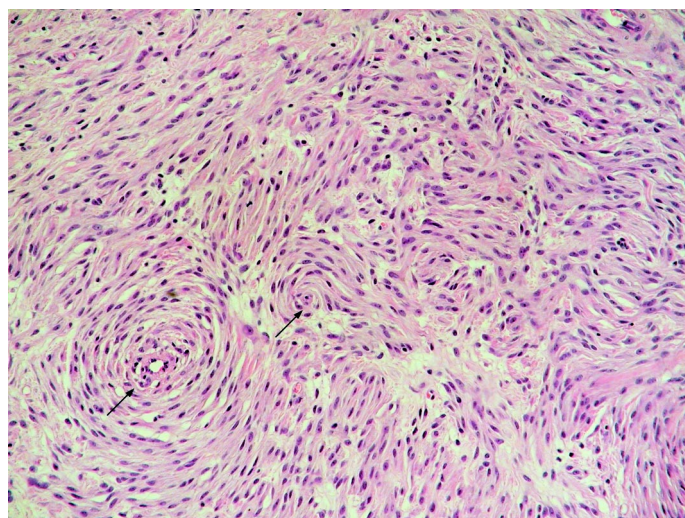
Przeciwciało	Producent	Rozcieńczenie
Mysie monoklonalne przeciwciało przeciwko cytokeratynie, klon MNF 116	Dako Cytomation, Denmark	1 : 100
Mysie monoklonalne przeciwciało przeciwko wimentynie, klon V9	Dako Cytomation, Denmark	1 : 100
Mysie monoklonalne przeciwciało przeciwko desminie, klon D33	Dako Cytomation, Denmark	1 : 100
Mysie monoklonalne przeciwciało przeciwko $\alpha$ -aktynie mięśniowej, klon 1A4	Dako Cytomation, Denmark	1 : 100
Królicze poliklonalne przeciwciało przeciwko białku S-100	Biotrend, Germany	Prediluted
Królicze poliklonalne przeciwciało przeciwko neuronospecyficzej enolazie	Biotrend, Germany	Prediluted
Królicze poliklonalne przeciwciało przeciwko kwaśnemu białku włókiennkowemu gleju	Dako Cytomation, Denmark	1 : 500
Mysie monoklonalne przeciwciało przeciwko antygenowi nabłonkowemu, klon GP1.4	Biotrend, Germany	Prediluted
Królicze poliklonalne przeciwciało przeciwko czynnikowi VIII	Biotrend, Germany	Prediluted

genów tkankowych, skrawki przeznaczone do wykrywania cytokeratyny (CK), białka S-100 (S-100), antygeny nabłonkowego (EMA), czynnika FVIII (FVIII) i kwaśnego białka włókiennkowego gleju (GFAP) inkubowano z proteinazą K (Dako) przez 1,5-5 minut.

Skrawki tkankowe do wykrycia wimentyny (VIM), gotowano w buforze cytrynianowym o pH 6,0 przez 5 min., natomiast preparaty dla wykrycia desminy (DES) i  $\alpha$ -aktyny ( $\alpha$ AK) gotowano w buforze Tris-EDTA o pH 9,0 przez 5 min. W badaniu IHC wykorzystano zestaw HRP/LSAB+ (Dako). Pierwotne przeciwciała rozcieńczono w rozcieńczalniku Antibody Diluent (Dako) i skrawki inkubowano przez 30 min. w temp. pokojowej w wilgotnej komorze. Następnie zastosowano przeciwciało wtórne biotynylowane anty-pierwotne na 30 min. w temp. pokojowej. W kolejnym etapie skrawki inkubowano przez 20 min. ze streptawidyną. Inkubację z kolejnymi odczynnikami przerywano poprzez dwukrotne płukanie skrawków w buforze TBST. Miejsca reakcji antygen-przeciwciało uwidoczniło, inkubując preparaty z czterochlorowodorkiem 3,3'-diami-nobenzydyny (Vector), otrzymując brunatny wynik reakcji. W końcowym etapie preparaty podbarwiono hematoksyliną Meyera, różnicowano w wodzie amoniakalnej, odwodniono, prześwietlono w ksylenie i zamknięto w balsamie kanadyjskim. Jako kontrolę negatywną wykorzystano skrawki obłoniaków, zastępując pierwotne przeciwciało buforem TBST, natomiast jako kontrolę pozytywną wykorzystano skrawki macicy i tkanki mózgowej psa.

