

# Cytologiczna diagnostyka chłoniaków u psów

RAFAŁ SAPIERZYŃSKI\*, JUSTYNA SOKOŁOWSKA

\*Katedra Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-766 Warszawa

Sapierzyński R., Sokołowska J

## Cytological diagnosis of canine lymphomas

### Summary

Malignant lymphomas (ML), actually lymphomas, are common tumors in dogs, outnumbered only by mammary and cutaneous tumors. The existing morphological classifications of canine ML have been based successively on different human classifications, including Rappaport, the Working Formulation and the Kiel classification. The behavior of canine malignant lymphomas is difficult to predict on the basis of histomorphology alone, and thus other advanced techniques are needed in the establishment of prognostic factors. Evaluation of tumors phenotype (B cell and T cells), proliferation rate (mitotic index, Ki67 expression, AgNORs number) in histologic sections is possible and often enables a precise diagnosis. Fine-needle aspiration cytology remains the first line of investigation (screening test) used in all cases of mono- or polylymphadenopathy. It helps to obtain initial diagnosis (lymphoma, metastases, hyperplasia), in staging the disease, in the detection of the recurrence and progression of the neoplastic process. Lymphomas have successfully been classified by FNA cytology, in human medicine the success rate of this procedure ranges from 80% to 90% in the diagnosis of malignant lymphoma and 67.5% to 86% in its subtyping. Cytology is a safer, cheaper, and more rapid procedure than histology, and the owner often disagrees to the surgical procedure essential to obtaining tissue samples. Immunophenotyping, can be successfully established in aspiration biopsy samples of enlarged lymph nodes in dogs with lymphoma. Moreover, the evaluation of the proliferation rate of neoplastic cells by immunocytochemistry or other cytopathologic stains can also be made.

**Keywords:** canine lymphoma, fine needle biopsy, cytopatology, diagnosis

Złośliwe chłoniaki (malignant lymphoma, ML, *lymphosarcoma*), a właściwie chłoniaki (*lymphoma*) to jedne z najczęściej występujących złośliwych nowotworów u psów. Szacuje się, że każdego roku na ten typ guza zachoruje 13-33 na każde 100 000 psów, czyli zachorowalność jest wyższa niż u ludzi (12, 17). Najczęściej chorują osobniki w średnim wieku (średnia wieku według różnych opracowań wynosi 6,3-7,7 roku), zapadalność u obu płci jest jednakowa, natomiast u pewnych ras, m.in. bokserów, berneńskich psów pasterskich, terierów szkockich, basset hound, airedale terierów i buldogów, chłoniaki występują częściej; z kolei wydaje się, że ryzyko rozwoju tych nowotworów u jamników i pomeranianów jest niższe niż w ogólnej populacji psów (7, 8, 23). Właściciele zwierząt zgłaszają się do lekarza najczęściej z powodu niespecyficznych objawów klinicznych, takich jak: osłabienie, utrata łaknienia, duszność, a badanie fizykalne ujawnia zazwyczaj uogólnione lub regionalne powiększenie węzłów chłonnych (7). W takich przypadkach następnym krokiem postępowania jest badanie cytologiczne powiększonych węzłów chłonnych (21).

Badanie cytopatologiczne (biopsja cienkoigłowa – BC) jest szybką, technicznie łatwą, mało inwazyjną

i niedrogą metodą rozpoznawania nowotworów z tkanki limfatycznej u psów (7, 8, 15, 17, 19, 23, 25, 26). U ludzi badanie cytologiczne pozwala na rozpoznanie chłoniaków niezłośliwych w 80-90%, a w 67-86% przypadków możliwe jest określenie typu chłoniaka (3). Biopsja cienkoigłowa jest doskonałą, czułą i specyficzną metodą oceny stanu regionalnych węzłów chłonnych pod kątem obecności przerzutów nowotworowych. Pozwala także na wybranie najbardziej reprezentatywnego węzła chłonnego do biopsji chirurgicznej i badania histopatologicznego, ocenę zasięgu procesu nowotworowego, a także umożliwia analizę przebiegu choroby po zastosowanym leczeniu (3, 13, 15, 16, 25, 26). Określenie na podstawie badania cytopatologicznego typu bądź podtypu chłoniaka u psów daje możliwość oceny podatności na leczenie, okresu przeżycia oraz czasu trwania pierwszej remisji.

