

Razlikovanje alimentarnog limfoma od upalne bolesti crijeva te utjecaj pasmine i dobi na pojavnost patoloških promjena u probavnom sustavu pasa

A. Piplica, S. Menčík, A. Gudan Kurilj, B. Artuković, L. Medven Zagradišnik i M. Hohšteter*



Sažetak

Cilj ovog rada bio je istražiti korisnost uporabe imunohistokemijske metode (IHK) zajedno s histopatološkom pretragom u dijagnosticiranju i razlikovanju alimentarnog limfoma (AL) od upalne bolesti crijeva (UBC). U istraživanju su korišteni arhivski histopatološki nalazi i preparati tkiva, parafinski blokovi i stakalca. Prema pripadnosti pasmina podijelili u tri skupine malu, srednju ili veliku skupinu pasa. Cilj istraživanja bio je utvrditi povezanost pojedinih patoloških promjena ovisno o skupini pasa, dobi i spolu. Obavljenim istraživanjem zabilježili smo da je srednja vrijednost dobi u skupini malih pasmina pasa iznosila $7,58 \pm 3,59$ godina, u skupini srednjih pasmina $7,45 \pm 3,04$ godina te u skupini velikih pasmina $6,58 \pm 3,47$ godina. Prosječna dob pasa oboljelih od alimentarnog limfoma iznosila je 8,8 godina, za razliku od upalne bolesti crijeva gdje je izno-

sila 7,0 godina. Unutar sve tri skupine pasa zabilježen je veći broj jedinki muškog spola. Najveći udio biopsiranih uzoraka (70,73 %) analiziran je iz tkiva tankog crijeva; po 8 uzoraka (27,59 %) iz male skupine pasa, 11 uzoraka iz srednje skupine (37,93 %) te po 10 uzoraka iz velike skupine pasa (34,48 %). Udio biopsiranog tkiva želuca bio je nešto niži (24,39 %) dok je tkivo debelog crijeva uzorkovano u samo dva psa (4,88 %). Histopatološkom analizom utvrđeno je 16 slučajeva upalne bolesti crijeva (45,71 %), 7 slučajeva limfoma (20,00 %), 9 slučajeva suspektne upale (25,71 %) te 3 slučaja suspektne upale/limfoma (8,58 %). Nakon provedene IHK metode ustanovljeno je da je u 6 slučajeva dijagnoza donesena histopatološkom evaluacijom potvrđena, u 5 slučajeva je opovrgnuta dok je u 5 slučajeva IHK metoda bila korisna kako bi razlučili AL od

Aneta PIPLICA, dr. med. vet., asistentica, dr. sc. Sven MENČIK, dr. med. vet., docent, dr. sc. Andrea GUDAN KURILJ, dr. med. vet., DECVP, izvanredna profesorica, dr. sc. Branka ARTUKOVIĆ, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Lidija MEDVEN ZAGRADIŠNIK, dr. med. vet., viša asistentica, dr. sc. Marko HOHŠTETER*, dr. med. vet., izvanredni profesor, (dopisni autor, e-mail: marko.hohsteter@vef.hr), Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

UBC. Utvrđene su značajne razlike ($P < 0,05$) između dijagnoze upalne bolesti crijeva te limfoma ustanovljene patohistološkom pretragom te imunohistokemijskom metodom. Ustanovljena je češća pojavnost T staničnog limfoma u tankom crijevu dok je pojavnost B staničnog limfoma učestalija u želudcu. Povezanost s tendencijom učinka zabilježena je između patohistološke dijagnoze i CD3 biljega ($r = -0,34$; $P = 0,08$) odnosno između

patohistološke dijagnoze i CD79 biljega ($r = 0,36$; $P = 0,09$) s nešto nižom razinom povezanosti između patohistološke dijagnoze i dijagnoze IHK ($r = 0,21$; $P = 0,34$). Na temelju rezultata našeg istraživanja može se zaključiti da je imunohistokemijska metoda korisna za potvrdu dijagnoze i razlikovanje alimentarnog limfoma i upalne bolesti crijeva.

Ključne riječi: pas, retrospektivna analiza, alimentarni limfom, upalna bolest crijeva

Uvod

Alimentarni limfom i upalna bolest crijeva kod pasa specifični su poremećaji probavnog sustava koji prouzroče perzistentne ili intermitentne gastrointestinalne simptome (Hall, 2009., Day, 2013., Howard, 2017.). Obje se bolesti pojavljuju sa sličnim kliničkim znacima te ih je ponekad dijagnostički teško razlikovati. Međutim, međusobno se bolesti razlikuju u terapiji, prognozi te konačnom ishodu (Williard, 2012., Arslan i Kulluk, 2017.). Alimentarni limfom (engl. *Gastrointestinal Lymphoma, GL*) zahvaća donji dio probavnog sustava te ga obilježava infiltracija neoplastičnih limfocita u stijenci želuca i crijeva (Geiger, 2011.) dok upalna bolest crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Disease, IBD*) najčešće zahvaća završni dio tankog crijeva i debelo crijevo te je obilježava upalni proces i oštećenja na sluznici crijeva (Wasbau i sur., 2010.).

Za razliku od alimentarnog limfoma upalna bolest crijeva u pasa predstavlja idiopatski tip oboljenja, a mnogobrojni čimbenici koji pogoduju nastanku još uvijek se istražuju (Day, 2013.). U literaturi se najčešće navodi kako su genetska predispozicija i crijevna mikroflore među najznačajnijim čimbenicima koji su ključni za razvoj oboljenja. Prema zahvaćenosti dijela tankog i/ili debelog crijeva te histološkim varijacijama, odnosno tipu upalnog staničnog infiltrata radi se o sku-

pini poremećaja, a ne o jedinstvenoj bolesti (Jović i sur., 2015.). Cerquetella i sur. (2010.) navode da se poremećaji u biokemijskim aktivnostima i imunološkom sustavu smatraju okidačem u razvoju promijenjenog odgovora na antigene u lumenu crijeva na koje inače postoji tolerancija. Uz gubitak tolerancije na antigene, hrana i poremećaji homeostaze crijevnih mikroflora jedan su od najviše istraživanih i promatranih čimbenika za razvoj kronične upale crijeva. Istoimeni autori u istraživanju navode da se nakon prepoznavanja antigena razvija upalni odgovor te u sluznici crijeva dolazi primarno do infiltracije neutrofila, a nakon ekspresije određenih receptora i aktivacije različitih citokina i do infiltracije sluznice staničnim infiltratom karakterističnim za pojedini tip upalne bolesti crijeva. De Lange i Barrett (2015.) opisuju da promjene u imunom sustavu crijevnih sluznica te imunološkom odgovoru na crijevnju mikrofloru dugoročno dovode do oštećenja i morfoloških promjena u histološkoj građi stijenke crijeva. Prema Briscoe i sur. (2011.) alimentarni limfom infiltrira laminu propriju i submukozu s pojavom površinskih ulcera i transmuralne infiltracije kroz serozu stijenke crijeva.