### Wyniki i omówienie

W obrazie mikroskopowym wszystkich badanych guzów ujawniono obecność wrzecionowatych komórek zaopatrzonych w wypustki cytoplazmatyczne z owalnymi centralnie ułożonymi jądrami i centralnie położonymi jednym lub dwoma jąderkami. Komórki te tworzyły zróżnicowane układy histologiczne. W części preparatów układały się w koncentryczny wzór dookoła cienkościennych naczyń krwionośnych (wzór „odcisku palca”), podczas gdy w innych rejonach tego samego guza w przeplatające się pęczki. W większo-



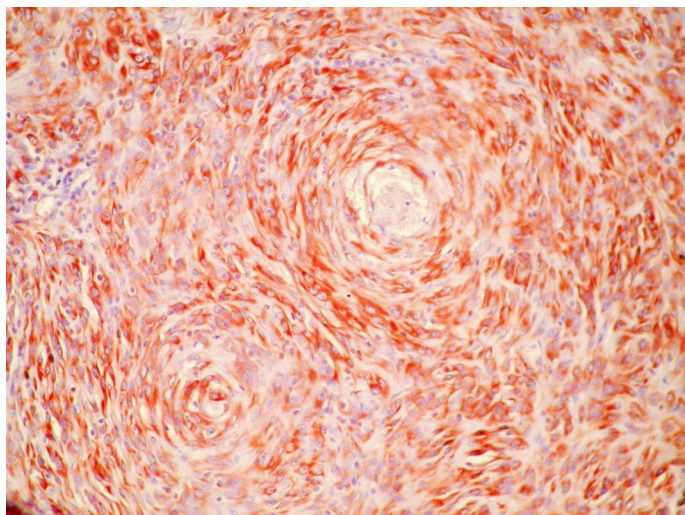
Ryc. 1. Histologiczny obraz obłoniaka u psa. Widoczny charakterystyczny koncentryczny układ wrzecionowatych komórek dookoła centralnego naczynia (wzór „odcisku palca” – strzałki). Barwienie HE, pow. ok. 200 ×

Tab. 2. Wyniki reakcji immunohistochemicznej badanych obłąniaków

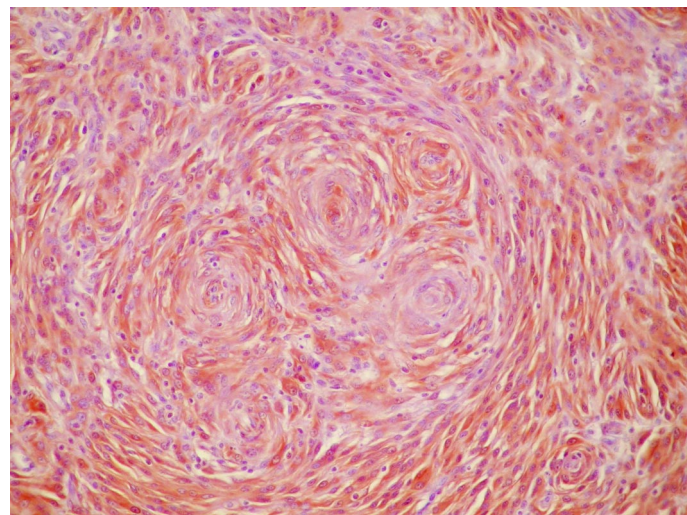
Przeciwciało	CK	VIM	DES	S100	NSE	GFAP	EMA	FVIII	$\alpha$ -AK
Liczba dodatnich przypadków do liczby wszystkich badanych	0/17	17/17	0/17	2/17	16/17	6/17	0/17	0/17	12/17

