

**SZENT ISTVÁN EGYETEM**  
**ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR**  
**Patológiai Tanszék**

**A kutyák gastrointestinalis stromalis tumorainak immunhisztokémiai  
vizsgálata**

*Immunohistochemical investigation of the canine gastrointestinal stromal tumor*

Készítette:

**Nádasdi Péter Vilmos, VI. évf. hallgató**

Témavezető:

Dr. Jakab Csaba, egyetemi adjunktus  
Szie ÁOTK, Patológiai Tanszék

Budapest, 2015

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>4</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>5</b>
2.1. A GIST-ről általában .....	5
2.2. A GIST emberben .....	7
2.3. A GIST kutyában .....	8
2.4. Immunhisztokémia .....	10
2.5. Kezelés .....	11
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>	<b>12</b>
3.2. Kórszövettan.....	12
3.2. Immunhisztokémia .....	12
<b>4. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>16</b>
<b>5. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>26</b>
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>28</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>29</b>
<b>8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>30</b>
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>31</b>

## Rövidítések

GIST – Gastrointestinalis stromalis tumor

SMA – smooth muscle actin (simaizom actin)

LM – Leomyoma

LMS – Leomyosarcoma

NFS - Neurofibrosarcoma

SI – Simaizom

NNL – Nagy nagyítású látótér

ir – immunreakció

IH - Immunhisztokémia

mtsai - munkatársai

## 1. BEVEZETÉS

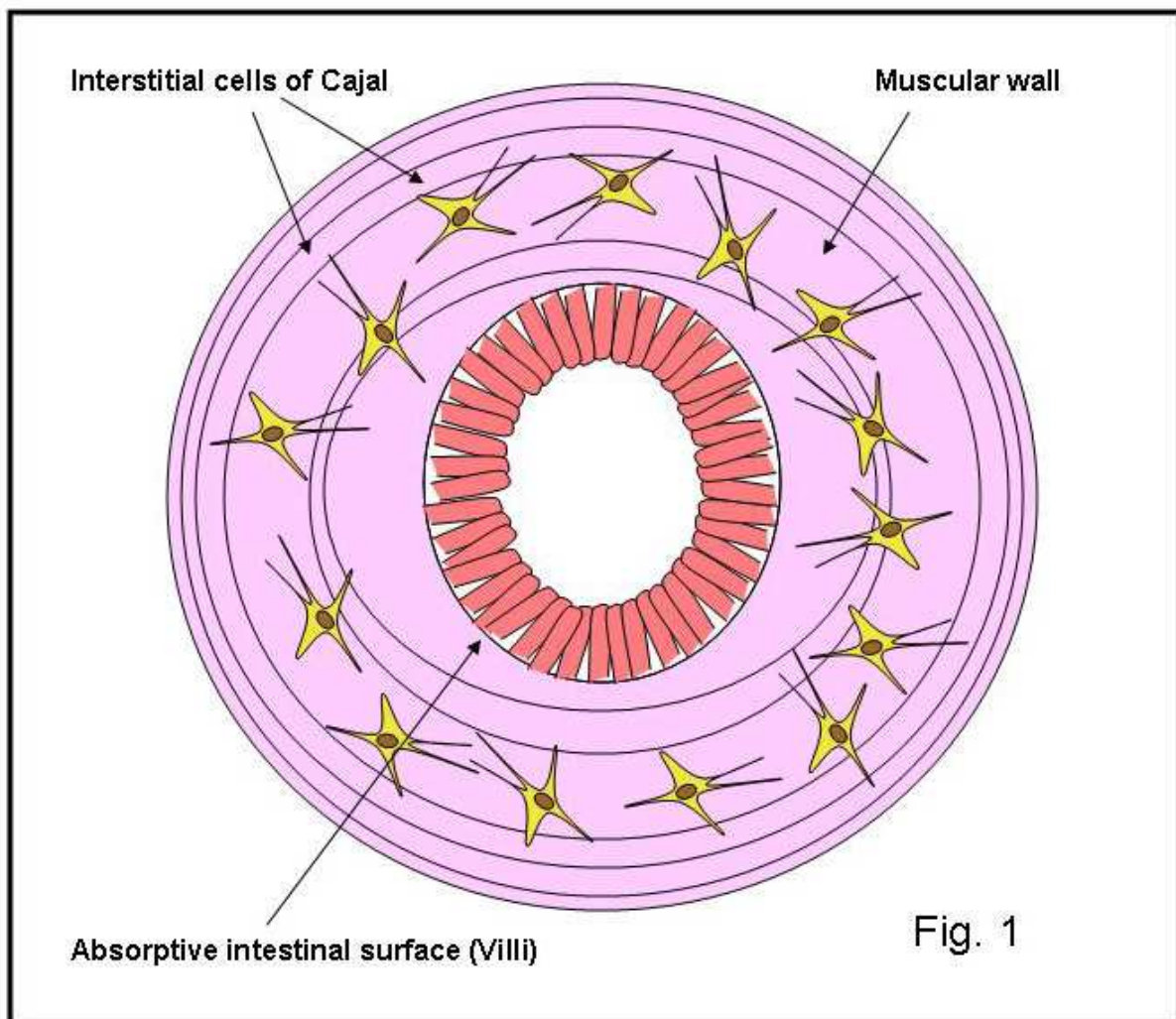
Napjaink egyik legnagyobb félelmet keltő és egyben leggyakoribb kórképei a tumoros megbetegedések, mind a humán-, mind az állatorvoslás terén. Ebből kifolyólag egyre fontosabbá válik, hogy minél hamarabb, minél pontosabb képet kapjunk ezen elváltozások szerkezetéről, milyenségéről. Az utóbbi években a tumor diagnosztika robbanásszerű fejlődésen ment keresztül és köszönhetően a legújabb technikáknak egyre könnyebbé és gyorsabbá válik az osztályozás folyamata. A modern molekuláris patológia egyik leghasznosabb vívmánya az immunhisztokémiai vizsgálat. Segítségével lehetővé vált a kórszövettani vizsgálatokból egyértelműen meg nem állapítható sejteredet feltérképezése, mind az intact, mind a kórosan elváltozott (daganatos, gyulladáson) szövetekben. Az ezen vizsgálatokra épülő ismeretek segítenek a pontosabb és biztosabb diagnózis felállításában és célzott terápiás stratégiák kidolgozásában.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy a SZIE ÁOTK Patológiai Tanszékének szövetbankjából kiválasztott kutyák gyomrából, vékonybeléből és nyelőcsövéből származó, fénymikroszkóposan simaizom eredetűnek diagnosztizált tumorokat indirekt immunhisztokémiai vizsgálatnak vessük alá, anti-vimentin, anti- $\alpha$ -SMA, anti-S-100 protein, anti-c-Kit (CD117) ellenanyagok segítségével. Hazánkban ez az első ilyen jellegű, állatorvosi patológiai közlemény.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A GIST-ről általában

A gastrointestinalis stromalis tumor (GIST) az emésztőcső, kutyákban elsősorban a vakbél és a vastagbél, ún. Cajal-sejtjeiből kiinduló, fénymikroszkópos vizsgálattal orsósejtes megjelenésű daganata. A Cajal-sejtek, mint intestinalis pacemaker sejtek biztosítják élettani körülmények között a gyomor-bélcsatorna autonóm mozgását.(1. ábra)



**1. ábra:** A Cajal-sejtek helyeződése (Forrás: The life raft, <https://liferaftgroup.org/2009/06/interstitial-cells-of-cajal-what-are-they-and-why-should-you-care/>, megtekintés: 2015.12.10.)

Az immunhisztokémiai vizsgálatoknak köszönhetően a humánorvoslás területén írták le először (2, 4, 16), majd később kutyákban is azonosították (3, 9, 10). Kizárólag klinikai

tünetek és vizsgálatok, illetve a mikroszkópos lelet alapján a GIST nem különíthető el az emésztőtraktusban megjelenő más daganat típusoktól (leggyakrabban leomyoma, leomyosarcoma, ami a daganatok 10-30%-át teszi ki – (3)). A leomyosarcoma ugyan gyakrabban fordul elő a gyomorban és a vékonybeleben, a GIST pedig a vastagbeleben, de mindkét daganattípust megtalálhatjuk a teljes emésztőcsőben, így a helyeződés nem szolgálhat a differenciáció alapjául. A GIST lehet malignus és benignus is, melynek elkülönítését – hasonlóan a többi daganathoz - a mikroszkópos sejttani vizsgálat teszi lehetővé. Készült azonban egy tanulmány, melyben ultrahangos kép alapján határozták meg az áttétképződés lehetőségét. A szerzők megállapították, hogy a nagyobb átmérő, az egyenetlen szegély, a heterogén belső echogenitás nagy hypoechogen területekkel viszonylag pontosan jelzi előre a metastasis lehetőségét (29). A daganat pontos diagnózisához nélkülözhetetlen a megfelelő antitestekből álló immunhisztokémiai panel alkalmazása (15).

A GIST emberekben és kutyákban a leggyakoribb, azonban leírták már főemlősökben és 2001-ben lovakban is, de sajnos náluk még nem alkalmazták a c-Kitet, ami nélkül mai ismereteink szerint nem lehet pontosan diagnosztizálni a GIST-t (bővebben a 2.4.-es fejezetben). 10 ló és egy póni daganatos elváltozásaiból vettek mintát (2 esetben mutatkoztak klinikai tünetek, 9-nél csak, mint melléklet vették észre az elváltozásokat). A daganatok helyeződés szerint a következőként oszlottak meg: 5 caecum , 3 ileum, 2 colon, 1 jejunum, 1 gyomor minta. Mindegyik elváltozás vimentin pozitivitást mutatott, 3 db S-100-zal és 2 alfa-SMA-val is festődött. Kutatásunk folyamán nem találtunk olyan cikket, mely lovakban is vizsgálta volna GIST-ek anti-c-Kit festődését (25).

## 2.2. A GIST emberben

A humán GIST leggyakrabban a gyomorban, majd a vékonybélben, ritkábban a rectumban, mesenteriumban, nyelőcsőben, colonban fejlődik ki, elsősorban az idősebb korosztályban. Az érintett betegek átlagos életkora a daganat észlelésekor 63 év. A GIST hányingert, hányást, hasi fájdalmat, testsúlycsökkenést, az evést követő túl korai teltségérzetet okozhat emberben, ill. vérzések is kísérhetik a betegséget, amelyek idővel vérszegénységhez és fáradékonysághoz vezetnek. Ezek a tünetek a betegség kezdeti megjelenésétől számítva átlagosan 4–6 hónapon belül jelennek meg. A daganat áttéteket legtöbbször a nyirokcsomóba, a hasüregbe (mesenteriumba) és a májba ad (2, 4, 8, 15, 22, 24).