Imunohistokemijska pretraga (IHK) jedna je od najčešće korištenih metoda u dijagnostici alimentarnog limfoma i

upalne bolesti crijeva za prepoznavanje određenih proteina u tkivima. Temelji se na imunološkoj reakciji vezivanja određenog protutijela i ciljnog antigena (Coons i sur., 1941.). U tu svrhu koriste se monoklona i poliklona protutijela koja predstavljaju produkt jedne identične vrste limfatičnih stanica, odnosno više vrsta limfatičnih stanica za otkrivanje određenih antigena te njihovu rasprostranjenost u tkivu (Chetty i Gatter, 1994., Vukoja i sur., 2017.). Posebnu ulogu ima u dijagnostici neoplastičnih procesa kod kojih dolazi do pojačane ekspresije staničnih proteina u stanicama i tkivima (Duraiyan i sur., 2012.). Kao protutijela za otkrivanje određenih proteina u IHK metodi koriste se CD biljezi (engl. *Cluster of differentiation*, CD), diferencijacijski biljezi koji pripadaju skupini imunoglobulinskih molekula, tj. plazma stanicama. To su specifične stanične molekule smještene na membrani i u citoplazmi stanica te im je uloga stanična signalizacija (Day i Schultz, 2013.). Među najčešće korištene biomarkere u dijagnostici i istraživanju leukemija i limfoma ubrajamo biljege: CD3, CD20 i CD79a i CD79b. Do ekspresije CD biljega dolazi u interakciji s T i B limfocitima u tkivu formirajući kompleks s receptorima smještenim na membrani limfatičnih stanica (engl. *T-cell receptor*, TCR i *B-cell receptor*, BCR) što omogućava vizualizaciju njihove raspodjele u tkivima (Vukoja i sur., 2017.). Ekspresija ovih biljega prisutna je u svim stadijima stanične diferencijacije limfatičnih stanica u fiziološkim uvjetima organizma, dok se kod neoplastičnih promjena njihova količina znatno povisuje te predstavljaju koristan pokazatelj pogotovo u dijagnostici i prognozi leukemija i limfoma (Pillozzi i sur., 1988.). Uporaba ovih biljega omogućava nam utvrditi podrijetlo imunskih stanica i patološke promjene zahvaćenog tkiva (Duraiyan i sur., 2012.).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ekspresiju imunohistokemijskih biljega

CD3 i CD79 i njihovu raspodjelu u tkivu te na temelju patohistološke pretrage i imunohistokemijske metode diferencijalno dijagnostički razlikovati alimentarni limfom od upalne bolesti crijeva. Nadalje, na temelju dobivenih rezultata povezati učestalost patohistoloških promjena u različitim pasmina, odnosno kategorija pasa prema dobi i spolu.

Materijali i metode

U istraživanju su korišteni histopatološki nalazi, parafinski blokovi i histopatološki preparati tkiva želuca i crijeva iz arhive Zavoda za veterinarsku patologiju uzorkovani prilikom rutinskih obdukcija pasa i biopsati istih tkiva dostavljeni sa klinika Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i privatnih veterinarskih ambulanti prikupljenih u razdoblju od 1. 1. 2009. do 30. 6. 2018. godine. Biopsati uzorkovani od živih životinja dijelom su dobiveni metodom endoskopske biopsije, a dijelom dijagnostičke laparotomije prilikom koje su uzeti uzorci crijeva punog presjeka (engl. *full thickness*). Na temelju anamnestičkih podataka svi psi pokazivali su kliničke znakove oboljenja probavnog sustava. Nadalje, u istraživanje su uključeni uzorci želuca, tankog i debelog crijeva obojeni hematoksilin-eozinom (HE) kod kojih je mikroskopski utvrđena infiltracija limfocita i plazma stanica, eozinofila, eritrocita, edem i proraštenost vezivnim tkivom. U istraživanje je bilo uključeno 35 pasa, odnosno njihovi uzorci: želuca, tankog i debelog crijeva pregledani su histopatološkom metodom, dok su uzorci za 16 pasa iz broja istraživanih jedinki pregledani histopatološkom pretragom i imunohistokemijskom metodom. U pojedinim životinja istovremeno su za pretragu uzeti uzorci želuca i crijeva što čini ukupan broj od 41. uzorka (Tabela 2.).

Histopatološki uzorci dobiveni su postupkom fiksacije tkiva u 10 %-tnom

formalinu te su uklopljeni u parafinske blokove. Pomoću mikrotoma izrezani su presjeci debljine 5 μ m te su obojeni HE. Kako bi se identificirale tkivne komponente u interakciji ciljnih antigena sa specifičnim antitijelima označenim vidljivom oznakom proveo se postupak IHK metode. Imunohistokemijski biljeg CD20 također predstavlja pokazatelj za raspodjelu B limfatičnih stanica, međutim u ovom istraživanju je korišten biljeg CD79 iz razloga što je njime moguće ustanoviti i nezrele B limfatične stanice te time dobiti vjerodostojnije rezultate. U istraživanju su korištena dva protutijela CD3 Clone F7.2.38. (Monoclonal Mouse Anti-Human Dako) REALTM i CD79 ac γ /RPE Clone HM57 (Monoclonal Mouse Anti-Human Dako). Od ostalih reagensa korišteni su Dako REALTM EnVisionTM HRP *rabbit/mouse* (ENV), K5007, pufer Tris-EDTA, pH 9, Dako Wash Buffer, S3006 i Dako Retrieval Solutions, S2367.

