

Chłoniak folikularny u psa. Opis przypadku

ALEKSANDRA PAWLAK, ADRIANA KRUPA**, WOJCIECH HILDEBRAND**,
BŁAŻEJ POŹNIAK, STANISŁAW DZIMIRA*

Zakład Farmakologii i Toksykologii Katedry Biochemii, Farmakologii i Toksykologii,

*Zakład Patomorfologii i Weterynarii Sądowej Katedry Patologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

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

Pawlak A., Krupa A., Hildebrand W., Poźniak B., Dzimira S.

Follicular lymphoma in a dog. Case report

Summary

Lymphoma is the most common hematopoietic neoplasm in dogs. It constitutes a heterogeneous group of cancers derived from lymphocytes at different stages of maturation. Follicular lymphoma is a low-grade cancer with benign clinical behavior, which arises from the neoplastic transformation and subsequent proliferation of B lymphocytes. This report describes a clinical case of follicular lymphoma diagnosed in a 6-year-old female Dalmatian. Diagnostic workup revealed an enlargement of the right submandibular lymph node without abnormalities in peripheral blood morphology and biochemistry, abdominal ultrasonography and thoracic radiography. The enlarged lymph node was surgically removed for histological and immunohistochemical evaluation. To determine the immunophenotype of neoplastic cells, flow cytometry analysis was carried out. On the basis of clinical and laboratory findings, follicular lymphoma stage I a (WHO classification) was diagnosed.

Keywords: dog, follicular lymphoma, diagnostic workup, therapy

Chłoniak (*lymphoma*) to jeden z najczęściej występujących złośliwych nowotworów układu hematopoetycznego u psów, u których może stanowić od 7% do 24% wszystkich nowotworów (11). Obejmuje on heterogenną grupę nowotworów wywodzących się z limfocytów znajdujących się na różnym etapie różnicowania, a miejscem powstania zmian mogą być właściwie wszystkie narządy i struktury organizmu, niezależnie od umiejscowienia pierwotnego procesu nowotworowego (5). W zależności od subpopulacji limfocytów, które uległy transformacji nowotworowej, według obecnie obowiązującej klasyfikacji WHO, dokonanej w oparciu o morfologię, immunofenotyp i towarzyszące zmiany genetyczne wyodrębniono trzy podstawowe grupy nowotworów limfocytarnych: chłoniaki z komórek B, chłoniaki z komórek T i NK oraz ziarnicę złośliwą (7).

Nowotwory o niskim stopniu złośliwości wywodzące się z układu limfatycznego, takie jak: chłoniak folikularny, chłoniak z komórek płaszczka czy chłoniak strefy brzeżnej, są stosunkowo rzadko diagnozowane u psów. Przyczyną problemów z postawieniem prawidłowego rozpoznania może być brak możliwości oceny struktury architektonicznej badanej tkanki (diagnozowanie tylko na podstawie biopsji cienkoigłowej)

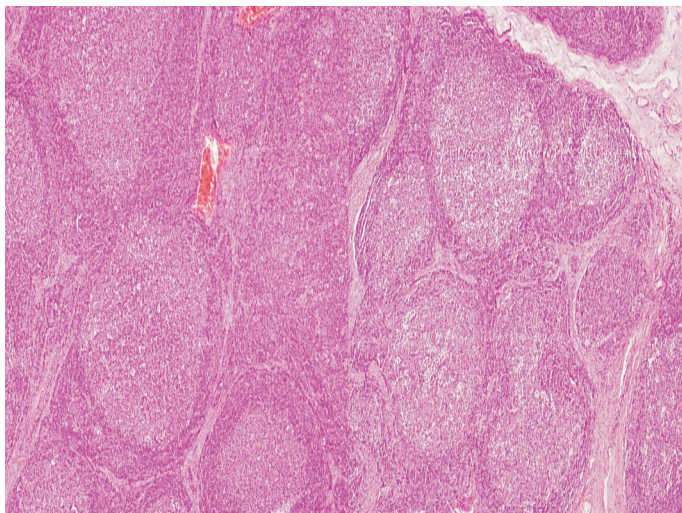
lub trudności w dostępie do specjalistycznych badań diagnostycznych umożliwiających ocenę immunofenotypu nowotworowo zmienionych komórek układu białokrwinkowego (2, 6, 12).