Hazánkban OROSZ és mtsai (2006) végeztek retrospektív felmérést öt regionális centrumban azzal a céllal, hogy megállapítsák: a GIST-k 2004-től 1985-ig visszamenően milyen kórszövettani diagnózisokkal szerepeltek (15). A visszatekintő immunhisztokémiai vizsgálat során a c-Kit-pozitív GIST-nek bizonyult esetek első diagnózisai a következők voltak: leiomyoma, leiomyosarcoma, benignus schwannoma/neurinoma, neurofibroma, malignus schwannoma, GANT (gastrointestinalis autonóm idegtumor), fibroma, fibrosarcoma, fibromyoma, haemangiopericytoma, mesothelioma, lymphoma, malignus fibrosus histiocytoma. Munkájukkal felhívták a figyelmet arra, hogy a gyomor-bélrendszer daganatai esetében indokolt a szélesebb immunhisztokémiai paletta alkalmazása, a c-Kit (CD117), a CD34, az S100 protein és a desmin immunhisztokémiai reakciók elvégzése (1, 13, 15).

### 2.3. A GIST kutyában

Kutyákban a retrospektív immunhisztokémiai vizsgálatoknak köszönhetően 1997-ben írták le először a GIST-t. Ebben a kutatásban azonban még nem alkalmazták a ma legmegbízhatóbbnak tartott c-Kitet, illetve a GIST fogalma sem volt még teljes egészében tisztázott. 35 formalinban fixált mintát dolgoztak fel, melyek közül 14 LM, 18 LMS, 2 differenciálatlan sarcoma és egy NFS. Minden mintát négy markerre teszteltek (vimentin, S-100, alfa-SMA és desmin). 31/35 eset mutatott alfa-SMA és/vagy desmin, 17 eset pedig S-100 pozitivitást. A probléma az, hogy a GIST-k minden fent említett markerre lehetnek pozitívak és több más tumor típus is festődhet velük, így csupán a fentiek alapján nem lehet biztos diagnózist felállítani (9).

A c-Kit használatára kutyákban először 2003-ban került sor, amikor FROST és mtsai 50 leomyomának diagnosztizált daganatot vizsgáltak meg különböző immunhisztokémiai eljárásokkal. Az 50 esetből 21 lett GIST (42%), ebből pedig 11 tumor mutatott c-Kit pozitivitást. Ugyan ez csak az esetek 52%-a, de a szerzők már ekkor feltételezték, hogy valószínűleg a többi próba fals negatív és a legtöbb GIST pozitív a C-Kit-re. 7 GIST ezen felül pozitív lett alfa-SMA-ra és egyik sem festődött desminnel vagy S-100-zal. A daganatot azonos arányban észlelték szuka és kan egyedekben, amelyek átlag életkora 11 év volt (5–14 év). Az esetek 24%-ában jelentkeztek klinikai tünetek, ill. 29%-ban már volt áttét a májban és a hasüregben. A GIST anatómiai megoszlása a következő volt: vastagbél (48%), vékonybél (29%), gyomor (19%), és mesenterium (5%) (3). Többnyire orsósejtes, hypercellularis típust észleltek vizsgálataik során, szemben a jóval kisebb számban előforduló epitheloid típusal. A mitoticus index 0–19 osztódó sejt/10 NNL volt. 29 tumornál maradtak az eredeti diagnózisnál, vagyis az LM-nél. Itt az ivararány eltolódott a hímek irányába (82%), de az átlag életkor itt is 11 év volt. 9 tumor okozott klinikai tüneteket, 22 a gyomorból, 4 a nyelőcsőből és 3 a belekből származott. 28 eset (97%) volt pozitív alfa-SMA-ra, 18 desminre, de egyik sem S-100-ra vagy c-Kitre. Megállapították tehát, hogy a c-Kit egy specifikus markere a GIST-nek (3).

MAAS és mtsai 2007-ben 72 vékonybél és vakbél eredetű leiomyoma, leiomyosarcoma újraosztályozását végezték el  $\alpha$ -SMA, desmin, vimentin, S-100 protein és c-Kit alapú immunhisztokémia segítségével. A reklassifikáció kritériuma, hogy a mintának c-Kit és vimentin pozitívnak kell lennie függetlenül a mikroszkópos látképtől és az  $\alpha$ -SMA, desmin, S-100 festődéstől. Ebben a tanulmányban használják a GIST-like kifejezést is. Ezen tumorok



tulajdonságai megegyeznek a GIST-ével, de nem pozitívak c-Kitre. A 72 esetből 47 minta származott a vékonybélből, 25 pedig a caecumból. A vékonybél mintáknál 19 GIST és 17 GIST-like lett reklasszifikálva (2 maradt LM, 9 pedig LMS), a caecumban pedig az összes tumort újraosztályozták (23 GIST, 2 GIST like). A tanulmányban vizsgált esetek 85%-a, azaz 19 vékonybél és 23 caecum tumor bizonyult utólag GIST-nek. A szerzők eme tanulmány fontos eredményének tartják még, hogy hiába volt a legtöbb daganat malignus jellegű, a megfelelő sebészi eltávolítás után viszonylag hosszú volt a páciensek túlélési ideje. A vékonybél tumorosok közül 3 (446, 1093, 3491 nap), míg a vakbelesok közül 4 állat 1 év után is életben volt (470, 813, 823, 1393 nap), ezen felül mind a 7 kutya mentes volt klinikai tünetektől. A vékonybeles csoportban 12-nek (29%) maradt vissza tumor/tünet vagy alakult ki metastasis a műtét után, 3 közülük elaltatásra került. Ezen állatok átlagos túlélési ideje csupán 32 nap volt. A vakbeles csoportban 7-nél nem sikerült a teljes tumort eltávolítani és 2-t altattak el, az átlagos túlélési idő csupán 59 nap volt (10). A kutatásból kitűnik, hogy a sebészi eltávolítás nem mindig sikeres, így szükségessé válik a gyógyszeres kezelés mélyrehatóbb vizsgálata.

## 2.4. Immunhisztokémia

A c-Kit vagy CD117 egy tirozin-kináz aktivitású, transzmembrán receptorfehérje, amely élettani körülmények között a csontvelői myeloid haemopoeticus őssejtek, a bőrbeli melanocyták, a gyomorbélbeli Cajal-sejtek és a mastocyták (hízósejtek) membránjában fejeződik ki. Szerepet játszik a sejtnövekedésben, a proliferációban és a differenciálódásban (23). A c-Kit kódoló génjében (protoonkogénben) bekövetkező mutáció alapvető szerepet játszik a következő daganatok kialakulásában: GIST, mastocytoma, seminoma, acut myeloid leukaemia, adenoid cysticus carcinoma. Ezekben a rosszindulatú daganatokban a mutáció miatti túlzott kifejeződés (overexpresszió), az immunhisztokémiai vizsgálat során intenzív c-Kit-pozitivitásként észlelhető, ill. perinuclearis jellegű (14, 20).

A c-Kit valószínűleg nem az egyetlen marker, amivel diagnosztizálni lehet a GIST-eket. Az egyik lehetséges alternatíva a CD34 volt, amely humán esetek 60-80%-ában pozitív eredményt ad. A CD34 egy sejtfelszíni fehérje, amely többek közt a sejtek közötti kapcsolatok kialakításában játszik fontos szerepet. Ezen fehérje markerként való használatának lehetőségét 2011-ben vizsgálták, de sajnos csak az esetek 14,8% lett pozitív, így a CD34 egyelőre nem használható a GIST diagnosztikájában (30).

Ígéretesebb lehetőséggel egy friss tanulmány szerint a DOG1 membrán fehérje kecsegtet, amely a kalcium dependens kloridion transzportért felel a GIST-ekben. A szerzők 55 tumormintát vetettek immunhisztokémiai vizsgálatok alá, amelyből 33-mat GIST-ként azonosítottak (15 szuka, 18 kan, 10,2 átlag életkor). Azokat a tumorokat jelölték GIST-nek, melyek c-Kit vagy DOG1 pozitívak, illetve desmin negatívak voltak (a desminnel való festődés leomyosarcoma, leomyoma utal). 32 eset pozitív volt c-Kit-re és DOG1-re is, 1 csak DOG1-re, egy pedig DOG1-re és desminre is (ez utóbbi tehát leomyosarcoma). Azt, hogy miért voltak c-Kit negatív GIST-k nem tudták megmagyarázni, de valamilyen daganat szubtypust vagy a kimutatási eljárás közben elkövetett hibát feltételeztek. Látható, hogy a DOG1 hasonlóan érzékeny markere lehet a GIST-eknek, mint a c-Kit (26).

Természetesen a leomyoma és leomyosarcoma is mutatnak immunhisztokémiai festődést. A leomyoma SMA és desmin pozitív, de negatív S-100-ra és c-Kitre, ezen felül a mikroszkópos sejttani vizsgálat nem utal malignanciára. Az LMS hasonló kritériumok szerint festődik, mint az LM, de malignus jellegű (10).

## 2.5. Kezelés

E daganattípusnál sem a korábbi kemo-, sem a radioterápia nem hozott számottevő eredményt. Az eddig klasszikusan alkalmazott módszer a sebészi eltávolítás, azonban a GIST gyakran képez áttéteket vagy van inoperábilis helyen. JOENSUU és mtsai 2001-ben, áttétes GIST-s betegnél tirozinkináz-gátlóval (STI571, imatinib mesylate, Glivec®) gyakorlatilag teljes gyógyulást értek el (6). Előrehaladott GIST esetén azonnali imatinib kezelés javasolható, napi 400 mg adaggal. A kezelést tumorprogresszióig (áttétképződésig), intoleranciáig vagy a beteg általi visszautasításig folytatni kell. Áttétek megjelenése esetén el kell különíteni a partialis vagy multifocalis rezisztenciát. Ez azt jelenti, hogy a Glivec®-terápia során csak egy vagy néhány áttét mutat növekedést, míg a többi tumor mérete változatlan (8).

2013-ban hasonló kutatást végeztek egy 10 év körüli kutyán, amelynek nem operábilis GIST-je volt. Az imatinib hatására a tumor mérete csökkent a 67. napig, de ezután a kezelés 140. napjáig már nem. Emellett hepatotoxicitás is fellépett, mint mellékhatás (az ALT szint jelentősen emelkedett), de a szerzők feltételezik, hogy ez valószínűleg egyedi eset, mert az imatinib más kutatásokban nem okozott ilyen elváltozást. Hogy miért állt meg a tumor csökkenése a 67. napon nem bizonyított, de elképzelhető, hogy humán esetekhez hasonlóan a tumor rezisztenssé vált a tirozin-kináz gátlóra (28).