W celu ustalenia pewnych kryteriów niezbędne jest badanie histopatologiczne całego węzła chłonnego lub jego wycinka pobranego w czasie zabiegu operacyjnego. Niestety, wielu właścicieli rezygnuje z dalszej diagnostyki i leczenia, gdy dowiaduje się o potrzebie przeprowadzenia zabiegu w znieczuleniu ogólnym (5-7).

Bardzo ważne dla uzyskania precyzyjnego rozpoznania jest prawidłowe pobranie materiału, wykonanie rozmazów, ich utrwalenie i barwienie. Istotny też jest wybór węzła chłonного/węzłów chłonnych, który/które ma być poddany badaniu. Materiał do badań można pozyskać, wykonując biopsję aspiracyjną cienkoigłową (BAC), biopsję nieaspiracyjną cienkoigłową (BNC), nakłucie jam ciała i pobranie płynów lub popłuczyn z drzewa oskrzelowego (5-7, 23, 28). Materiał do badania cytopatologicznego można też pozyskać, wykonując odciski z powierzchni przekroju węzłów chłonnych pobranych w czasie zabiegu operacyjnego i przeznaczonych do badania histopatologicznego. Do wykonania BC niezbędny jest tylko podstawowy sprzęt, zwierzę nie musi być przygotowane do badania w jakiś szczególny sposób. W każdym przypadku materiał pobiera się z kilku węzłów, najlepiej z kilku węzłów chłonnych i wykonuje rozmazy na szkiełkach podstawowych (w przypadku uogólnionego powiększenia z co najmniej dwóch węzłów; 4, 5). Rozmazy z pobranego materiału można wysuszyć, utrwalić w roztworze acetonu i formaliny i zabarwić metodą May-Grunewalda-Giemsy (MGG) i w takiej postaci przesłać do badania mikroskopowego (4-7).

### Cytologiczna klasyfikacja chłoniaków

Istnieje wiele systemów klasyfikacji ML wykorzystujących różne kryteria podziału. Najprostsza kliniczno-anatomiczna klasyfikacja dzieli wszystkie formy chłoniaka na typy w zależności od lokalizacji procesu chorobowego i możliwa jest do określenia za pomocą podstawowego warsztatu diagnostycznego (badania obrazowe, biopsja cienkoigłowa). Według tej klasyfikacji obserwuje się następujące formy chłoniaków: formę wielogniskową (multicentryczna), pokarmową (trawienne), grasiczą, krezkową, skórną oraz inne rzadsze formy chłoniaka. Niestety, klasyfikacja ta nie daje wskazówek odnośnie do leczenia i rokowania dla chorych psów.

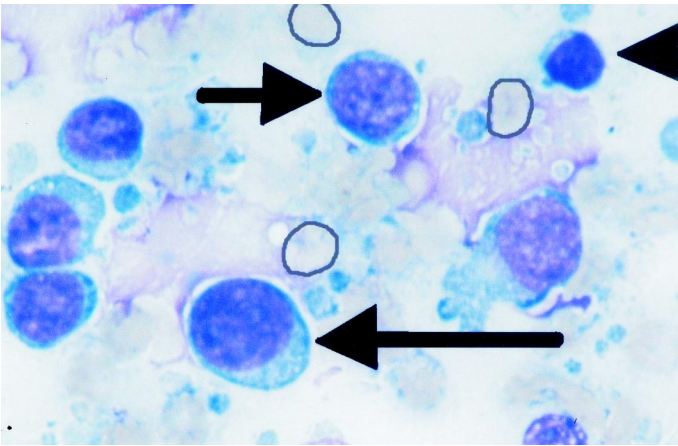
Kolejne klasyfikacje stosowały czysto morfologiczne kryteria oceny rozrostu nowotworowego; należały tu klasyfikacje: Rappaporta, Lukesa i Collinsa, Opracowanie Robocze (Working Formulation, WF), klasyfikacja kilońska – KK (cyt. 6). Dzięki wprowadzeniu kryteriów cytohistologicznych i immunologicznych udoskonalono klasyfikację kilońską (14) oraz wprowadzono klasyfikację REAL (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasm; 9).