Chłoniak folikularny, zwany grudkowym (follicular lymphoma, FL), wywodzi się z limfocytów B i jest zwykle nowotworem o niskim stopniu złośliwości, charakteryzującym się powolnym rozwojem. Jego komórki naśladują prawidłowe komórki ośrodków rozmnażania, tworząc charakterystyczny grudkowy obraz chłoniaka (ryc. 1). Związany jest z wydłużonym czasem przeżycia komórek, a nie ich nadprodukcją. U ludzi wykazano, że ponad 90% przypadków chłoniaka grudkowego cechuje się nadekspresją białka BCL-2 hamującego apoptozę. Jednocześnie stwierdzono wiele przypadków ich transformacji w chłoniaki rozlane o wysokiej złośliwości. Pomimo wrażliwości na chemio- i radioterapię uzyskuje się tylko czasową remisję z wysokim ryzykiem nawrotu choroby (8).

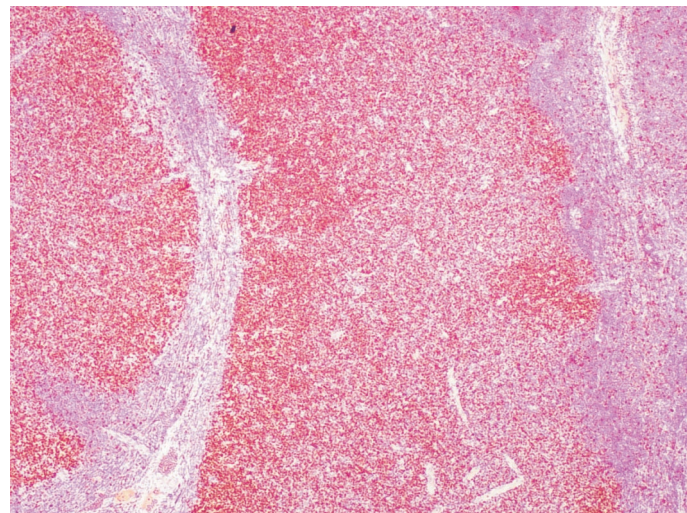
W niniejszym opracowaniu przedstawiono przypadek chłoniaka folikularnego u psa.

Opis przypadku

Do Przychodni przy Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów Uniwersytetu Przyrodnicze-



Ryc. 1. Chłoniak folikularny B-komórkowy – widoczne ośrodki rozmnażania przypominające grudki chłonne. HE, pow. 50 ×



Ryc. 2. Chłoniak folikularny B-komórkowy – widoczna intensywna reakcja z przeciwciałem anti CD79 α (DAKO), pow. 100 ×

go we Wrocławiu został skierowany pies rasy dalmatyńczyk, samica, w wieku 6 lat. Powodem konsultacji było zaobserwowane od około trzech miesięcy powiększenie prawego podżuchwowego węzła chłonnego. Pies był w bardzo dobrej kondycji i nie wykazywał żadnych innych objawów chorobowych. Pies do chwili konsultacji był leczony chemioterapeutykami przeciwbakteryjnymi, takimi jak enrofloksacyna (fluorochinolon) i cefaleksyna (antybiotyk β -laktamowy) oraz preparatem glikokortykosterydowym (deksametazon). Terapia jednak przynosiła tylko okresową i przejściową poprawę.

W przeprowadzonym badaniu klinicznym stwierdzono niebolesny, umiarkowanie powiększony prawy węzeł chłonny podżuchwowy. Pozostałe węzły chłonne obwodowe oraz migdałki były niepowiększone. W jamie ustnej stwierdzono obecność kamienia nazębnego. Temperatura ciała była prawidłowa, błony śluzowe różowe, a układy: oddechowy i krążenia w pełni wydolne, bez odchyień od normy. Brzuch był niebolesny i miękki.

Na podstawie przeprowadzonego wywiadu i badania klinicznego postawiono podejrzenie toczącego się u psa procesu limfoproliferacyjnego i zlecono wykonanie szeregu badań dodatkowych.

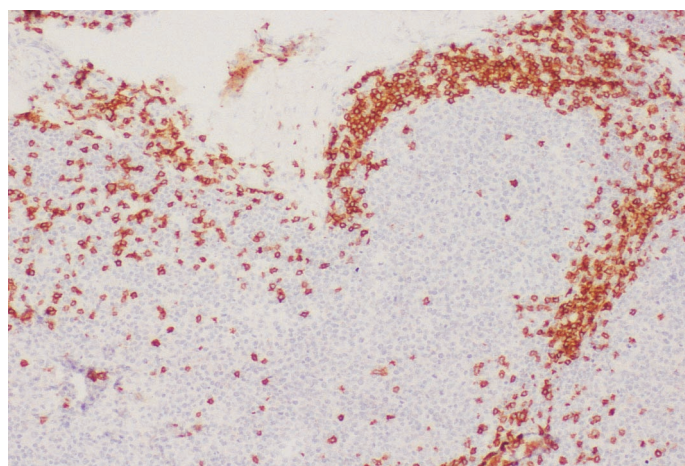
Celem oceny morfologii komórek zmienionego węzła chłonnego wykonano biopsję aspiracyjną cienkoigłową i pobrano materiał do badania cytopatologicznego.