2015-ös tanulmány szerint egy 13 éves kutyát kezeltek imatinibbel, amelynek hasüregében eredeti tumorának műtéti eltávolítása után 5 hónappal újabb daganatokat észleltek. A diagnosztikai laparotómia során vett minták mindegyike pozitivitást mutatott c-Kit-re. Ezután kezdték meg az imatinib-mesylate-os kezelést 10 mg/kg dózisban. 2 hét után látható méretcsökkenés, 2 hónap után teljes gyógyulás következett be. A kutya további 4 és fél évet élt, kiújulást nem észleltek, további kezelésre nem volt szükség ( a kimúlás oka nem köthető össze a GIST-tel) (27).

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1. Kórszövettan

Munkánk során, a SZIE ÁOTK Patológiai Tanszékének szövetbankjából kiválasztottunk 15, kutya nyelőcsővéből (n = 1), gyomrából (n = 8) és vékonybeléből (n = 6) származó daganatmintát, amelyek kórszövetteni első diagnózisa jóindulatú, ill. rosszindulatú simaizomszöveti daganat, ún. leiomyoma és leiomyosarcoma volt.

Valamennyi gyomor eredetű minta kórszövetteni vizsgálattal leiomyomának tűnt, amelyek közül két esetben multiplex megjelenést észleltük. A nyelőcső distalis szakaszán, valamint a vékonybél falban észlelt daganatokat leiomyosarcomaként leleltük. Egy esetben lépbeli, ill. egy esetben májbeli áttéteket is megfigyeltünk. A kórszövetteni vizsgálathoz a mintákat előzetesen szobahőmérsékleten, 24 órán át, 8%-os pufferolt formaldehid oldatban konzerváltuk, majd szövetelőkészítő automatával tettük alkalmassá a további feldolgozásra. A beágyazást követően a paraffinos blokkokból 3–4 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket hematoxilinnal és eozinnal festettünk meg. A metszeteket Nikon Optiphot-2 típusú fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A daganat mitotikus indexének meghatározása során 50 különböző, nagynagyítású (200×) látómezőben (NNL) észlelt osztódó (profázisban, metafázisban, anafázisban, telofázisban lévő) daganatsejtet megszámlálva átlagoltunk.

#### 3.2. Immunhisztokémia

Az indirekt immunhisztokémiai vizsgálatot Ventana-immunfestő automata segítségével végeztük. A felhasznált antitesteket az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az immunhisztokémiai reakciókat avidin-biotin immunperoxidáz rendszerrel (DAKO LSAB2 Kit) és DAB (diaminobenzidin) chromogennel tettük láthatóvá. A kontrasztfestés hematoxilinnel történt. A negatív kontroll metszeteket az elsődleges antitestek kihagyásával készítettük. Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelése során külső pozitív kontrollokat használtunk. Az immunhisztokémiai reakciók elemzésénél utalunk korábbi tanulmányunk adott fejezetére (5).

Antitest	Külső pozitív kontroll	Immunreakció
Vimentin (monoclonalis egér, 1:200, DAKO)	kutya vaginalis fibroma	cytoplasmaticus
$\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (monoclonalis egér, 1:8000, Sigma)	kutya vaginalis leiomyoma	cytoplasmaticus
S-100 protein (polyclonalis nyúl, 1:50, DAKO)	kutya perifériás ideghüvelytumor	cytoplasmaticus
c-Kit/CD117 (polyclonalis nyúl, 1:100, DAKO)	kutya grade I-es mastocytoma	membrán-cytoplasmaticus

**1.táblázat:** Felhasznált antitestek



**2. ábra:** A szövetbank



**3. ábra:** A paraffinos minta szeletelése



**4. ábra:** A festőautomata



5. ábra: A festőtárca

#### 4. EREDMÉNYEK

A fénymikroszkópos vizsgálatok során a gyomorból származó minták esetén a monomorf, orsósejtes megjelenésű daganatokban osztódó sejteket csak elvéve figyeltünk meg (osztódó sejtszám: < 5/50 NNL). Ezen daganatok állományában mérsékelt tumorindukált érújdonképződés (neoangiogenesis) volt látható, ill. vérzés, elhalás jeleit nem tapasztaltuk.

A vékonybélből származó minták esetén nagy mitotikus aktivitást (osztódó sejtszám: > 5/50 NNL), kifejezett, perifériás jellegű daganat indukálta érújdonképződést, ill. centrális vérzést, elhalást észleltünk. A nyelőcsődaganat a bélfali tumorokhoz hasonló kórszöveti jellemzőket mutatott, viszont elhalás, vérzés nem volt állományában.

Tumor helyeződés	Tumor átmérő	Osztódó sejtszám (50N NL)	Korábbi kórszöveti (első) diagnózis	Vimentin-ir.	$\alpha$ -SMA-ir.	S 100 prot.-ir.	c-Kit-ir.	Új diagnózis	Rizikó-csoport
1. Nyelőcső	5,5cm	>5	Leiomyosarcoma	Pozitív (5)	Negatív	Pozitív (5)	Pozitív (5)	GIST	Nagy
2. Gyomor	1,5cm	<5	Leiomyoma	Pozitív (5)	Negatív	Pozitív (3)	Pozitív (5)	GIST	Nagyon kis
3. Gyomor	1cm	<5	Leiomyoma	Pozitív (5)	Negatív	Pozitív (3)	Pozitív (5)	GIST	Nagyon kis
4. Gyomor	2,2cm	<5	Leiomyoma	Pozitív (5)	Negatív	Pozitív (3)	Pozitív (5)	GIST	Kis
5. Gyomor	1,5cm	<5	Leiomyoma	Pozitív (5)	Pozitív (5)	Negatív	Negatív	Leiomyoma	-
6. Gyomor	1,2cm	<5	Leiomyoma	Pozitív (5)	Pozitív (5)	Negatív	Negatív	Leiomyoma	-
7. Gyomor	1,4cm	<5	Leiomyoma	Pozitív (5)	Negatív	Pozitív (3)	Pozitív (5)	GIST	Nagyon kis
8. Gyomor	1,9cm	<5	Leiomyoma	Pozitív (5)	Negatív	Negatív	Pozitív (5)	GIST	Nagyon kis
9. Gyomor	1,2cm	<5	Leiomyoma	Pozitív (5)	Negatív	Pozitív (3)	Pozitív (5)	GIST	Nagyon kis
10. Vékonybél	7,5cm	>5	Leiomyosarcoma	Pozitív (5)	Negatív	Pozitív (5)	Pozitív (5)	GIST	Nagy
11. Vékonybél	5cm	>5	Leiomyosarcoma	Pozitív (5)	Negatív	Pozitív (5)	Pozitív (5)	GIST	Nagy
12. Vékonybél	5,6cm	>5	Leiomyosarcoma	Pozitív (5)	Negatív	Pozitív (5)	Pozitív (5)	GIST	Nagy
13. Vékonybél	6,3cm	>5	Leiomyosarcoma	Pozitív (5)	Negatív	Pozitív (5)	Pozitív (5)	GIST	Nagy



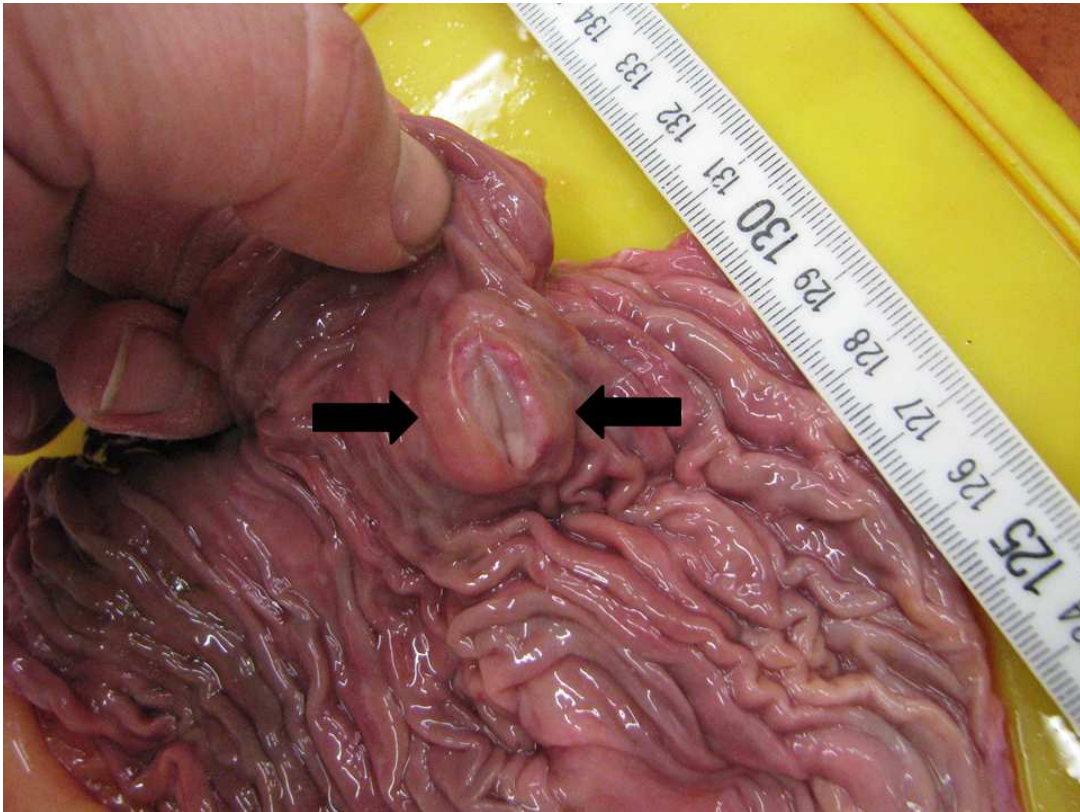
14. Vékony bél	8cm	>5	Leiomyosarcoma	Pozitív (5)	Negatív	Pozitív (5)	Pozitív (5)	GIST	Nagy
15. Vékony bél	4,5cm	>5	Leiomyosarcoma	Pozitív (5)	Negatív	Pozitív (5)	Pozitív (5)	GIST	Nagy