W ostatnio przeprowadzonych badaniach patomorfologicznych, oceniających przydatność badania cytopatologicznego w rozpoznawaniu chłoniaków u psów podkreśla się zalety uaktualnionej klasyfikacji kilońskiej (5, 19, 22). Zastosowanie tego systemu pozwala zakwalifikować rozpoznany cytologicznie rozrost do grupy chłoniaków o niskiej lub wysokiej złośliwości. Wykazano, że wyniki badania cytopatologicznego wykonane w oparciu o system kiloński, cechują się dużą zgodnością, tak pomiędzy oceniającymi go pato-

logami, jak i przy powtórnej analizie przez tego samego patologa (22). Opracowanie Robocze, które uwzględnia strukturę histologiczną zajętego węzła chłonного, choć wprowadza dodatkową podgrupę chłoniaków o pośrednim stopniu złośliwości, wydaje się mniej przydatne w analizie cytologicznej. Ponadto, ograniczenie zastosowania klasyfikacji WR wynika z faktu, że ujęte w tym systemie chłoniaki o budowie grudkowej, u psów bywają stwierdzane bardzo rzadko (8). W jednym z badań typ chłoniaka określony na podstawie klasyfikacji kilońskiej był istotnym czynnikiem prognostycznym, ponieważ był skorelowany z czasem trwania remisji leczonych psów. Prawdopodobieństwo uzyskania całkowitej remisji choroby po chemioterapii było znacząco wyższe u osobników z chłoniakami o wysokiej złośliwości niż u zwierząt, u których stwierdzono obecność chłoniaków o niskiej złośliwości (23). Z kolei czas pojawienia się nawrotu choroby był krótszy w przypadku zmian o wysokiej złośliwości (23). Inni autorzy także stwierdzili znaczenie prognostyczne (całkowity czas przeżycia) tego systemu klasyfikacji zarówno u psów leczonych, jak i pozostawionych bez leczenia (11).

Założeniem klasyfikacji kilońskiej, tak u ludzi, jak i psów jest fakt, że rozwój chłoniaka jest wynikiem trwałego bądź czasowego zablokowania różnicowania komórek limfoidalnych na pewnym etapie rozwoju i ich akumulacji w postaci monomorficznej populacji nowotworowej. Stąd też system kiloński opiera się na podobieństwie morfologicznym komórek nowotworowych do komórek powstających w czasie prawidłowego procesu powstawania, dojrzewania i aktywacji limfocytów, a także rozgraniczeniu pomiędzy chłoniakami z limfocytów B oraz T (5, 7). W związku z tym, że KK była przeznaczona do oceny chłoniaków u ludzi, istnieją pewne trudności w zastosowaniu tego systemu klasyfikacji do chłoniaków u psów. U tych zwierząt rozpoznaje się pewne typy nowotworów, które nie były stwierdzane u ludzi, jak np. odmiany chłoniaków o niskiej złośliwości z komórek małych czy chłoniaki z komórek średnich z dużymi jąderkami. Te i jeszcze inne typy rozrostów limfoidalnych ujęto w KK i zaadaptowano ten system podziału do klasyfikacji chłoniaków u psów, jakkolwiek w dalszym ciągu pozostaje on niekompletny i wymaga dalszego doprecyzowania (6).