Proveden je postupak deparafinizacije u kojem su preparati potopljani dva puta u otopinu ksilena u trajanju od 5 minuta i zatim postupak rehidracije u kojem su preparati potopljani u apsolutni alkohol tri puta zaredom u trajanju od 3 minute, potom u 70 %-tni alkohol također tri puta u trajanju od 3 minute sa završnim potapanjem uzoraka u otopinu destilirane vode. Zatim je slijedila predigestija tkiva te su uzorci prokuhani u citratnom puferu u mikrovalnoj pećnici u trajanju od 20 minuta i postupno su ohlađeni na sobnu temperaturu. Po hlađenju uzorci su tretirani otopinom peroksidaze (Dako REALTM, Peroxidase-Bloking Solution S2023) u trajanju od 5 minuta u cilju inaktivacije endogenih peroksidaza. Preparati su isprani puferom i stavljani u automatizirani uređaj DAKO Autostainer Plus u kojem se provodi inkubacija sa željenim protutijelima i supstratom za bojenje. Protokol uključuje inkubaciju s primarnim protutijelom CD3 Clone F7.2.38. u razrjeđenju 1:50 u trajanju od

30 minuta, ispiranje puferom i inkubaciju s primarnim protutijelom CD79ac γ /RPE Clone HM57 u razrjeđenju 1:50 također u trajanju od 30 minuta. Nakon inkubacije s primarnim protutijelima provedeno je ispiranje puferom, tretiranje sa sekundarnim protutijelima i bojenje, odnosno inkubacija sa supstratom DAB+ Chromogen (Dako REALTM) u trajanju od 10 minuta. Po završetku inkubacije s protutijelima i supstratom provedeno je završno ispiranje histoloških preparata u destiliranoj vodi i bojenje HE te ponovno ispiranje preparata destiliranom vodom.

Nakon imunohistokemijskog bojanja za procjenu reakcije korišten je svjetlosni mikroskop Nikon 2000 Eclipse. Na temelju karakterističnog obojenja i raspodjele limfatičnih stanica određen je postotak pozitivnih stanica na svaki od biljega. U slučaju da je 80 % i više limfatičnih stanica u pretraživanom tkivu bilo pozitivno na jedan od biljega, takva patološka promjena je svrstana pod dijagnozu alimentarnog limfoma, a ovisno o ekspresiji biljega, CD3, odnosno CD79, u skupinu T ili B staničnog limfoma. U pretraživanim tkivima u kojima je postotak pozitivnih stanica bio 79 % i niži, patološka promjena je svrstana pod dijagnozu upalne bolesti crijeva. Pomoću IHK i na temelju dobivenih rezultata promatrali smo korelaciju ekspresije pojedinih biljega s određenim patološkim promjenama.

Statistička analiza

Obrađena prikupljenih podataka provedena je statističkim programom Statistica v.14.4. (StatSoft, USA, 2017.). Na temelju uvida u kartice pacijenata pasa provedena je deskriptivna statistička analiza podataka za 35 pasa. Deskriptivnu statističku analizu podataka proveli smo prema pasmini, odnosno kategoriji pasa i biopsiranom tkivu. Odstupanje opaženih od teoretski očekivanih učestalosti provjereno je hi-kvadrat testom (χ^2 -

test). Povezanost između patohistološke dijagnoze i dijagnoze IHK izračunata je Pearsonovim koeficijentom korelacije. Značajnost razlika između istraživanih obilježja promatrana je na razini od $P < 0,05$.

Rezultati

Prosječna dob pasa u istraživanju iznosila je $7,20 \pm 3,42$ godine s rasponom od 1 – 15 godina. Pse smo prema kategorizaciji pasmine u analizi podijelili u tri skupine uzimajući u obzir FCI metodologiju u malu, srednju i veliku skupinu pasa. Srednja vrijednost dobi u skupini malih pasmina pasa iznosila je $7,58 \pm 3,59$ godina s rasponom od 2 – 15 godina, u skupini srednjih pasmina $7,45 \pm 3,04$ godina s rasponom od 1 – 11 godina te u skupini velikih pasmina $6,58 \pm 3,47$ godina s rasponom od 4 – 9 godina. Prosječna dob pasa oboljelih od alimentarnog limfoma iznosila je 8,8 godina, za razliku od upalne bolesti crijeva gdje je iznosila 7,0 godina. Ukupan broj muških jedinki zabilježen u istraživanju iznosio je 26

(74,28 %), a ženskih jedinki 9 (25,72 %). Nadalje, pse smo podijelili prema spolu u tri skupine. Unutar skupine malih pasmina zabilježili smo 7 jedinki muškog spola (26,92 %) i 5 jedinki ženskog spola (55,55 %), unutar skupine srednjih pasmina 10 jedinki muškog spola (38,46 %) te samo jednu jedinku ženskog spola (11,11 %) dok smo unutar skupine velikih pasmina pasa zabilježili 9 životinja muškog (34,61 %), odnosno 3 jedinke ženskog spola (33,33 %) (Tabela 1.).

Najveći udio biopsiranih uzoraka (70,73 %) analiziran je iz tkiva tankog crijeva: po 8 uzoraka (27,59 %) iz male skupine pasa, 11 uzoraka iz srednje skupine (37,93 %) te po 10 uzoraka iz velike skupine (34,48 %) pasa s prosječnom starosnom dobi $7,62 \pm 3,13$ godina. Udio biopsiranog tkiva želudca bio je nešto niži (24,39 %) s prosječnom starosti pasa $7,70 \pm 3,68$ godina dok je tkivo debelog crijeva uzorkovano samo u dva psa prosječne starosti $5,00 \pm 5,65$ godina (Tabela 2.).