**2.Táblázat:** A vizsgálatok eredményei

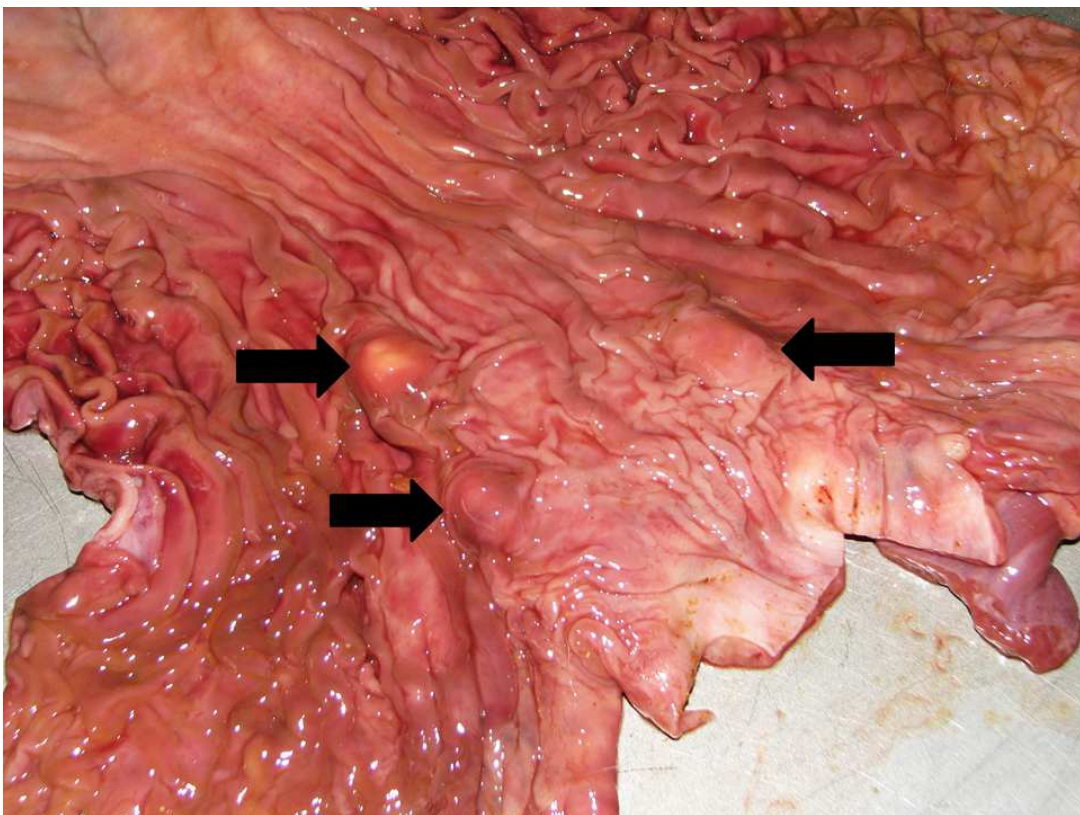
Immunhisztokémiai vizsgálataink eredményeit a 2. táblázatban foglaltuk össze, és azokat mikroszkópos felvételekkel mutatjuk be.



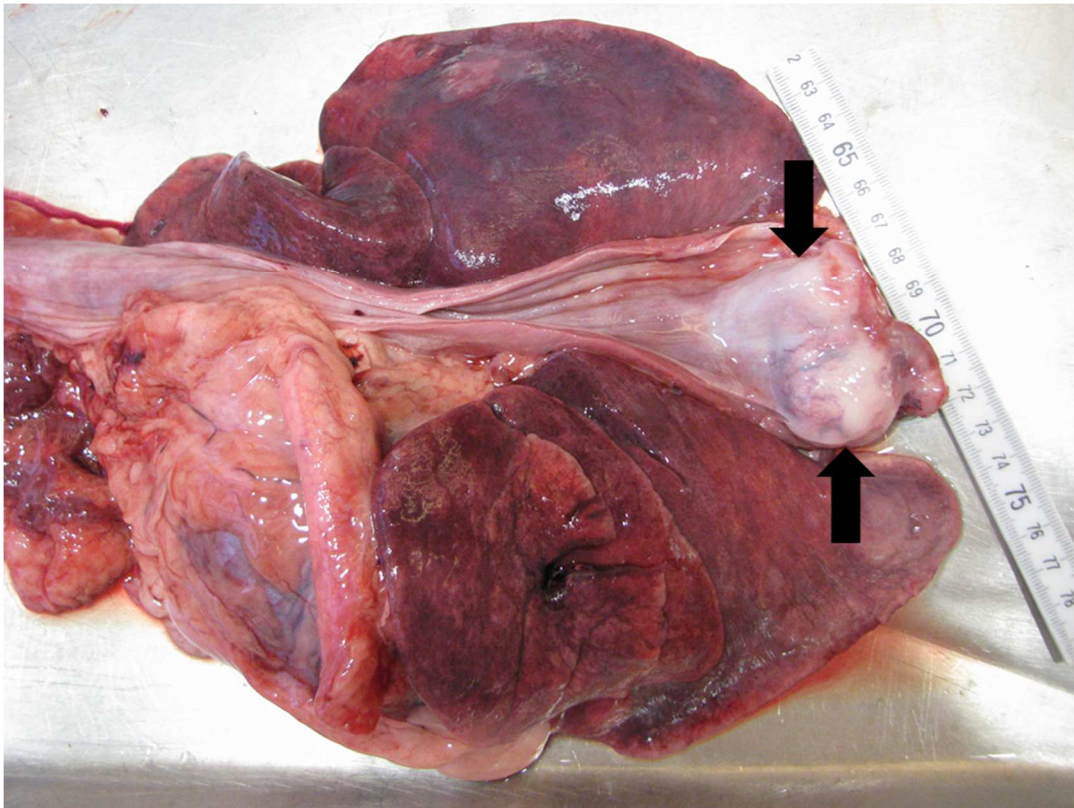
**6. ábra:** Szervminta formalinban



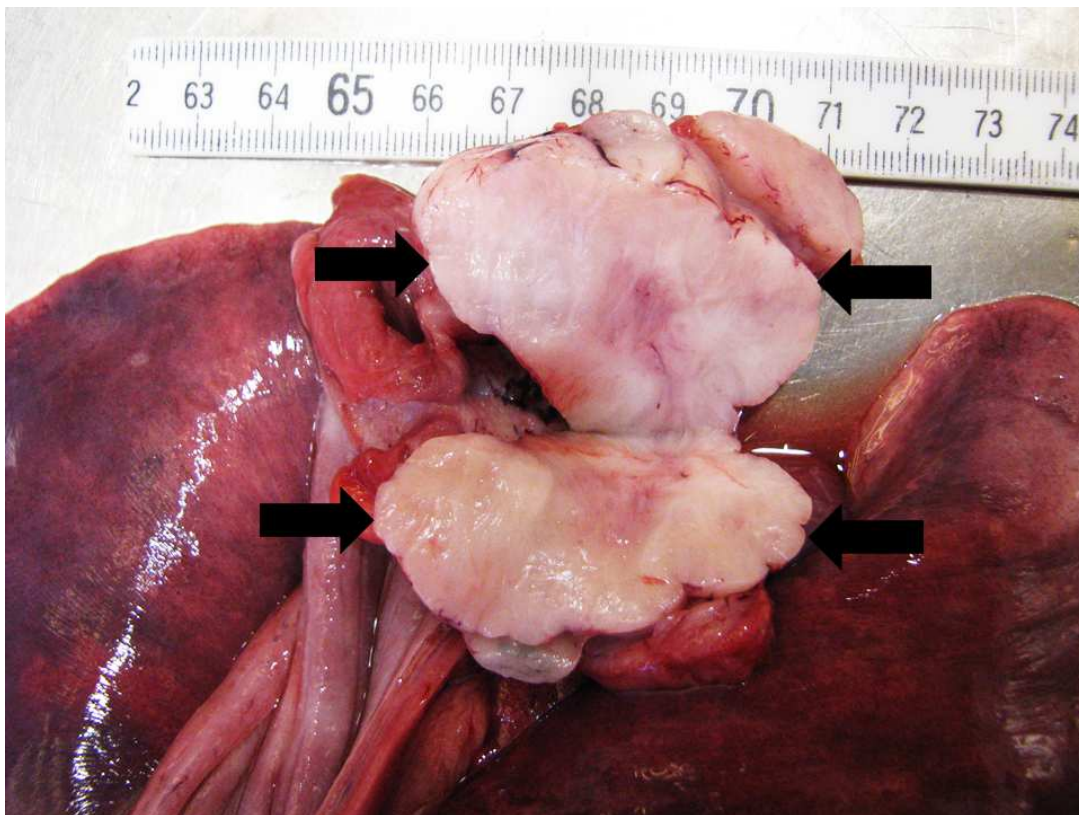
7. ábra: Solitaer gyomordaganat. A daganat állományában vérzés és elhalás nem látható.



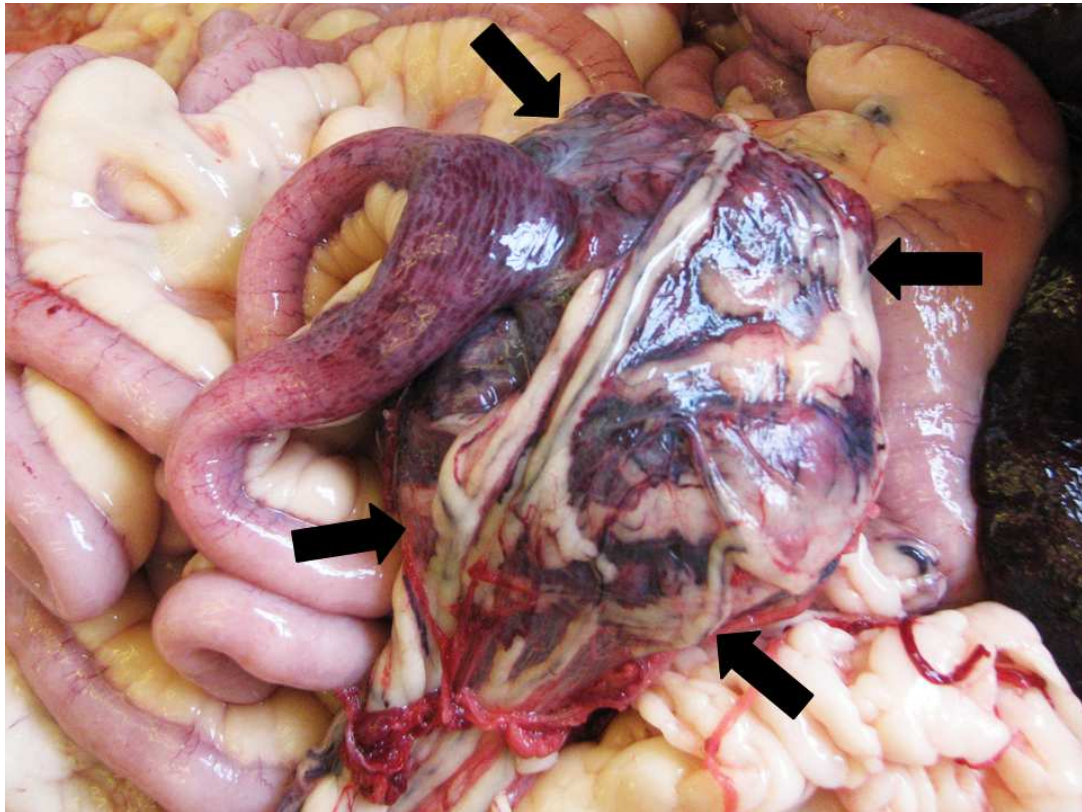
8. ábra: Multiplex GIST a gyomor fundusi területén.