Badanie to wykazało obecność atypowych, zarówno małych, jak i dużych limfocytów, o niskim indeksie mitotycznym. Ocena cytopatologiczna preparatu okazała się niewystarczająca do postawienia pewnego rozpoznania, dlatego zdecydowano się na chirurgiczne usunięcie węzła chłonnego w celu wykonania badania histopatologicznego.

Usunięty węzeł chłonny utrwalono w 4% roztworze zbuforowanej formaliny, zatopiono w parafinowe bloczki i krojono na skrawki o grubości 4 μ m, które barwiono rutynową metodą hematoksylina-eozyna. Badanie mikroskopowe preparatów wykazało liczne centrocyty i centroblasty w układzie imitującym budowę prawidłowych grudek chłonnych, nieliczne figury mitotyczne oraz brak naciekania łącznotkankowej torebki węzła chłonnego (ryc. 1). Do-

datkowo wykonano badanie immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał anti CD79 α (Monoclonal Mouse Anti Human CD79 α , DAKO) i anti CD3 (Rabbit Anti Human CD3, DAKO) reagujących krzyżowo z tkankami psa. Badanie to wykazało wyraźną błonowo cytoplazmatyczną dyfuzyjną reakcją komórek linii B w centrum grudek (ryc. 2) oraz podobnie wyraźną reakcją komórek leżących na obwodzie grudek komórek linii T (ryc. 3).

Immunofenotypowanie limfocytów zostało wykonane poprzez stwierdzenie obecności antygenów CD (cluster of differentiation) na powierzchni i wewnątrz badanych komórek metodą cytometrii przepływowej. Do badania użyto swoistych dla psa (lub o potwierdzonej reakcji krzyżowej) przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko CD3 (Mouse Anti Dog CD3:FITC, AbD Serotec), CD4 (Anti Dog CD4:RPE, AbD Serotec), CD5 (Rat Anti Dog CD5:Alexa Fluor[®] 647, AbD Serotec), CD8 (Anti Dog CD8:AlexaFluor[®] 647, AbD Serotec), CD21 (Mouse Anti Canine CD21:Alexa Fluor[®] 647, AbD Serotec), MHC II (Rat Anti Dog MHC Class II Monomorphic:FITC, AbD Serotec), CD45R (Rat Anti Dog CD45R:RPE, AbD Sero-



Ryc. 3. Chłoniak folikularny B-komórkowy – widoczna intensywna reakcja z przeciwciałem anti CD3 (DAKO) komórek leżących na obwodzie grudek, pow. 100 ×

tec), CD34 (Mouse Anti Dog CD34:RPE, AbD Serotec), CD14 (Mouse Anti HUMAN CD14:Alexa Fluor® 647, Serotec) (antygeny powierzchniowe) oraz CD79 α (Monoclonal Mouse Anti Human CD79 α :RPE, DAKO) i cCD3 (Mouse Anti Dog CD3:FITC, AbD Serotec) (antygeny cytoplazmatyczne). Zawiesinę badanych komórek w PBS w ilości 1×10^6 rozdzielano do probówek cytometrycznych Falcon (USA) i inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami, zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta przeciwciał. Dla każdego przeciwciała wykonana została odpowiednia kontrola izotopowa. Analizę immunofenotypu wykonano przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton Dickinson), a wyniki opracowane zostały w programie CellQuest. Na podstawie otrzymanych wyników określono immunofenotyp badanych komórek jako charakterystyczny dla komórek linii B (CD21, MHCII, CD45R, CD79 α).

W celu określenia stadium klinicznego zaawansowania choroby wykonano: badanie morfologiczne i biochemiczne krwi, badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej oraz badanie RTG klatki piersiowej w trzech projekcjach.

Parametry badania morfologicznego i biochemicznego krwi mieściły się w zakresach wartości referencyjnych.

W badaniu ultrasonograficznym jamy brzusznej nie stwierdzono cech limfadenopatii, wielkość śledziony oraz jej echostrukturę określono jako prawidłowe, nie stwierdzono także zmian w obrębie wątroby i nerek. Wykonane przeglądowe badanie RTG klatki piersiowej nie wykazało zmian patologicznych w obrębie płuc, serca oraz w śródpiersiowych węzłach chłonnych.