Histopatološkom analizom ustanovljeno je 16 slučajeva upalne bolesti crijeva

Tabela 1. Deskriptivna statistička analiza uzorka prema dobi, spolu i skupini pasmine pasa

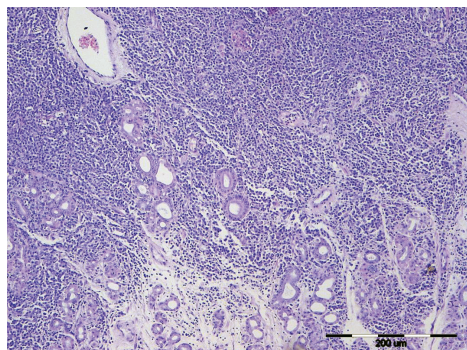
Svojstvo	$\bar{x} \pm SD$	(min – max)	Interkvartilni raspon	CV (%)
Dob ($n=35$)	$7,20 \pm 3,42$	1,0 – 15,0		
Dob po skupinama pasa				
Male ($n=12$)	$7,58 \pm 3,59$	2,0 – 15,0	5,0 – 9,5	51,36 %
Srednje ($n=11$)	$7,45 \pm 3,04$	1,0 – 11,0	6,0 – 10,0	40,89 %
Velike ($n=12$)	$6,58 \pm 3,47$	4,0 – 9,0	4,0 – 9,0	52,80 %
Spol po skupinama	Muški (n)	Ženski (n)	Muški (%)	Ženski (%)
	26	9	74,28	25,72
Male	7	5	26,92	55,55
Srednje	10	1	38,46	11,11
Velike	9	3	34,61	33,33

n – broj životinja; $\bar{x} \pm SD$ – srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; CV – koeficijent varijacije

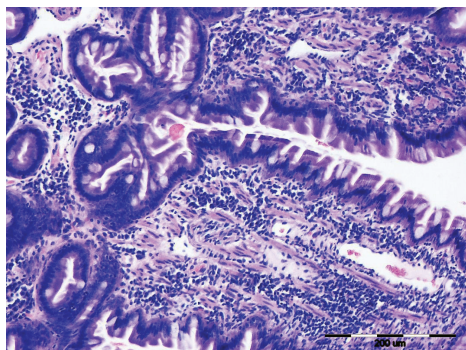
Tabela 2. Prikaz pasmine prema udjelu uzorkovanog tkiva, dobi i skupini pasa

	Pasmina	Dob (god.)	Skupina (M – S – V)
T.C.	Pudl	8	M
	Križanac	3	S
	Bernski planinski pas	9	V
	Zapadnoškotski bijeli terijer	10	S
	Labrador retriever	1	V
	Bigl	1	S
	Velški terijer	8	S
	Njemački ovčar	7	V
	Patuljasti pudl	11	M
	Patuljasti pudl	6	M
	Zlatni retriever	9	V
	Patuljasti pudl	8	M
	Križanac	8	M
	Labrador retriever	5	V
	Križanac	8	S
	Križanac	8	S
	Belgijski ovčar	8	V
	Talijanski mastif	3	V
	Američki stafordski terijer	6	V
	Križanac	15	M
	Križanac	7	M
	Njemački kratkodlaki ptičar	9	S
	Irski plavi terijer	11	S
	Križanac	6	S
	Engleski buldog	6	S
	Samojed	10	V
	Malteški psić	13	M
	Križanac	8	S
	Zlatni retriever	9	V
	Ukupni udio pasa po biopsiranom tkivu n=29/41 (70,73 %)	$\bar{x} \pm SD$ 7,62 $\pm$ 3,13	M=8 (27,59 %) S=11 (37,93 %) V=10 (34,48 %)
Ž.	Križanac	8	S
	Patuljasti pudl	2	M
	Križanac	8	S
	Patuljasti šnauzer	3	M
	Križanac	8	S
	Samojed	12	V
	Zlatni retriever	9	V
	Malteški psić	13	M
	Samojed	10	V
	Križanac	4	M
	Ukupni udio pasa po biopsiranom tkivu n=10/41 (24,39 %)	$\bar{x} \pm SD$ 7,70 $\pm$ 3,68	M=4 (40,00 %) S= 3 (30,00 %) V=3 (20,00 %)
D.C.	Njemački ovčar	1	V
	Gordon seter	9	V
	Ukupni udio pasa po biopsiranom tkivu n=2/41 (4,88 %)	$\bar{x} \pm SD$ 5,00 $\pm$ 5,65 %	V=2 (100,00 %)

n – broj analiziranih tkiva; $\bar{x} \pm SD$ – srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; M – skupina malih pasmina pasa; S – skupina srednjih pasmina pasa; V – skupina velikih pasmina pasa; T.C. – tanko crijevo; Ž – želudac; D.C. – debelo crijevo



Slika 1. Histopatološki prikaz limfoma želuca psa. Uočava se proliferacija istovrsne populacije malih do srednje velikih limfocita u epitelu želučane stijenke s infiltracijom u vezivno tkivo. Obojano HE, promatrano svjetlosnim mikroskopom, povećanje 10 x.

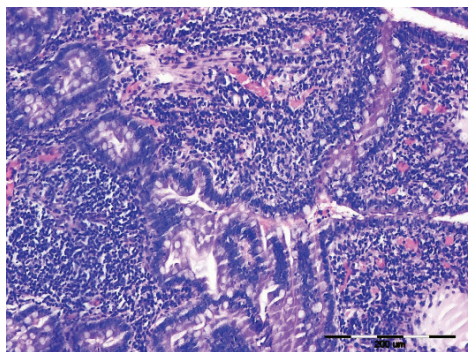


Slika 2. Histopatološki prikaz upalne bolesti crijeva u duodenumu psa u kojem se uočava nakupljanje upalnog staničnog infiltrata i eritrocita te edem u crijevnim resicama. Obojano HE, promatrano svjetlosnim mikroskopom, povećanje 20 x.