**9. ábra:** Solitaer nyelősődaganat a distalis szakaszon.



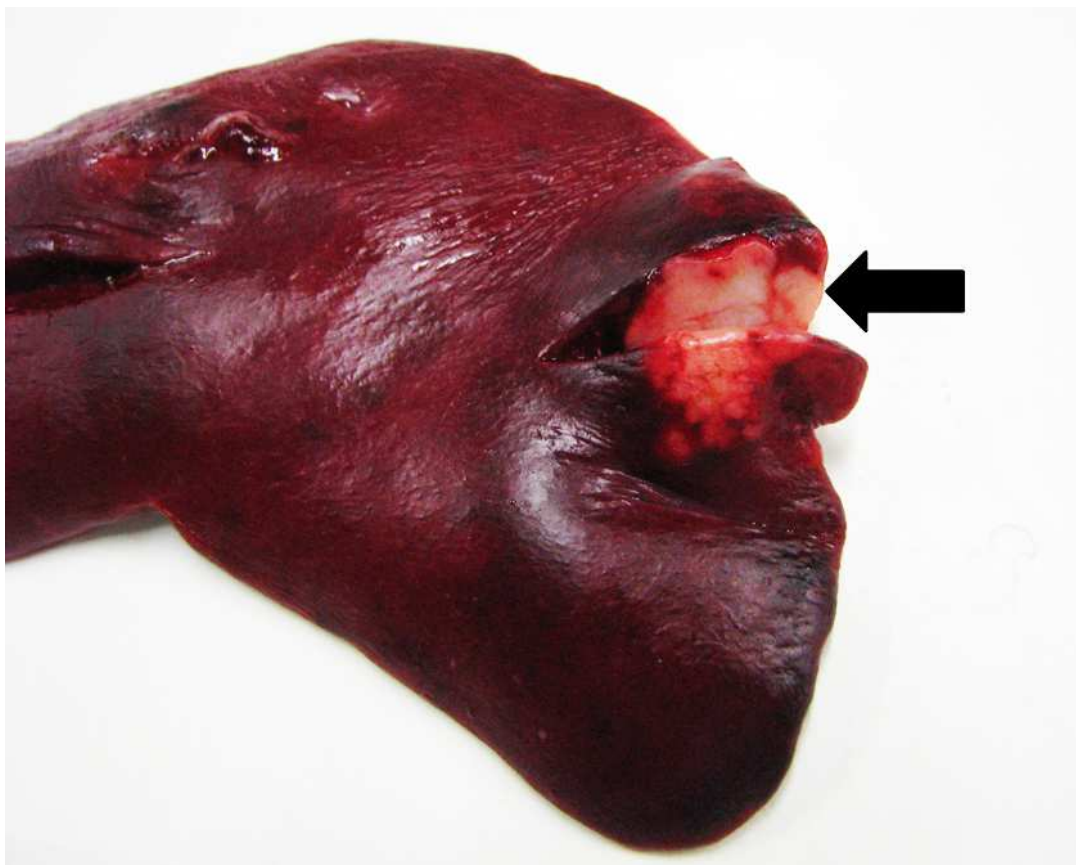
**10. ábra:** A nyelőső GIST metszészlapja. Elhalás és vérzés nem látható, mérsékelt érújdonsképződés.