Do kryteriów morfologicznych w ocenie preparatów cytologicznych należą: wielkość i kształt jąder komórkowych, gęstość i rozmieszczenie chromatyny jądrowej, wielkość, wygląd i rozmieszczenie jąder komórkowych, ilość, stopień zasadochłonności cytoplazmy, a także jej rozmieszczenie względem jądra komórkowego (4, 21). Wielkość jąder komórkowych ocenia się porównując ich średnicę do średnicy erytrocytów, przyjmuje się że komórki małe posiadają średnicę jądra komórkowego mniejszą niż średnica dwóch erytrocytów, komórki średnie – jądro o średnicy dwóch krwinek czerwonych, a średnica jądra ko-



Ryc. 1. Limfocyt mały (grot strzałki), średni (strzałka krótka) i duży (strzałka długa), barwienie barwnikiem Giemsa, pow. 1000 ×

mórek dużych jest większa niż średnica dwóch erytrocytów (ryc. 1).

Jak już wspomniano, chłoniaki są rozrostami klonalnymi, jednak mimo klonalności procesu nowotworowego rzadko w obrazie mikroskopowym obserwuje się monomorfizm komórkowy. Najczęściej oprócz dominującego rodzaju komórek nowotworowych obserwuje się także w mniejszej lub większej liczbie inne stadia rozwojowe komórek limfoidalnych, co jest konsekwencją pewnego różnicowania się komórek nowotworowych lub wynika z obecności populacji komórek prawidłowych. Przyjmuje się, że stwierdzenie w rozmazie cytologicznym powyżej 50% niedojrzałych komórek pochodzenia limfoidalnego lub komórek blastycznych upoważnia do postawienia rozpoznania chłoniaka (cyt. 1, 4, 6, 26). Oczywiście, w przypadku chłoniaków limfocytarnych w obrazie przeważać będą dojrzałe formy limfocytów. Niekiedy jednak cytologiczne rozpoznanie nowotworu nie jest możliwe i lekarz klinicysta otrzymuje wynik opisowy bądź też patolog jedynie sugeruje obecność chłoniaka (26).

Podobnie jak to jest u ludzi, również u psów chłoniaki zbudowane z dobrze zróżnicowanych komórek można określić jako chłoniaki o niskiej złośliwości (low grade), a formy nowotworu, w których przeważają blastyczne, duże komórki zalicza się do chłoniaków o wysokiej złośliwości (high grade). Większość prac prowadzonych na chłoniakach u psów wskazuje, że ten drugi typ zdecydowanie przeważa u tego gatunku zwierząt (5-7, 12, 16, 19). Dokładna klasyfikacja chłoniaków u psów została szczegółowo przedstawiona w licznych podręcznikach i artykułach przeglądowych i nie będzie ona przedmiotem niniejszej publikacji (6, 7, 21).

Badanie cytopatologiczne to nie tylko mikroskopowa ocena wyglądu komórek pobranych w trakcie biopsji cienkoigłowej i diagnostyka różnicowa pomiędzy chłoniakiem, rozrostem odczynowym, zapaleniem i węzłem prawidłowym. Zastosowanie różnych metod barwienia oraz różnych sposobów analizy i interpretacji otrzymanego obrazu daje możliwość znacz-

nie szerszego wglądu w toczący się proces chorobowy. Już zwykle, podstawowe barwienia oferują patologowi możliwość pozyskania dodatkowych informacji odnośnie do natury chłoniaka. Badanie cytopatologiczne preparatów barwionych metodą MGG umożliwia szacunkową ocenę aktywności proliferacyjnej komórek miąższu guza. Możliwe jest ustalenie wartości indeksów mitotycznych (IM), choć ze względu na nierównomierne rozmieszczenie komórek w preparatach cytopatologicznych dane te mogą być tylko orientacyjne. Oceny tego parametru dokonuje się przy powiększeniach rzędu 500-1000 × poprzez liczenie średniej liczby figur podziałów mitotycznych w 5-10 polach widzenia bądź, co wydaje się bardziej miarodajne, liczenie odsetka komórek dzielących się (np. liczba komórek w fazie mitozy na 1000 stwierdzonych komórek; 7, 12).