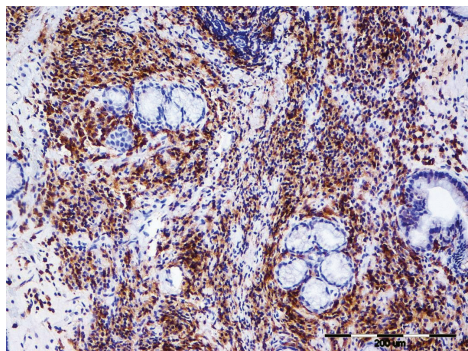
Tabela 3. Prikaz patoloških promjena i vrste uzorkovanog tkiva prema pasminama pasa čiji su uzorci podvrgnuti histopatološkoj i imunohistokemijskoj pretrazi te imunofenotipska pripadnost

Pasmina	Uzorak	Dijagnoza HE	Dijagnoza HE+IHK	Imunofenotip		Rezultati
njemački ovčar	K	upala	limfom	CD3(+)	CD79(-)	-/+
križanac	Ž	upala	upala	CD3(+)	CD79(-)	+/-
	D	upala		CD3(+)	CD79(-)	
križanac	Ž	upala	limfom	CD3(+)	CD79(-)	-/+
	D	upala		CD3(+)	CD79(-)	
patuljasti pudl	D	upala	limfom	CD3(+)	CD79(-)	-/+
bernski planinski pas	J	upala	limfom	CD3(+)	CD79(-)	-/+
patuljasti pudl	Ž	upala	upala	CD3(+)	CD79(+)	+/-
križanac	Ž	upala	upala	CD3(+)	CD79(-)	+/-
	D			CD3(+)	CD79(-)	
križanac	D	upala	upala	CD3(+)	CD79(-)	+/-
zapadnoškotski terijer	D	upala	limfom	CD3(-)	CD79(+)	-/+
patuljasti šnauzer	Ž	limfom	limfom	CD3(-)	CD79(+)	+/-
samojed	Ž	limfom	limfom	CD3(+)	CD79(-)	+/-
labrador retriever	D	suspektna upala/limfom	upala	CD3(+)	CD79(+)	-/-
zlatni retriever	Ž	suspektna upala/limfom	limfom	CD3(-)	CD79(+)	-/-
	D			CD3(+)	CD79(+)	
bigl	D	suspektna upala	upala	CD3(+)	CD79(-)	-/-
malteški psić	Ž	suspektna upala	limfom	CD3(+)	CD79(-)	-/-
	D			CD3(-)	CD79(-)	
samojed	Ž	suspektna upala	upala	CD3(+)	CD79(-)	-/-
	D			CD3(+)	CD79(+)	

HE – hemalun eozin; IHK– imunohistokemijska pretraga; K – kolon; Ž – želudac; D – duodenum; J – jejunum; CD – engl. cluster of differentiation, imunohistokemijski biljeg; CD3 – biljeg za ekspresiju T limfocita; CD79 – biljeg za ekspresiju B limfocita; +/- dijagnoza potvrđena; -/+ dijagnoza opovrgnuta; -/- dijagnoza diferencirana



Slika 3. Histopatološki prikaz duodenuma psa na kojem se uočava infiltracija limfocita, plazma stanica, neutrofila, eritrocita i makrofaga u epitelu crijevnih resica. Zbog velikog broja malih do srednje velikih limfocita ovakav se nalaz može svrstati pod dijagnozu upalne bolesti crijeva, ali i alimentarnog limfoma. Obojano HE, promatrano svjetlosnim mikroskopom, povećanje 20 x.



Slika 4. Prikaz epitela želučane stijenke psa nakon provedene imunohistokemijske pretrage na CD79 biljeg. Smeđe obojene stanice predstavljaju B limfocite zbog ekspresije CD79 imunohistokemijskog biljega. U uzorku je prisutno više od 80% pozitivnih stanica na navedeni biljeg što odgovara dijagnozi B staničnog alimentarnog limfoma. Promatrano svjetlosnim mikroskopom, povećanje 20 x.

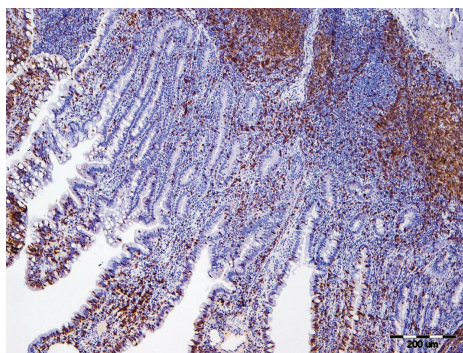
(45,71 %), 7 slučajeva limfoma (20,00 %), 9 slučajeva suspektne upale (25,71 %) te 3 slučaja suspektne upale/limfoma (8,58 %). Nakon provedene imunohistokemijske metode na 16 pasa i njihovih 22 uzorka, 9 životinja je svrstano pod dijagnozu alimentarnog limfoma (56,25 %), a 7 ih je svrstano pod upalnu bolest crijeva (43,75 %). Imunohistokemijskom

metodom u 6 slučajeva dijagnoza je bila jednaka postavljenoj histopatološkom pretragom, u 5 slučajeva dijagnoza je opovrgnuta te smo u 5 slučajeva pomoću IHK metode diferencirali dijagnozu (Tabela 3.).

Nadalje, u ovom radu od 9 slučajeva alimentarnog limfoma, 7 slučajeva opisano je kao T stanični limfom (77,78 %) dok su 2 slučaja opisana kao B stanični limfom (22,22 %). Utvrđene su značajne razlike ($P < 0,05$) između dijagnoze upalne bolesti crijeva te limfoma ustanovljene patohistološkom pretragom te imunohistokemijskom metodom. Povezanost s tendencijom učinka zabilježena je između patohistološke dijagnoze i CD3 biljega ($r = -0,34$; $P = 0,08$) odnosno između patohistološke dijagnoze i CD79 biljega ($r = 0,36$; $P = 0,09$) s nešto nižom razinom povezanosti između patohistološke dijagnoze i dijagnoze IHK ($r = 0,21$; $P = 0,34$).