**11. ábra:** Cseppessel fedett daganat a jejunum falában.

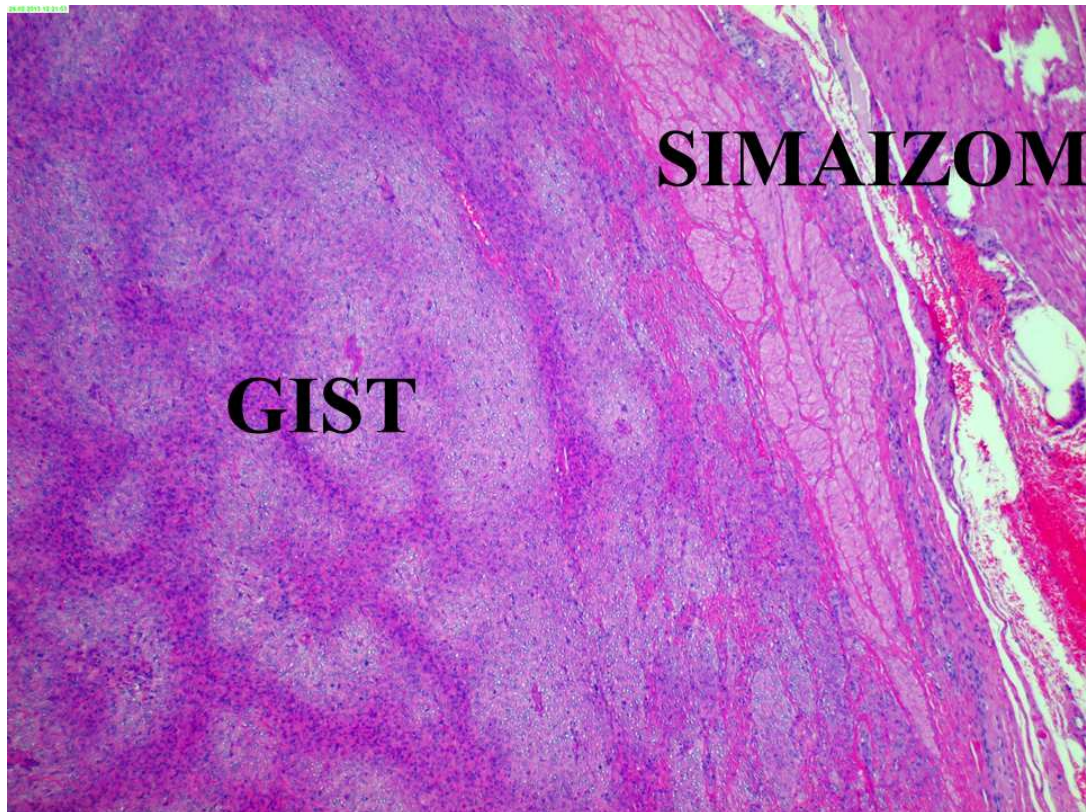


**12. ábra:** A vékonybél daganat metszészlapja. Kifejezetten nagymértékű vérzés és elhalás látható.

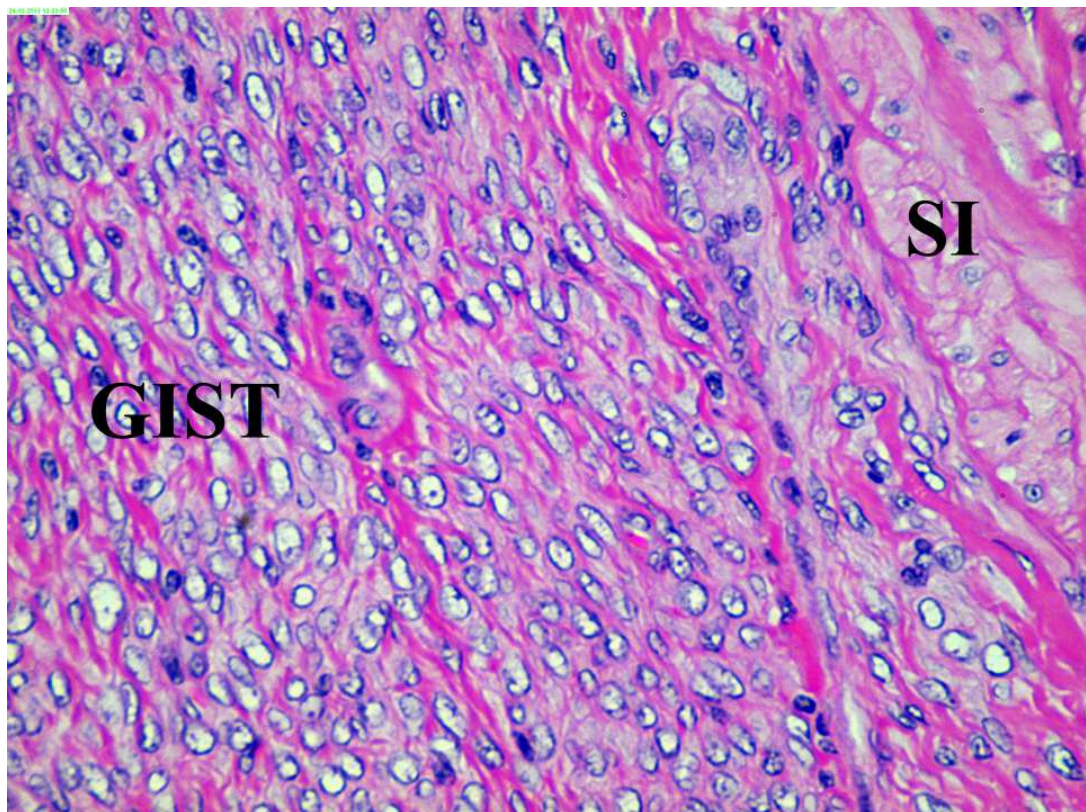


**13. ábra:** Bél eredetű GIST lépáttéte

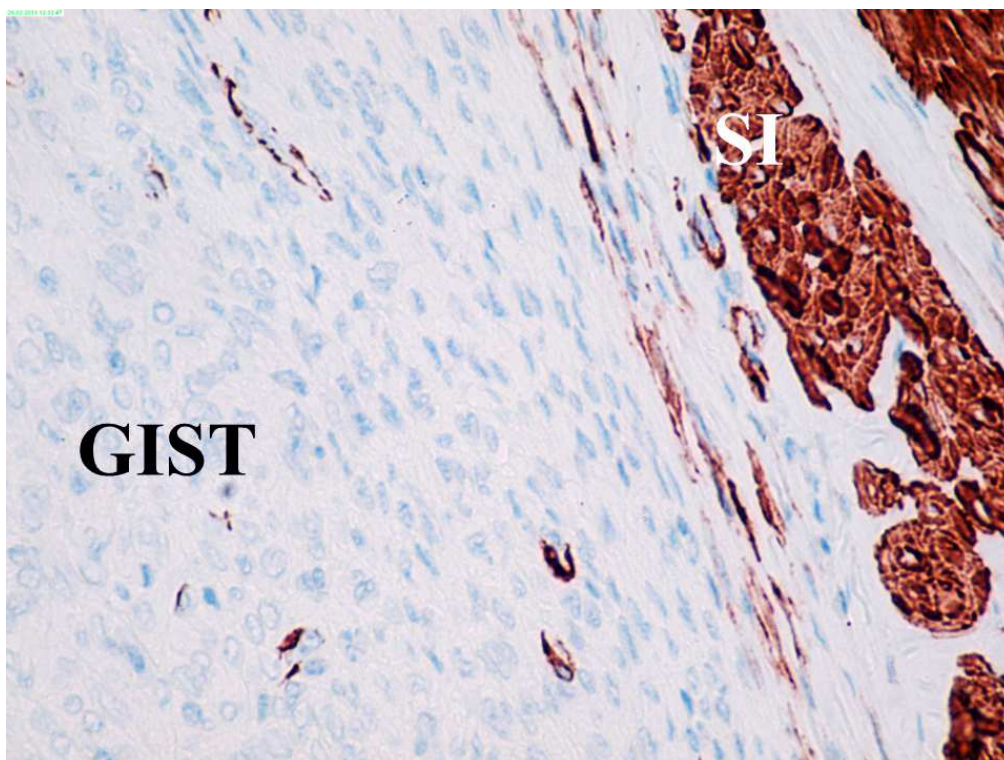
Tanulmányunk során valamennyi daganat vimentin pozitivitást mutatott. Két gyomordaganat (az összes tumor 13,33%-a) volt  $\alpha$ -SMA-pozitív, ill. S-100 protein- és c-Kit (CD117)-negatív. Ezeket a daganatokat, az eredeti kórszövettani diagnózissal megegyezően, leiomyomaként azonosítottuk. A többi bélfali tumor (13/15; 86,67%)  $\alpha$ -SMA-negatívnak, c-Kit-pozitívnak, ill. egy kivételével (12/15; 80%) S-100 protein-pozitívnak bizonyult. A 13 c-Kit-pozitív daganatot, amelyek korábbi kórszövettani diagnózisa gastricus leiomyoma (n = 6), intestinalis leiomyosarcoma (n = 6) és oesophagealis leiomyosarcoma (n = 1) volt, újraosztályoztuk (reklasszifikáltuk) gastrointestinalis stromalis tumorként, valamint a humánorvosi rizikócsoportosítás alapján (2) különböző csoportokba soroltuk.



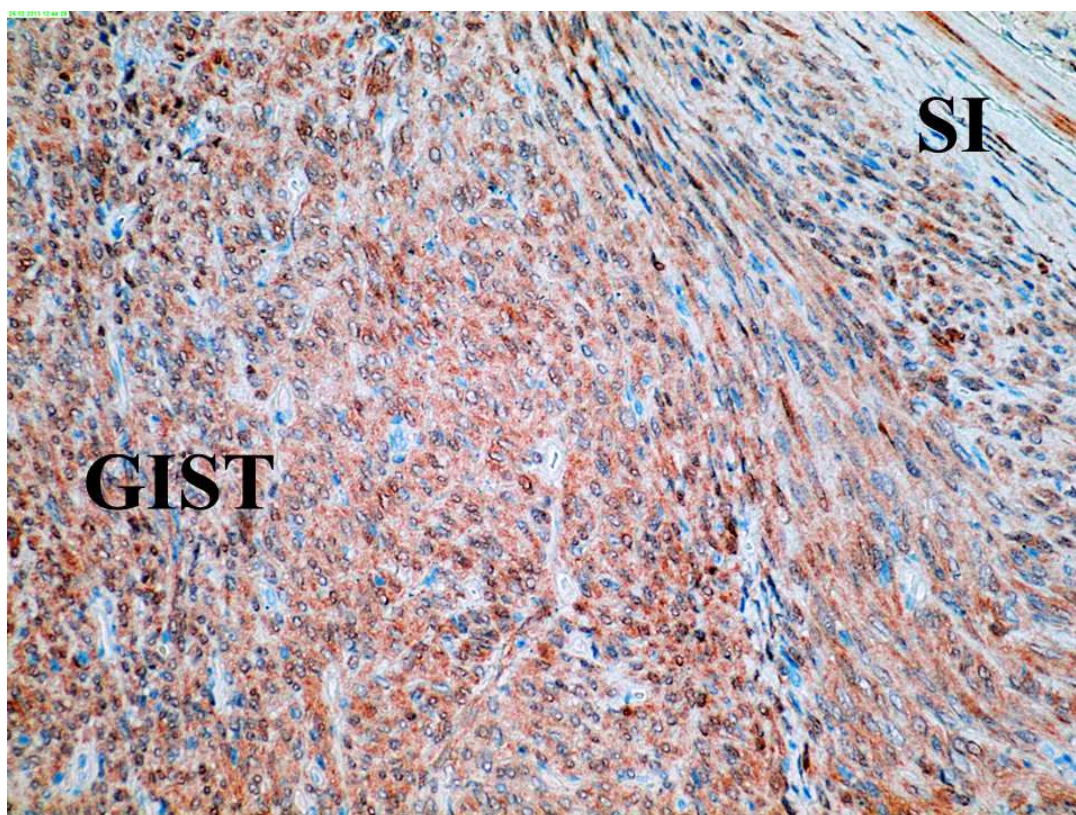
**14. ábra:** Mikroszkópos felvétel a vékonybél eredetű GIST-ről (SI= bélfali simaizomszövet), H.-E.



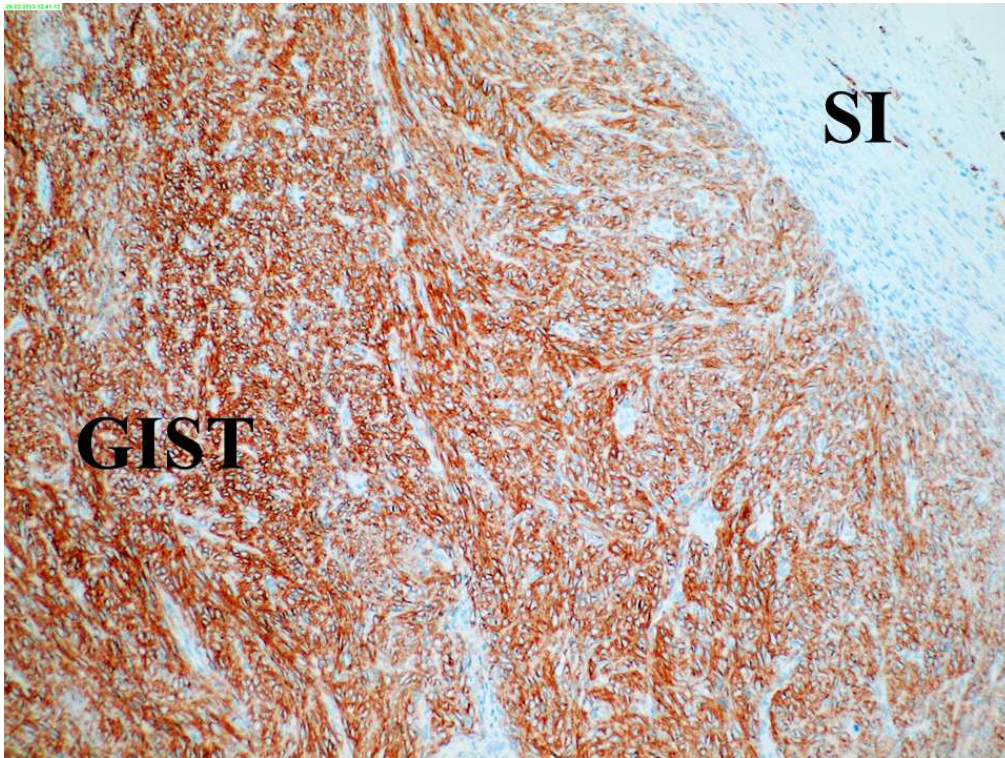
**15. ábra:** Nagy nagyítású felvétel a vékonybél eredetű GIST-ről (SI= bélfali simaizomszövet), H.-E. 400X



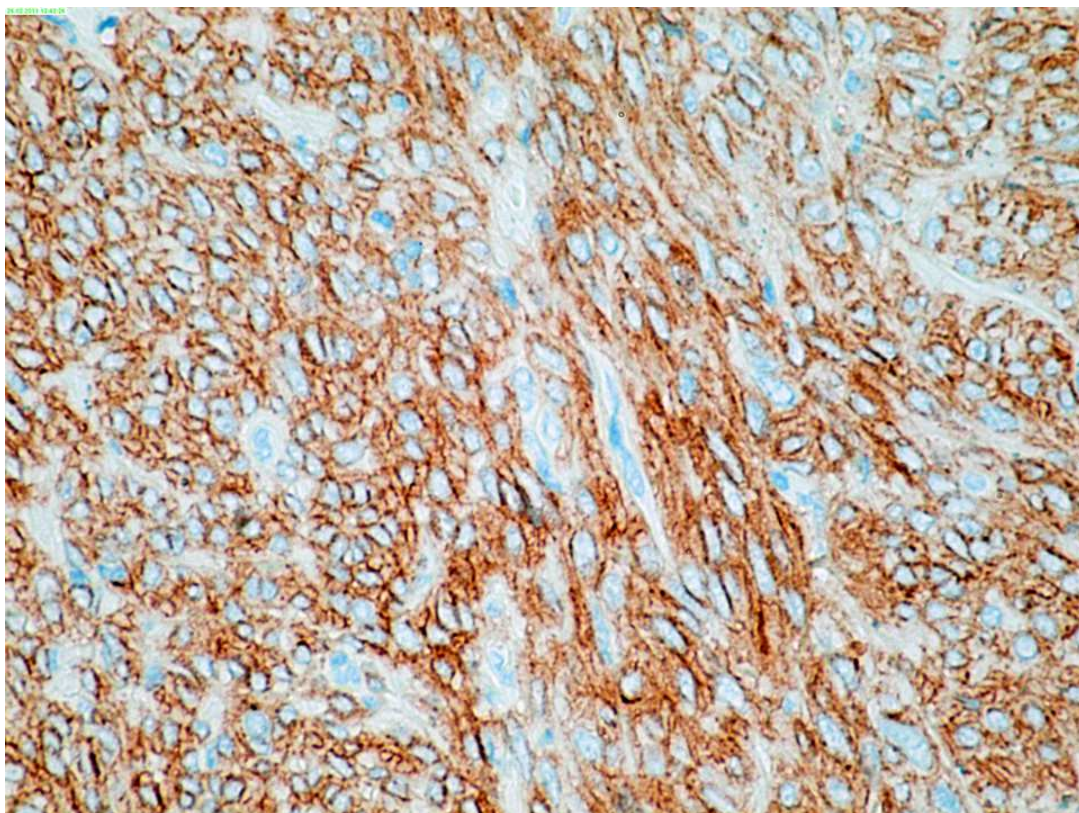
**16. ábra:**  $\alpha$ -SMA-negativitás a daganatban (GIST), ill.  $\alpha$ -SMA-pozitivitás a tunica muscularisban (SI: barna színreakció; belső pozitív kontroll), IH., 400 $\times$