ci guzów stwierdzono jednocześnie obecność miejsc o zwartym i luźnym utkaniu komórek nowotworowych. W histologicznej ocenie wzór „odcisku palca” był cechą dominującą we wszystkich badanych preparatach (ryc. 1). Wyniki barwienia immunohistochemicznego przedstawiono w tab. 2. We wszystkich preparatach komórki nowotworowe wykazały silną ekspresję wimentyny (ryc. 2). Rozlany odczyn dodatni, cytoplazmatyczno-jądrowy na neuronospecyficzną enolazę stwierdzono w 16 obłąniakach (ryc. 3). Spośród pozostałych markerów neuronalnych ogniskową ekspresję GFAP stwierdzono w 6 obłąniakach, natomiast biał-

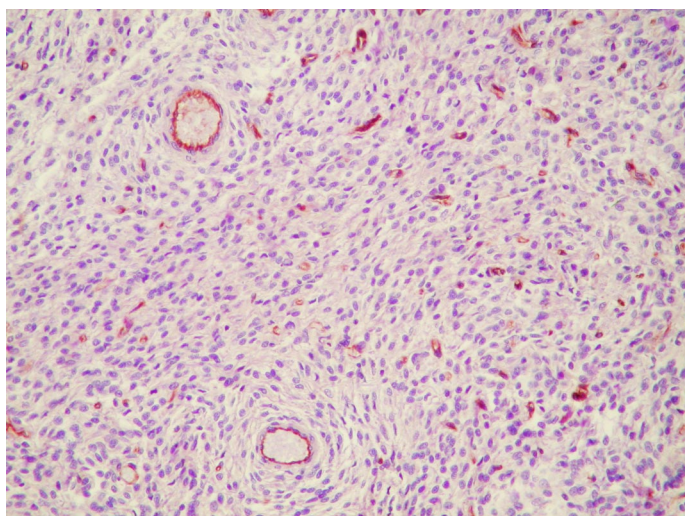
ka S-100 w 2 przypadkach. Reakcje obu przeciwciał obserwowano w komórkach nowotworowych. Brak reakcji zaobserwowano w komórkach nowotworowych dla CK, DES, EMA i czynnika FVIII. Reakcja na czynnik FVIII ograniczała się do komórek śródbłonna naczyń, przedstawiając tym samym unaczynienie guza (ryc. 4). Ekspresję  $\alpha$ -SMA stwierdzono w perycytach tętnic, żył i naczyń włosowatych zlokalizowanych zarówno w masie guza, jak i w otaczającej go tkance łącznej we wszystkich przypadkach. Natomiast dodatni odczyn cytoplazmatyczny w komórkach nowotworowych dla  $\alpha$ -SMA zaobserwowano w 12 obłąniakach, zarówno w rejonie „wzoru odcisku palca”, jak i luźnego utkania komórkowego (ryc. 5).



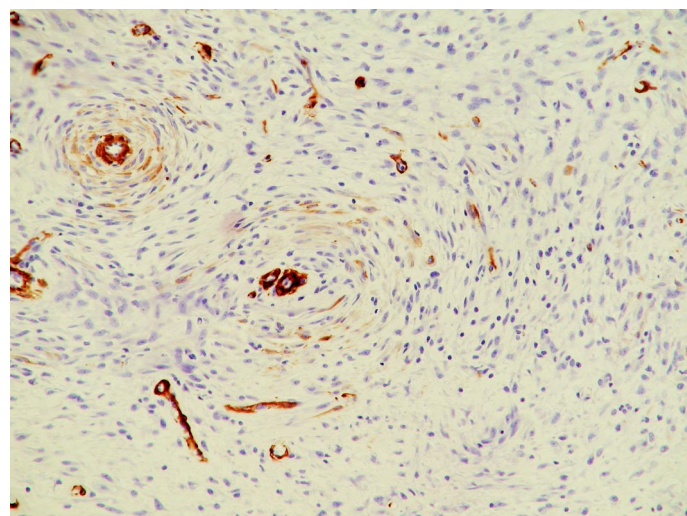
Ryc. 2. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna na obecność wimentyny V9. Rozlany odczyn cytoplazmatyczny w komórkach nowotworowych. Metoda HRP/LSAB+ wimentyna, pow. ok. 200  $\times$