Rasprava

Rezultati ovog istraživanja ukazuju kako je razlika između dobi prema početku razvoja bolesti mala, što predstavlja otežavajući čimbenik pri dijagnosticiranju



Slika 5. Prikaz uzorka duodenuma psa na kojem je provedena imunohistokemijska pretraga na CD79 biljeg. Uočava se raznovrsna populacija limfatičnih stanica s negativnom ekspresijom CD3 biljega i CD79 pozitivnih stanica (smeđe obojenje) koje odgovaraju B-limfocitima. Promatrano svjetlosnim mikroskopom, povećanje 10 x.

i diferenciranju alimentarnog limfoma od upalne bolesti crijeva. Alimentarni limfom se javlja u nešto kasnijoj dobi nego upalna bolest crijeva što je u suglasju s istraživanjima (Craven i sur., 2004., Coyle i Steinberg, 2004., Carrasco i sur., 2015., Lane i sur., 2018.). Naime, prema Frank i sur. (2007.) zabilježena je moguća progresija upalne bolesti crijeva u limfom u različitim dobnih skupina pasa. Slični rezultati utvrđeni su i u istraživanjima Couto i sur. (1989.), Craven i sur. (2004.) te Lane i sur. (2018.) s višom učestalosti oboljenja u muških jedinki (85,7 %). Udio određenih pasmina pasa u našem istraživanju (Tabela 2.) nije bio dostatan kako bi ocijenili raspodjelu alimentarnog limfoma i upalne bolesti crijeva prema pasminama, međutim podatci su slični ranije provedenim istraživanjima (Coyle i Steinberg, 2004., Miura i sur., 2004.).

Alimentarni limfom karakteriziraju neoplastično promijenjene stanice isključivo podrijetla limfoidnog tkiva crijeva (Peyerove ploče, limfoidni folikuli) (Lane i sur., 2018.) te se u pasa javlja u svega 7 % dijagnosticiranih slučajeva (Meuten, 2017.). Isti autor također navodi da se najčešće javljaju tri tipa limfoma: limfoblastični, limfocitni i granularni. Prema podrijetlu podtipa limfatičnih stanica, histološki i biološki razlikujemo dobro diferencirane limfome niskog stupnja (tzv. limfocitni limfomi) te slabo diferencirane limfome visokog stupnja (limfoblastični limfomi). Granularni limfom je još jedan tip limfoma koji je podrijetla NK-stanica (engl. *Natural killer cells*) (Geiger, 2011.). French i sur. (1996.) u svom istraživanju opisuju također i epiteliotropni alimentarni limfom kao podtip limfocitnog limfoma kojeg karakteriziraju neoplastično promijenjeni T limfociti s morfološkim nakupljanjem u obliku gnijezda ili plakova u epitelu stijenke crijeva. Karakteristično je za alimentarni limfom da nakupina neoplastičnoga tkiva ostaje ograničena isključivo na probavni sustav bez

metastaziranja u ostale organske sustave (Frank i sur., 2007.).

Prema istraživanjima Fournel-Fleury i sur. (2002.), Coyle i Steinberg (2004.) te Geiger (2011.) podrijetlo i distribucija T i B limfocita alimentarnog limfoma koji zahvaća tanko i debelo crijevo u velikom broju slučajeva opisano je kao T stanični limfom i to limfom malih i srednje velikih limfocita, dok limfom želuca ima veću incidenciju pojavnosti kao B stanični limfom (slika 1.). Prema dobivenim rezultatima te imunofenotipskoj pripadnosti (CD3 ili CD79) (Tabela 3.) u najvećem broju uzoraka tankog crijeva udio pozitivnih stanica veći od 80 % odnosio se na CD3 biljege na temelju čega se može zaključiti kako su stanice alimentarnog limfoma u tankom crijevu u našem istraživanju podrijetla T limfocita što je u suglasju s ranije provedenim istraživanjima. U našem je istraživanju u pojedinim uzorcima želuca uočljivo i nakupljanje neoplastičnih limfocita s udjelom više od 80 % stanica pozitivnih na CD79 biljege (slika 4.) što je u suglasju s navodima da je alimentarni limfom u želudcu podrijetla B limfocita te su dobiveni rezultati slični ranije provedenim istraživanjima.

Day (2013.) te Zhang i Li (2014.) navode kako su dosadašnje studije pokazale da se imunotolerancija na antigene u lumenu crijeva kao što je crijeva mikroflora i hrana razvija posljedično mutaciji gena za *NOD-like* receptore (engl. *nucleotide oligomerization domain-like receptors*) u citoplazmi epitelnih stanica što dovodi do neravnoteže između protupalnih citokina i limfocita. Tako nastala neravnoteža često ima za posljedicu upalni odgovor uslijed čega dolazi do oštećenja crijevne sluznice, povećane propustljivosti i poremećaja u crijevnoj mikroflori te na taj način antigeni postaju lakše dostupni imunosnom sustavu crijevne sluznice. U odsutnosti tolerancije naknadni upalni odgovor može biti pretjeran pa čak i štetan što pogoduje razvoju upalne

bolesti crijeva. Prema istraživanju Zhang i Li (2014.) razlika između tolerancije i reaktivnog upalnog odgovora postoji i u receptorima za prepoznavanje antigena (engl. *pattern recognition receptor*, *PRRs*) koji su sposobni prepoznati mikrofloru prema njihovim molekularnim osobitostima (patogeni ili nepatogeni mikrobi). Heilmann i Suchodolski (2015.) navode da je crijeva mikroflora različita u zdravih i bolesnih pasa i jedan je od najznačajnijih čimbenika nastanka upalne bolesti crijeva uz genetsku predispoziciju. Isti autori navode kako osnovu imunološkog odgovora čini aktivacija stečenog, odnosno specifičnog imunološkog odgovora te distribucija T limfocita. U pasa dolazi do aktivacije mješovitog, Th1 (engl. *type 1 helper cells*) (citotoksičan, IgG) i Th2 (engl. *type 2 helper cells*) (IgE) upalnog odgovora što uključuje i ekspresiju različitih citokina (interleukina-12, 4, 5 i 13, interferon γ). Prema Craven i sur. (2004.) u sluznici crijeva primarno dolazi do infiltracije neutrofila, a nakon ekspresije određenih receptora i aktivacije različitih citokina do infiltracije T i B limfocita uz karakterističan upalni infiltrat kojeg čine makrofagi, granulociti, IgG i IgA plazma stanice, ali sa smanjenom distribucijom mastocita.