**17. ábra:** S-100 protein-pozitivitás a daganatban (GIST; barna színreakció), ill. S-100 protein-negativitás a tunica muscularisban (SI: belső negatív kontroll), IH., 200 $\times$



**18. ábra:** c-Kit (CD117)-pozitivitás a daganatban (GIST: barna színreakció), ill. c-Kit-negativitás a tunica muscularisban (SI: belső negatív kontrol), IH., 100×



**19. ábra:** Nagyobb nagyítású felvétel a c-Kit-pozitív GIST-ről, IH., 400×



Amint a 12-es és 13-as ábrán látható a GIST semmiféle specifikus tulajdonságot nem mutat H.-E. festéssel. Láthatóak elpusztult vagy az osztódás különböző fázisaiban lévő orsó alakú sejtek, de ez a mikroszkópos látélet nem különbözik az LM-ától és LMS-étől. Az anti-  $\alpha$  -SMA-val festett metszet már többet mutat, hiszen a daganat nem festődik bizonyítva azt, hogy nem simaizom eredetű. LM vagy LMS esetén a tumorszövet festődött volna  $\alpha$ -SMA-val. A GIST, ellentétben az SI-vel festődik S-100-zal is, ami neurogén eredetre utal. Önmagában sajnos ez az eljárás sem használható kizárólagosan a GIST diagnosztikában, hiszen a bélben előfordulhatnak más idegsejt eredetű tumorok (pl. schwannoma, neurofibroma, neurofibrosarcoma stb...), amik szintén pozitívak lennének S-100-ra. Biztos diagnózist tehát csak a c-Kit pozitivitás ad, mellyel az emésztőtraktusban előforduló más tumorok és a simaizom is negatív, a GIST viszont egyértelműen festődik.

## 5. MEGBESZÉLÉS

A gastrointestinalis stromalis tumor először a humánorvosi területen felismert, ill. leírt, csak immunhisztokémiai vizsgálattal azonosítható, elsősorban a gyomor és bélrendszerben előforduló, a légyszöveti sarcomák csoportjába tartozó daganat (4). E tumor olyan prekursor őssejtekből fejlődik ki, amelyek ún. interstitialis Cajal-sejtekké differenciálódnak. A Cajal-sejtek, mint intestinalis pacemaker sejtek biztosítják élettani körülmények között a gyomor-bélcsatorna autonóm mozgását. Szövettanilag a bélfali izomrostok és az idegrostok között helyezkednek el, a plexus myentericusban és akörül (1, 7, 18, 21). Elnevezésüket SANTIAGO RAMON Y CAJAL (1852–1934) spanyol patológusról kapták, aki kórszövettannal és idegkutatással foglalkozott (19). Hasonló megjelenésű, eltérő immunfenotípusú (CD34-pozitív/c-Kit-negatív), a gyomor-bélrendszerben fellelhető sejtek a telocyták vagy interstitialis Cajal-sejt szerű sejtek (17).

A gyomor-bélcsatorna mesenchymalis daganatait a fénymikroszkópos megjelenés jellegzetességei alapján a szakirodalomban hosszú időn keresztül leiomyogen (simaizom eredetű) vagy neurogen (idegszövet eredetű) daganatként osztályozták. MAZUR és CLARK 1983-ban vezette be a gastrointestinalis stromalis tumor (GIST) elnevezést az onkológiai diagnosztikába, utalva arra, hogy ezek a tumorok a plexus myentericusból indulnak ki (11).

A közelmúltban leírt GIST-ben fontos a jó-, ill. a rosszindulatúság megítélése. Jelenleg a FLETCHER és mtsai (2002) által ajánlott besorolást alkalmazzák. A daganat méretének, az osztódó sejtek számának, a tumoron belüli elhalásnak, a szöveti atípiának együttes értékelésével 3 csoportot különítenek el (2):

- nagyon kis rizikójú (átmérő: < 2 cm; osztódó sejtek száma < 5/50 nagy nagyítású, 200× látótér [továbbiakban: NNL]);
- kis rizikójú (átmérő: 2–5 cm; osztódó sejtek száma < 5/50 NNL), közepes (átmérő: < 5 cm; osztódó sejtek száma 6–10/50 NNL, vagy átmérő: 5–10 cm; osztódó sejtek száma < 5/50 NNL);
- nagy rizikójú (átmérő: > 5 cm; osztódó sejtek száma > 5/50 NNL, vagy átmérő: > 10 cm; osztódó sejtek száma: bármennyi, vagy átmérő: bármekkora; osztódó sejtek száma > 10/50 NNL).

Leírtak már a bélfodorból, a csepleszből, a retroperitoneumból kiinduló, extragastrointestinalis helyeződésű GIST-t is (16). A tumor kórszövettanilag lehet orsósejtes, epitheloid sejtes és kevert típusú. A GIST-t, az emésztőtraktus falában kialakuló egyéb orsósejtes tumoroktól, a leiomyomától, a leiomyosarcomától, a fibromától, a fibrosarcomától, a myxomától, a myxosarcomától, a fibromyxomától, a perifériás ideghüvely daganatoktól (a benignus schwannomától, a perineuriomától, a neurofibromától, a malignus schwannomától, a neurofibrosarcomától), az orsósejtes melanomától és carcinomától, az inflammatoricus myofibroblastos tumortól, a pericytomától, a differenciálatlan liposarcomától, a malignus fibrosus histiocytomától, a gastrointestinalis endocrin tumoroktól, a paragangliomától és a sclerotisáló mesenteritistől kell immunhisztokémia segítségével elkülöníteni (15). Az elkülönítő kórjelzést segítő ellenanyagok az anti-c-Kit (CD117) és az anti-DOG-1 (12).

Jelen immunhisztokémiai vizsgálataink során 15, kutyából származó gyomor, vékonybél és egy nyelőcső eredetű, korábban kórszövettanilag leiomyomának, ill. leiomyosarcomának diagnosztizált daganatot vizsgáltunk meg anti-vimentin, anti- $\alpha$ -SMA, anti-S-100 protein és anti-c-Kit ellenanyagok segítségével. A sejteredetet megbízhatóan azonosító molekuláris patológiai módszer, az immunhisztokémia, a 15 megvizsgált daganatból a c-Kit-pozitivitás miatt 13 eset újraosztályozását, a korábbi kórszövettani diagnózis (simaizom eredetű daganat), gastrointestinalis stromalis tumorrá történő módosítását eredményezte. Tapasztalataink felhívják a figyelmet arra, hogy a kutyák emésztőcsövének területéről származó, orsósejtes daganatok korrekt, patológiai vizsgálatához nem elegendő a hematoxin és eozin alapú kórszövettani elemzés. Minden esetben a pontos sejteredet, a tumor szövettani típusának meghatározása legalább négy antitestből (anti-vimentinből, anti- $\alpha$ -SMA-ból, anti-S-100 proteinből és anti-c-Kit-ből) álló immunhisztokémiai panelt igényel. Ezekre alapozva lehet színvonalas állatorvosi szakmai véleményt alkotni, elfogadható közleményt, ill. előadást bemutatni, amely alapot ad a gyakorló állatorvosi munkához is.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Tanulmányunkban 15, kutyából származó, hematoxin-eozin festés alapján leiomyomaként és leiomyosarcomaként leletezett (első diagnózis), gyomor (n = 8; leiomyoma), vékonybél (n = 6; leiomyosarcoma) és nyelőcső eredetű (n = 1; leiomyosarcoma), necropsiás lágyszöveti mintát vizsgáltunk meg indirekt immunhisztokémiai módszerrel. A felhasznált immunhisztokémiai panel a következő antitestekből állt: anti-vimentin, anti-SMA, anti-S-100 protein, és anti-c-Kit (CD117). Munkánk során valamennyi daganat vimentinpozitivitást mutatott. Két gyomordaganat (2/15; 13,33%) volt  $\alpha$ -SMA-pozitív, ill. S-100 protein- és c-Kit-negatív. Ezeket az első (kórszövettani) diagnózissal megegyezően, leiomyomának nyilvánítottuk. A többi tumor (13/15; 86,67%) c-Kit-, egy kivételével (12/15; 80%) S-100 proteinpozitív, ill.  $\alpha$ -SMA-negatív (13/15; 86,67%) bizonyult. A c-Kit-pozitív 13 daganatot, amelyek első (kórszövettani) diagnózisa gyomor leiomyoma (n = 6), vékonybél leiomyosarcoma (n = 6) és nyelőcső leiomyosarcoma (n = 1) volt, újraosztályoztuk gastrointestinalis stromalis tumorként (GIST). A vizsgálat eredménye alapján javasoljuk a kutyák emésztőtraktusából származó sebészi vagy necropsiás, orsósejtes megjelenésű minták anti-vimentin, anti- $\alpha$ -SMA, anti-S-100 protein és anti-c-Kit ellenanyagokra alapozott immunhisztokémiai vizsgálatát a pontos diagnózis érdekében.