Na podstawie wywiadu oraz wyników wykonanych badań postawiono rozpoznanie: stadium kliniczne I a chłoniaka folikularnego (wg klasyfikacji WHO).

Ze względu na brak zmian w wynikach wykonanych badań dodatkowych oraz stale utrzymujące się bardzo dobre samopoczucie psa, poza chirurgicznym usunięciem zmienionego węzła chłonnego nie zastosowano żadnego protokołu leczenia w opisanym przypadku. Zalecono regularne kontrole kliniczne.

Omówienie

Chłoniaki występujące u psów stanowią heterogenną grupę nowotworów, w której efekt terapeutyczny ściśle zależy od typu występującego nowotworu (subpopulacji limfocytów, z których się wywodzi i stopnia złośliwości), stopnia zaawansowania objawów klinicznych oraz osobniczych właściwości chorego zwierzęcia. Z tego powodu możliwie szczegółowe określenie typu komórek nowotworowych odgrywa kluczową rolę w prognozowaniu i wyborze odpowiedniego protokołu leczenia (10). Z badań klinicznych wynika, że psy ze zdiagnozowanym chłoniakiem T-komórkowym gorzej rokują i słabiej odpowiadają na leczenie niż psy z chłoniakiem B-komórkowym (13).

Chłoniak folikularny jest nowotworem wywodzącym się z komórek linii B, który charakteryzuje się łagodnym i powolnym, choć bardzo zróżnicowanym przebiegiem klinicznym, co najprawdopodobniej od-

zwierciedla złożoną i nie do końca jeszcze poznaną patofizjologię tego nowotworu (1). Choroba rozwija się zwykle kilka miesięcy, a jedynym zauważalnym objawem może być niebolesne powiększenie jednego lub kilku obwodowych węzłów chłonnych.

Pierwszym krokiem do wdrożenia prawidłowej terapii jest możliwie szczegółowe określenie typu nowotworu oraz stadium klinicznego zaawansowania choroby. Chłoniaki o niskim stopniu złośliwości u psów są diagnozowane stosunkowo rzadko. Wynika to nie z niskiej częstotliwości występowania tych schorzeń u psów, a prawdopodobnie z niewłaściwie prowadzonej diagnostyki. Obecnie, poza rutynowym badaniem klinicznym, przeglądowym badaniem krwi, badaniami obrazowymi jamy brzusznej i klatki piersiowej, prawidłowe postępowanie diagnostyczne w przypadku chłoniaka u psa powinno uwzględniać także ocenę cytopatologiczną i/lub histopatologiczną zmienionego węzła chłonnego (pozwalającą na ocenę stosunków topograficznych badanej tkanki) oraz badanie immunofenotypu komórek. Badanie histopatologiczne powinno być wykonane zawsze, gdy postawienie rozpoznania nie jest możliwe w oparciu o ocenę cytopatologiczną materiału uzyskanego drogą biopsji cienkoigłowej. Pomocne może być także wykonanie oznaczeń immunohistochemicznych pozwalających na uwidocznienie badanych markerów komórkowych na nowotworowo transformowanych limfocytach.

W celu ustalenia stopnia zaawansowania klinicznego choroby należy, jeśli stwierdzone są zmiany hematologiczne we krwi obwodowej, wykonać także biopsję szpiku kostnego (ocena zarówno morfologii, jak i immunofenotypu komórek).

Główną metodą określania populacji komórek immunologicznych, z których wywodzi się nowotwór, jest cytometria przepływowa, a zasadność jej stosowania do określania immunofenotypu komórek potwierdzono zarówno u psów, jak i u ludzi (3).

W diagnostyce różnicowej procesów chorobowych przebiegających z limfadenopatią węzłów chłonnych należy uwzględnić przede wszystkim inne procesy nowotworowe układu krwiotwórczego (białaczka, zaburzenia histiocytarne), choroby o podłożu immunologicznym, uogólnione infekcje (bakteryjne, wirusowe, grzybicze) oraz choroby zakaźne, których wektorami są kleszcze (np. borelioza, anaplazmoza). Węzły chłonne mogą być także wtórnie zajęte na skutek przerzutów z pierwotnych ognisk nowotworowych. Należy mieć na uwadze również inne choroby, np. leiszmaniozę, które choć nie występują endemicznie w naszym kraju, to ze względu na coraz bardziej popularne podróże do krajów tropikalnych ze zwierzętami, ryzyko ich pojawienia się stale wzrasta.