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da je kod tri uzorka na kojima je provedena imunohistokemijska pretraga ustanovljen jednak udio stanica s ekspresijom na CD3 i CD79 biljege (Tabela 3.) što nam ukazuje da je prisutna raznovrsna populacija limfatičnih stanica (slika 5.). Naime, u nekim uzorcima koji su svrstani pod dijagnozu limfoma, osim istovrsne populacije neoplastično promijenjenih limfocita u pozadini se nalazi infiltracija upalnih stanica (limfociti, eozinofili, plazma stanice, histiociti). U tom je slučaju potrebno

provesti imunohistokemijsku pretragu kako bi uspješno diferencirali alimentarni limfom od upalne bolesti crijeva (Moore i sur., 2012.). Waly i sur. (2005.) u svom istraživanju također opisuju raznovrsnu populaciju upalnih stanica u tkivu prema ekspresiji imunohistokemijskih biljega.

Međutim, u našem istraživanju bilo je uzoraka kod kojih i nakon provedene imunohistokemijske pretrage ne možemo sa sigurnošću razlučiti alimentarni limfom od upalne bolesti crijeva, jer iako unutar stijenke crijeva postoji stanični infiltrat koji morfološki odgovara alimentarnom limfomu ekspresija imunohistokemijskih biljega pokazuje raznovrsan tip limfatičnih stanica u kombinaciji s upalnim staničnim infiltratom i edemom (slika 5.) što je u suglasju s istraživanjima Carrasco i sur. (2015.).

Prema istraživanjima Couto i sur. (1989.), Moore i Vernau (2005.), Waly i sur. (2005.) te Carrasco i sur. (2015.) imunohistokemijska metoda je korisna u kombinaciji s histopatološkom pretragom i metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, *PCR*) jer omogućava diferencijaciju istovrsne populacije limfatičnih stanica koja je karakteristična za limfom od raznovrsne populacije kod promjena koje nisu neoplastične.

Zaključak

Prema opisanom upalnu bolest crijeva nije uvijek moguće sa sigurnošću razlikovati od alimentarnog limfoma, što ima za posljedicu odgađanje donošenja točne dijagnoze te ispravne terapije i prognoze, a time i ishoda same bolesti. Također, dob životinje u kojoj se patološke promjene pojavljuju predstavlja jednu od smjernica za daljnja istraživanja zbog moguće progresije upalne bolesti crijeva u alimentarni limfom.

Literatura

- ARSLAN, H. H. and E. KULLUK (2017): Inflammatory bowel disease and current treatment options in dogs. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 12, 150–158.
- BRISCOE, K. A., M. KROCKENBERGER, J. A. BEATTY, A. CROWLEY, M. M. DENNIS, P. J. CANFIELD, N. DHAND, A. E. LINGARD and V. R. BARRS (2011): Histopathological and immunohistochemical evaluation of 53 cases of feline lymphoplasmacytic enteritis and low-grade alimentary lymphoma. *J. Comp. Pathol.* 145, 187–198.
- CARRASCO, V., A. RODRIGUEZ-BERTOS, F. RODRIGUEZ-FRANCO, A. G. WISE, R. MAES, T. MULLANEY and M. KIUPEL (2015): Distinguishing intestinal lymphoma from inflammatory bowel disease in canine duodenal endoscopic biopsy samples. *Vet. Pathol.* 52, 668–675.
- CERQUETELLA, M., A. SPATERNA, F. LAUS, B. TESEI, G. ROSSI, E. ANTONELLI, V. VILLANACI and G. BASSOTI (2010): Inflammatory bowel disease in the dog: Differences and similarities with human. *World J. Gastroenterol.* 16, 1050–1056.
- CHETTY, R. and K. GATTER (1994): CD3: Structure, function and the roll of immunostaining in clinical practice. *J. Pathol.* 173, 303–307.
- COONS, A. H., H. J. CREECH and R. N. JONES (1941): Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47, 200–202.
- COUTO, C. G., H. C. RUTGERS, R. G. SHERDING and J. ROJKO (1989): Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study. *J. Vet. Intern. Med.* 3, 73–78.
- COYLE, K. A. and H. STEINBERG (2004): Characterization of lymphocytes in canine gastrointestinal lymphoma. *Vet. Pathol.* 41, 141–146.
- CRAVEN, M., J. W. SIMPSON, A. E. RIDYARD and M. L. CHANDLER (2004): Canine inflammatory bowel disease: retrospective analysis of diagnosis and outcome in 80 cases (1995 – 2002). *J. Small Anim. Pract.* 45, 336–342.
- DAY, M. J. (2013): An update of canine inflammatory bowel disease. 38th World Congress in Auckland, New Zealand. March 6th to 9th; <https://www.vin.com/doc/?id=5709901&pid=11372>
- DAY, M. J. i R. D. SCHULTZ (2013): Biologija T-limfocita. In: Veterinarska imunologija, načela i primjena. Medicinska naklada Zagreb. Pp. 83–96.
- de LANGE K. M. and J. C. BARRET (2015): Understanding inflammatory bowel disease via immunogenetics. *J. Autoimmun.* 64, 91–100.
- DURAIYAN, J., R. GOVINDARAJAN, K. KALIYAPPAN and M. PALANISAMY (2012): Application of immunohistochemistry. *Pharm. Bioallied. Sci.* 4 (Suppl. 2), 307–309.
- FOURNEL-FLEURY, C., F. PONCE, P. FELMA, A. BLAVIER, C. BONNEFONT, L. CHABANNE, T. MARCHAL, J. L. CADORE, I. GOY-THOLLOT, D. LEDIEU, I. GHERNATI and J. P. MAGNOL (2002): Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study case of 46 new cases. *Vet. Pathol.* 39, 92–109.
- FRANK, J. D., S. B. REIMER, P. H. KASS and M. KIUPEL (2007): Clinical outcomes of 30 cases of canine gastrointestinal lymphoma. *J. Am. Hosp. Assoc.* 43, 313–321.
- FRENCH, R. A., S. E. SEITZ and V. E. VALLI (1996): Primary epitheliotropic alimentary T-cell lymphoma with hepatic involvement in a dog. *Vet. Pathol.* 33, 349–352.
- GEIGER, T. (2011): Alimentary lymphoma in cats and dogs. *Vet. Clin. Anim.* 41, 419–432.
- HALL, E. (2009): Inflammatory bowel disease in dogs and cats. <https://pdfs.semanticscholar.org/4300/4d42e5a0b1e0543a36221e7f1fa3d991d0ff.pdf>
- HEILMANN, R. M. and J. S. SUCHODOLSKI (2015): Is inflammatory bowel disease in dogs and cats associated with Th1 or Th2 polarization? *Vet. Immunol. Immunopathol.* 168, 131–134.
- HOWARD, B. G. (2017): Alimentary system and peritoneum omentum, mesentery and peritoneal cavity. In: Zachary, J. Pathologic basis of veterinary disease.
- JOVIĆ, I., J. GOTIĆ, I. ŠMIT, M. TORTI, M. CRNOGAJ i D. POTOČNJAK (2015): Upalna bolest crijeva- što je novo? *Vet. stn.* 46, 295–310.
- LANE, J., J. PRICE, A. MOORE, J. R. S. DANDRIEUX, C. CLIFFORD, K. CURRAN, K. CHOY and C. CANNON (2018): Low-grade gastrointestinal lymphoma in dogs: 20 cases (2010–2016). *J. Small Anim. Pract.* 59, 147–153.
- MEUTEN, J. D. (2017): Tumors in domestic animals, 5th edition. P. 499.
- MIURA, T., H. MARUYAMA, M. SAKAI, T. TAKAHASHI, H. KOIE, Y. YAMAYA, H. SHIBUYA, T. SATO, T. WATARI, M. TOKURIKI and A. HASEGAWA (2004): Endoscopic findings on alimentary lymphoma in 7 dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 577–580.
- MOORE, P. F., A. RODRIGUEZ-BERTOS and P. H. KASS (2012): Feline gastrointestinal lymphoma: mucosal architecture, immunophenotype and molecular clonality. *Vet. Pathol.* 49, 658–668.
- MOORE, P. F. and J. C. VERNAU (2005): Characterization of feline T cell receptor (TCR) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 167–178.
- PILOZZI, E., K. PULFORD, M. JONES, H. K. MUULER-HERMELINK, B. FALINI, E. RALFKIAER, S. PILERI, F. PEZZELLA, C. de WOLF-PEETERS, D. ARBER, H. STEIN, D. MASON and K. GATTER (1988): Co-expression of CD79a (JCB117) and CD3 by lymphoblastic lymphoma. *J. Pathol.* 186, 140–143.
- VUKOJA, N., S. HANČIĆ i P. KORAC (2017): Razvoj metoda imunohistokemijskog bojenja i optimizacija protokola za detekciju transkripcijskog faktora BACH2. *J. Appl. Health. Sci.* 3, 235–245.