## 7. SUMMARY

In the present immunohistochemical study the author reanalyses 15 gastric (n = 8), intestinal (n = 6), and oesophageal (n = 1) canine soft tissue necropsy samples (Figures 1-4.), which were initially diagnosed as leiomyoma (gastric), and leiomyosarcoma (intestinal, oesophageal), based on light microscopic analysis of the haematoxylin and eosin stained slides (Figure 5.). The immunohistochemical panel consisted of anti-vimentin, anti- $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), anti-S-100 protein, anti-c-Kit (CD117) (Table 1.). All tumours showed vimentin-positivity. Two gastric tumours (2/15; 13.33%) were positive for  $\alpha$ -SMA, and were negative for S-100 protein and c-Kit. These tumours, according to the first (histological) diagnosis, were histopathological declared leiomyoma. The other tumours (13/15; 86.67%) were c-Kit-positive, and except for one (12/15; 80%) were S-100 protein-positive, furthermore all these tumours (13/15; 86.67%) were  $\alpha$ -SMA-negative (Figures 6–9.). Based on immunohistochemical analysis the definitive, revised diagnosis of the c-Kit-positive 13 tumours ([first, histological diagnosis was gastric leiomyoma, n = 6]; [first, histological diagnosis was intestinal leiomyosarcoma, n = 6]; [first, histological diagnosis was oesophageal leiomyosarcoma, n = 1]) was gastrointestinal stromal tumour (Table 2.). The author suggests the immunohistochemical analysis, with anti-vimentin, anti- $\alpha$ -SMA, anti-S-100 protein, and anti-c-Kit antibodies of the canine fusocellular soft tissue biopsy, necropsy samples, for the correct definitive diagnosis.

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném elsősorban megköszönni témavezetőmnek **Dr. Jakab Csabának** a felajánlott témát, a sok közös kutatást és munkát, amely során sok, a jövőben is használható tudással gazdagodtam.

Köszönöm **Prof. Dr. Rusvai Miklósnak** a Patológiai Tanszék vezetőjének, hogy engedélyével hozzájárult a tanszéken készített szakdolgozatomhoz.

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik munkájukkal és tanácsaikkal segítették jelen dolgozat elkészítését: **Pekár Magdolnának** és **Gregor Viktóriának**, akik az immunhisztokémiai vizsgálatokban adtak nélkülözhetetlen segítséget, ill. **Pop Renátának** aki a kórszövettani metszetek elkészítésében, festésében segített nekünk.

## 9. Irodalomjegyzék

1. CRETOIU, D. – CRETOIU, S. M. ET AL.: TELOCYTES, A DISTINCT TYPE OF CELL AMONG THE STROMAL CELLS PRESENT IN THE LAMINA PROPRIA OF JEJUNUM. *HISTOL. HISTOPATHOL.*, 2012. 27. 1067–1078.
2. FLETCHER, C. D. M. – BERMAN, J. J. ET AL.: DIAGNOSIS OF GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS: A CONSENSUS APPROACH. *HUM. PATHOL.*, 2002. 33. 459–465.
3. FROST, D. – LASOTA, J. – MIETTINEN, M.: GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS AND LEIOMYOMAS IN THE DOG: A HISTOPATHOLOGIC, IMMUNOHISTOCHEMICAL, AND MOLECULAR GENETIC STUDY OF 50 CASES. *VET. PATHOL.*, 2003. 40. 42–54.
4. HIROTA, S. – ISOZAKI, K. ET AL.: GAIN-OF-FUNCTION MUTATIONS OF C-KIT IN HUMAN GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS. *SCIENCE*, 1998. 279. 577–580.
5. JAKAB CS. – SZABÁRA Á. – BENDZSEL D.: A KUTYÁK GYULLADÁSOS MYOFIBROBLASTOS DAGANATÁNAK IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA. *MAGY. ÁLLATORV. LAPJA*, 2014. 136. 300–308.
6. JOENSUU, H. – ROBERTS, P. J. ET AL.: EFFECT OF THE TYROSINE KINASE INHIBITOR STI571 IN A PATIENT WITH AMETASTATIC GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOR. *N. ENGL. J. MED.*, 2001. 344. 1052–1056.
7. KINDBLOM, L. G. – REMOTTI, H. E. ET AL.: GASTROINTESTINAL PACEMAKER CELL TUMOR (GIPACT): GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS SHOW PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF THE INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL. *AM. J. PATHOL.*, 1998. 152. 1259–1269.
8. LANDHERR L.: GASTROINTESTINÁLIS STROMÁLIS TUMOROK (GIST). *GASTUPDATE*, 2006. 123–125.
9. LAROCK, R. G. – GINN, P. E.: IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING CHARACTERISTICS OF CANINE GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS. *VET. PATHOL.*, 1997. 34. 303–311.
10. MAAS, C. P. – TER HAAR, G. ET AL.: RECLASSIFICATION OF SMALL INTESTINAL AND CECAL SMOOTH MUSCLE TUMORS IN 72 DOGS: CLINICAL, HISTOLOGIC, AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION. *VET. SURG.*, 2007. 36. 302–313.
11. MAZUR, M. T. – CLARK, H. B.: GASTRIC STROMAL TUMORS: REAPPRAISAL OF HISTOGENESIS. *AM. J. SURG. PATHOL.*, 1983. 7. 507–519.
12. MIETTINEN, M. – WANG, Z. F. – LASOTA, J.: DOG1 ANTIBODY IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS: A STUDY OF 1840 CASES. *AM. J. SURG. PATHOL.*, 2009. 33. 1401–1408.

13. NANNINI, M. – BIASCO, G. ET AL.: INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR (IGF) SYSTEM AND GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOURS (GIST): PRESENT AND FUTURE. *HISTOL. HISTOPATHOL.*, 2014. 29. 167–175.
14. NATALI, P. G. – NICOTRA, M. R. ET AL.: EXPRESSION OF C-KIT RECEPTOR IN NORMAL AND TRANSFORMED HUMAN NONLYMPHOID TISSUES. *CANCER RES.*, 1992. 52. 6139–6143.
15. OROSZ ZS. – BALÁZS D. – SÁPI Z. – TISZLAVICZ L. – TORNÓCZKY T.: GASTROINTESTINALIS MESENCHYMALIS DAGANATOK ÚJRAOSZTÁLYOZÁSA. *MAGYAR ONKOLÓGIA*, 2006. 50. 287–292.
16. REITH, J. D. – GOLDBLUM, J. R. ET AL.: EXTRAGASTROINTESTINAL (SOFT TISSUE) STROMAL TUMORS: AN ANALYSIS OF 48 CASES WITH EMPHASIS ON HISTOLOGIC PREDICTORS OF OUTCOME. *MOD. PATHOL.*, 2000. 13. 577–585.
17. RUSU, M. C. – POP, F. ET AL.: TELOCYTES FORM NETWORKS IN NORMAL CARDIAC TISSUES. *HISTOL. HISTOPATHOL.*, 2012. 27. 807–816.
18. SANDERS, K. M. – KOH. S. D. – WARD, S. M.: INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL AS PACEMAKERS IN THE GASTROINTESTINAL TRACT. *ANNU. REV. PHYSIOL.*, 2006. 68. 307–343.
19. SHERRINGTON, C. S.: SANTIAGO RAMON Y CAJAL. 1852–1934. OBITUARY NOTICES OF FELLOWS OF THE ROYAL SOCIETY. 1935. 1. 424–425.
20. TSUJIMURA, T. – FURITSU, T. ET AL.: LIGAND-INDEPENDENT ACTIVATION OF C-KIT RECEPTOR TYROSINE KINASE IN A MURINE MASTOCYTOMA CELL LINE P-815 GENERATED BY A POINT MUTATION. *BLOOD*, 1994. 83. 2619–2626.
21. WU, B. – LIU, L. ET AL.: DISTRIBUTION OF INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL IN MERIONES UNGUICULATUS AND ALTERATIONS IN THE DEVELOPMENT OF INCOMPLETE INTESTINAL OBSTRUCTION. *HISTOL. HISTOPATHOL.*, 2013.28. 1567–1575.
22. XU, C. – LIU, Y. L. ET AL.: SYNCHRONOUS AND METACHRONOUS MULTIPLE GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS. *HISTOL. HISTOPATHOL.*, 2012. 27. 225–234.
23. YARDEN, Y. – KUANG, W. J. ET AL.: HUMAN PROTOONCOGENE C-KIT: A NEW CELL SURFACE RECEPTOR TYROSINE KINASE FOR AN UNIDENTIFIED LIGAND. *EMBO J.*, 1987.11. 3341–3351.
24. AZ EGÉSZSÉGÜGYI MINISZTERIUM SZAKMAI PROTOKOLLJA: GASTROINTESTINÁLIS STROMÁLIS TUMOROK (GIST).KÉSZÍTETTE: A SEBÉSZETI SZAKMAI KOLLÉGIUM



25. F. DEL PIERO - B. A. SUMMERS - J. F. CUMMINGS - G. MANDELLI - E. A. BLOMME: Gastrointestinal Stromal Tumors in *Equids*. *Vet Pathol.*. 2001. 38. 689–697
26. Deanna D. Dailey. - E. J. Ehrhart - Dawn L. Duval - Todd Bass - B. E. Powers: DOG1 is a sensitive and specific immunohistochemical marker for diagnosis of canine gastrointestinal stromal tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2015. 27(3). 268-277
27. M. IRIE – Y. TAKEUCHI – Y. OHTAKE – H. SUZUKI – N. NAGATA – T. MIYOSHI – Y. KAGAWA – T. YAMAGAMI: Imatinib Mesylate Treatment in a Dog with Gastrointestinal Stromal Tumors with *ac-kit* mutation. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2015.
28. M. KOBAYASHI – S. KUROKI – K. ITO – A. YASUDA – H. SAWADA – K. ONO – T. WASHIZU – M. ONKOBARA: Imatinib-associated tumour response in a dog with a non-resectable gastrointestinal stromal tumour harbouring a c-kit exon 11 deletion mutation. *The Veterinary Journal*. 2013. 198. 271-274
29. K. HANAZONO – S. FUKUMOTO – K. HIRAYAMA – K. TAKASHIMA – Y. YAMANE – M. NATSUHORI – T. KADOSAWA – T. UCHIDE: Predicting Metastatic Potential of Gastrointestinal Stromal Tumors in Dog by Ultrasonography. *J. Vet. Med. Sci.*. 2012. 74(11): 1477–1482
30. V. Gillespie - K. Baer - J. Farrelly - D. Craft - R. Luong: Canine Gastrointestinal Stromal Tumors: Immunohistochemical Expression of CD34 and Examination of Prognostic Indicators Including Proliferation Markers Ki67 and AgNOR. *Veterinary Pathology*. 2011. 48(1). 283-291