Rodzaj stosowanej terapii w medycynie człowieka zależy ściśle od typu chłoniaka oraz populacji tworzących go komórek. Istniejące podobieństwo pomiędzy postaciami chłoniaka o niskim stopniu złośliwości

u psów a wywodzącymi się z komórek B nowotworami o niskim stopniu złośliwości u ludzi wskazuje na zasadność zastosowania podobnych schematów leczenia także u psów (4, 9). W terapii chłoniaka folikularnego u psów znalazły zastosowanie m.in.: niskodawkowa lokalna radioterapia, chemioterapia w postaci schematów jedno- lub wielolekowych, np. CHOP (winkrystyna, cyklofosfamid, doksorubicyna i prednizon/prednizolon). U niektórych pacjentów obserwuje się długotrwałą stabilizację choroby pomimo braku stosowanego leczenia.

Podsumowanie

W opisanym przypadku chłoniaka folikularnego u psa postawienie prawidłowej diagnozy było możliwe na podstawie informacji uzyskanych z wywiadu, badania klinicznego oraz badań dodatkowych: badania morfologicznego i biochemicznego krwi, badania histopatologicznego i immunohistochemicznego usuniętego węzła chłonnego oraz cytometrycznej oceny immunofenotypu obecnych w nim komórek. Wykonano także badania obrazowe, takie jak: ultrasonograficzne jamy brzusznej i radiologiczne klatki piersiowej. Biorąc pod uwagę niski stopień złośliwości zdiagnozowanego nowotworu oraz brak występowania jakichkolwiek innych objawów chorobowych, zalecono regularne kontrole stanu klinicznego psa. Ze względu na ryzyko transformacji chłoniaka folikularnego w bardziej agresywną postać, nie wyklucza się jednak konieczności wdrożenia odpowiedniej terapii (chemio- lub radioterapii) w późniejszym okresie.

Piśmiennictwo

1. *Benandi M.*: Aiming at a Curative Strategy for Follicular Lymphoma. *CA Cancer J. Clin.* 2008, 58, 305-317.
2. *Boyce K. L., Kitchell B. E.*: Treatment of canine lymphoma with COPLA/LVP. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2000, 36, 395-403.
3. *Culmsee K., Simon D., Mischke R., Nolte I.*: Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma. *J. Vet. Med. Ser. A.* 2001, 48, 199-206.
4. *Fredrickson T. N., Lennert K., Chattopadhyay S. K., Morse H. C. III, Hartley J. W.*: Splenic marginal zone lymphomas of mice. *Am. J. Pathol.* 1999, 154, 805-812.
5. *Gauthier M. J., Aubert I., Abrams-Ogg A., Woods J. P., Bienzle B.*: The immunophenotype of Peripheral Blood Lymphocytes in Clinically Healthy Dogs and Dogs with Lymphoma in Remission. *J. Vet. Int. Med.* 2005, 19, 2, 193-199.
6. *Hahn K. A., Richardson R. C., Hahn E. A., Chrisman C. L.*: Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberration identified in 61 dogs with lymphosarcoma. *Vet. Pathol.* 1994, 31, 528-540.
7. *Mack G. S.*: Cancers research ushers in dog days medicine. *Nat. Med.* 2005, 11, 1018.
8. *Marin G. H., Dal Cortivo L., Cayuela J. M., Marolleau J. P., Pautier P., Cojean-Zelek I., Brice P., Makke J., Benbunan M., Gisselbrecht C.*: Peripheral blood stem cell CD34+ autologous transplant in relapsed follicular lymphoma. *Hematol. Cell. Ther.* 1997, 39, 33-40.
9. *Rassnick K. M., Mauldin G. E., Al-Sarraf R., Mauldin G. N., Moore A. S., Mooney S. C.*: MOPP chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs: a retrospective study of 117 cases (1989-2000). *J. Vet. Intern. Med.* 2002, 16, 576-580.
10. *Sozmen M., Tasca S., Carli E., De Lorenzi D., Furlanello T., Caldin M.*: Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification and immunophenotyping of canine lymphomas. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005, 17, 323-329.
11. *Vail D. M., MacEwen E. G.*: Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest.* 2000, 18, 781-792.
12. *Valli V. E., Vernau W., de Lorimieri L.-P., Graham P. S., Moore P. F.*: Canine Indolent Nodular Lymphoma. *Vet. Pathol.* 2006, 43, 241-256.
13. *Wilkerson M. J., Dolce K., Koopman T., Shuman W., Chun R., Garrett L., Barber L., Avery A.*: Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemia and aberrant expression of CD molecules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005, 106, 179-196.

Adres autora: lek. wet. Aleksandra Pawlak, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław; e-mail: aleksandra.pawlak@up.wroc.pl