29. WALY, E., T. J. GRUFFYDD-JONES, C. R. STOKES and M. J. DAY (2005): Immunohistochemical diagnosis of alimentary lymphomas and severe intestinal inflammation in cats. *J. Comp. Path.* 133, 253–260.
30. WASHBAU, R. J., M. J. DAY, M. D. WILLARD, E. J. HALL, A. E. JERGENS, J. MANSELL, T. MINAMI and T. W. BILZER (2010): Endoscopic, Biopsy, and Histopathologic Guidelines for the Evaluation of Gastrointestinal Inflammation in Companion Animals. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 10–26.
31. WILLIARD, M. D. (2012): Alimentary neoplasia in geriatric dogs and cats. *Vet. Clin. Small. Anim.* 42, 693–706.
32. ZHANG, Y. Z. and Y. Y. LI (2014): Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 20, 90–101.

Differentiation of alimentary lymphoma from inflammatory bowel disease and the influence of breed and age on the outbreak of pathological changes in the canine gastrointestinal tract

Aneta PIPLICA, DVM, Assistant, Sven MENČIK, DVM, PhD, Assistant Professor, Andrea GUDAN KURILJ, DVM, PhD, DECVP, Associate Professor, Branka ARTUKOVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Lidija MEDVEN ZAGRADIŠNIK, DVM, PhD, Senior Assistant, Assistant, Marko HOHŠTETER, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Zagreb, Croatia

The aim of this study was to evaluate the use of immunohistochemistry (IHC) with the histopathological method to diagnose and differentiate alimentary lymphoma (AL) from inflammatory bowel disease (IBD). Archival histopathological findings and tissue samples, paraffin blocks and slides were used. This study included 35 dogs divided in three groups regarding breed size - small, medium or large - aiming to determine the correlation between certain pathohistological changes depending on breed, age and gender. The average age of dogs in the small breeds group was 7.58 ± 3.59 years, in the medium breeds group was 7.45 ± 3.04 years and in the large breeds group was 6.58 ± 3.47 years. The average age of dogs suffering from AL was 8.8 years, unlike dogs suffering from IBD, with the average age of 7 years. A larger number of males was represented within all three groups. The highest share of biopsy samples (53.65%) involved the analysis of small intestine tissue, with eight samples (33.33%) in all three groups. The portion of the biopsied stomach tissue was somewhat lower (21.95%), while in two breeds (4.87%) colon tissue was sampled. Histopathological analysis determined 16

cases of IBD, seven cases of lymphoma (20.00%), nine cases of suspected inflammation (25.71%) and three cases of suspected inflammation/lymphoma (8.58%). After IHC, the diagnosis determined by histopathological evaluation was confirmed in six cases, rejected in five cases, while in five cases it was useful in distinguishing AL from IBD. Significant differences ($P < 0.05$) were found between the diagnosis of IBD and AL ascertained by pathohistological analysis and the IHC method. T cellular lymphoma was also found to be more common in the small intestine, while B cellular lymphoma was more prevalent in the stomach. A correlation (r) with the tendency of effect was recorded between the pathohistological diagnosis and the CD3 mark ($r = -0.34$; $P = 0.08$), between the pathohistological diagnosis and the CD79 mark ($r = 0.36$; $P = 0.09$) with a slightly lower level of correlation between the pathohistological diagnosis and the diagnosis of IHC ($r = 0.21$, $P = 0.34$). Based on the results, it can be concluded that immunohistochemistry is useful in confirming the diagnosis and in the differentiation of AL and IBD.

Key words: dog; retrospective analysis; alimentary lymphoma; inflammatory bowel disease