Ryc. 3. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna na obecność neuronospecyficznego enolazy. Silny odczyn cytoplazmatyczno-jądrowy w komórkach nowotworowych. Metoda HRP/LSAB+ NSE, pow. ok. 200  $\times$



Ryc. 4. Reakcja immunohistochemiczna komórek śródbłonna naczyń na obecność czynnika FVIII. Reakcja ta obrazuje unaczynienie guza. Metoda HRP/LSAB+ czynnik FVIII, pow. ok. 200  $\times$



Ryc. 5. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna na obecność  $\alpha$ -aktyny mięśniowej. Odczyn obecny w perycytach naczyń oraz ogniskowo w komórkach nowotworowych koncentrycznie układających się dookoła centralnego naczynia. Metoda HRP/LSAB+  $\alpha$ -SMA, pow. ok. 200  $\times$

Obraz histologiczny potwierdza obserwacje innych autorów, co do rodzaju i wyglądu komórek tkanki guzowatej, jak i ich charakterystycznego koncentrycznego ułożenia dookoła naczyń (1-11, 14-16).

Pozytywna reakcja na obecność VIM przy braku reakcji ze strony CK jest zgodna z domniemanym mezenchymalnym pochodzeniem obłąniaków i była opisywana wcześniej zarówno u ludzi, jak i u psów (3, 7, 8, 11). Podobnie jak w przypadku obłąniaków analizowanych przez Williamsona i wsp. (15), w badanej grupie psich guzów nie stwierdzono obecności DES, co sugeruje brak mięśniowego zróżnicowania obłąniaków. Jakkolwiek obecność tego markera odnotowano incydentalnie, to jednak traktowano jego ekspresję jako niespecyficzną (7). Obecność pozytywnej reakcji dla markerów neuronalnych, takich jak S-100, GFAP czy NSE, niektórym autorom nasuwa podejrzenie nerwowego pochodzenia obłąniaków. Jednak jeśli weźmie się pod uwagę występowanie białka S-100 w czerniakach, nerwiakowłókniakach, komórkach Langerhansa, a NSE i GFAP także w mięśniakomięsakach prążkowanokomórkowych psów (3), wówczas można zakwestionować specyficzność stosowanych przeciwciał i tym samym ich użyteczność w diagnostyce różnicowej. Można też uznać perycyty za komórki wielopostaciowe, które w zależności od stopnia zróżnicowania wykazują obecność tych markerów. Z podobną sytuacją spotkamy się w przypadku ekspresji  $\alpha$ -SMA. Ludzkie perycyty wykazują ekspresję  $\alpha$ -SMA, natomiast brak tego antygeny w przypadku ludzkich obłąniaków. Prawdopodobnie wiąże się to z utratą antygenowości podczas procesu nowotworowej transformacji. Może to również wskazywać na zupełnie inne pochodzenie obłąniaków. Natomiast w przypadku psich guzów w opisanych dotąd badaniach mamy do czynienia z silną ekspresją  $\alpha$ -SMA (3, 7, 11). W analizowanych w tej pracy nowotworach ogniskową ekspresję  $\alpha$ -SMA stwierdzono w 12 z 17 obłąniaków. Obecność  $\alpha$ -SMA opisywano jak dotąd jedynie w przypadku obłąniaków i mięśniakomięsaków gładkokomórkowych, natomiast w przypadku guzów wywodzących się z osłonki nerwów obwodowych stwierdzono brak ekspresji tego antygeny zarówno u ludzi, jak i psów (7, 11). Zatem przeciwciało to może być użyteczne w diagnostyce różnicowej obłąniaków. Ponadto nie potwierdza to hipotezy nerwowego pochodzenia tych guzów. Ekspresja  $\alpha$ -SMA w badanych guzach, przy braku reakcji na desminę może świadczyć o obecności komórek mięśni gładkich naczyń lub komórek pochodzących z perycytów. Jednak na potwierdzenie tej hipotezy należałoby przeprowadzić badania na większej liczbie przypadków oraz poszerzyć zestaw przeciwciał o inne bardziej specyficzne markery nowotworowe.

### Piśmiennictwo

1. *Beust B. R., Suter M. M., Summers B. A.*: Factor VIII-related antigen in canine endothelial neoplasms: an immunohistochemical study. *Vet. Pathol.* 1988, 25, 251-255.
2. *Bostock D. E.*: Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *Br. Vet. J.* 1986, 142, 1-19.
3. *Chijiwa K., Uchida K., Tateyama S.*: Immunohistochemical evaluation of canine peripheral nerve sheath tumors and other soft tissue sarcomas. *Vet. Pathol.* 2004, 41, 307-318.
4. *Evans R. W.*: *Histological Appearances of Tumours.* Livingstone Ltd, Edinburgh and London 1966, s. 103-107.
5. *Graves G. M., Bjorling D. E., Mahaffey E.*: Canine hemangiopericytoma: 23 cases (1967-1984). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988, 192, 99-102.
6. *Hendrick M. J., Mahaffey E. A., Moore F. M., Vos J. H., Walder E. J.*: Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. *Bull. WHO*, vol II, 1998, 32-33.
7. *Mazzei M., Millanta F., Citi S., Lorenzi D., Poli A.*: Haemangiopericytoma: histological spectrum, immunohistochemical characterization and prognosis. *Vet. Dermatol.* 2002, 13, 15-21.
8. *Meuten D. J.*: *Tumors in Domestic Animals.* Blackwell Publishing Company, Iowa State Press 2002, s. 94-95.
9. *Morris J., Dobson J.*: *Onkologia małych zwierząt.* SIMA WLW, Warszawa 2003, s. 74-81.
10. *Obwolo M. J.*: Primary splenic haemangiopericytoma in a German shepherd dog. *J. Comp. Pathol.* 1986, 96, 285-288.
11. *Pérez J., Bautista M. J., Rollón E., Chacón-M. de Lara F., Carrasco L., Martín de las Mulas J.*: Immunohistochemical characterization of hemangiopericytomas and other spindle cell tumors in the dog. *Vet. Pathol.* 1996, 33, 391-397.
12. *Richardson R. C., Render J. A., Rudd R. G., Shupe R. S., Carlton W. W.*: Metastatic canine hemangiopericytoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1983, 182, 705-706.
13. *Sapierzyński R., Malicka E., Skrzypczak M., Sokolowska J.*: Nowotwory żołądka u psów. *Życie Wet.* 2002, 77, 581-584.
14. *Sapierzyński R., Sapierzyńska E.*: Nowotwory mezenchymalne skóry i tkanki podskórnej u psów i kotów. Część II. Obłąniak, nerwiakowłókniakomięsak i tłuszczak naciekający. *Życie Wet.* 2004, 79, 435-439.
15. *Williamson M. M., Middleton D. J.*: Cutaneous soft tissue tumours in dogs: classification, differentiation and histogenesis. *Vet. Dermatol.* 1998, 9, 43-48.
16. *Yost D. H., Jones T. C.*: Hemangiopericytoma in the dog. *Am. J. Vet. Res.* 1958, 159-163.

Adres autora: lek. wet. Agnieszka Jasik, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: agnieszka@piwet.pulawy.pl