W obrazie preparatów cytopatologicznych rutynowo barwionych łatwo można zidentyfikować makrofagi, które fagocytują martwe komórki, bądź fragmenty jąder komórkowych (tzw. tingible body macrophages – TBM) oraz różnej wielkości okrągłe lub owalne fragmenty cytoplazmy tzw. lymphoglandular bodies – LB (21). Choć obecność tych struktur nie jest swoistą cechą chłoniaków, to ich ocena może wносить nieco informacji odnośnie do istniejącego procesu. W jednym z opracowań obecność komórek TBM była odwrotnie skorelowana z wartością indeksów mitotycznych w chłoniakach o fenotypie T oraz fenotypie nie B/nie T (1). Z kolei obecność LB obserwowano z większą częstością w guzach o fenotypie B oraz chłoniakach o wysokiej złośliwości niż w guzach z komórek T (23).

Istotne z punktu widzenia morfologii i klasyfikacji, a także rokowania, jest określenie fenotypu chłoniaka, co jest możliwe dzięki zastosowaniu swoistych przeciwciał mono- bądź poliklonalnych do identyfikacji powierzchniowych antygenów różnicowania (CD). Określenie pochodzenia klonu komórek nowotworowych (komórki B lub T) oraz stopnia ich dojrzałości jest szczególnie użyteczne w diagnostyce chłoniaków u ludzi, pozwala również na monitorowanie przebiegu choroby i często także na dobranie najbardziej właściwej drogi leczenia (1, 18). Dobrane zestawy przeciwciał monoklonalnych wykrywają antygeny będące markerami określonych linii komórkowych, co pozwala na ich odróżnianie oraz ustalenie stopnia dojrzałości (2). Badanie immunocytochemiczne materiału pobranego drogą biopsji cienkoigłowej umożliwia szybkie, stosunkowo niedrogie i dokładne określenie fenotypu chłoniaka tak u ludzi, jak i u psów (1, 19).

Wśród przeciwciał stosować można te, które wykrywają ekspresję antygenów charakterystycznych dla komórek tkanki krwiotwórczej (CD 45, CD45RA, CD 18, MHC klasy II). Ekspresję antygenów MHC klasy II stwierdzono we wszystkich analizowanych przypadkach chłoniaków i rozrostów odczynowych u psów (w co najmniej 50% komórek; 1). Do antygenów markerowych charakterystycznych dla komórek T należą:

CD3 (typowe dla wszystkich limfocytów T), CD4, CD8, CD5 (typowe dla poszczególnych subpopulacji komórek T; 7, 19). Komórki chłoniaków o fenotypie B wykazują ekspresję antygeny CD79a (mb 1 – typowy dla wszystkich limfocytów B), CD21, CD20, a ponadto możliwe jest wykazanie ekspresji immunoglobulin powierzchniowych (sIg) i cytoplazmatycznych (cIg; 7, 10). Stwierdzenie ekspresji antygeny CD79a lub/i CD21, a także ekspresji immunoglobulin przy braku ekspresji antygeny CD3 pozwala zakwalifikować rozrost do chłoniaków z komórek B. Z kolei wykazanie obecności antygeny CD3, z jednoczesną ekspresją jednego lub więcej antygenów, takich jak CD4, CD5, CD8, przy jednoczesnym braku ekspresji antygeny CD79a upoważnia do rozpoznania chłoniaka z komórek T (1, 5-7, 20). W ostatnio opublikowanych badaniach immunohistochemicznych rozpoznanie chłoniaka z komórek B lub chłoniaka z komórek T stawiano, gdy powyżej 60% komórek w danym rozroście wykazywało ekspresję, odpowiednio, antygeny CD79a lub antygeny CD3 (8). W większości prac prowadzonych na chłoniakach u psów stwierdzono, że guzy z komórek B występują zdecydowanie częściej (51-64%) niż chłoniaki z komórek T (26-38% przypadków chłoniaków u psów), najrzadziej komórki nowotworu wykazują fenotyp nie B/nie T (1, 5, 7, 8, 19, 20). Opisywane bywają także formy, w których sprecyzowanie fenotypu bywa niezwykle trudne do określenia (2, 8).

Fenotyp chłoniaka ma istotne znaczenie dla rokowania. W wielu pracach wykazano, że chłoniaki z komórek T rokują gorzej (całkowity okres przeżycia, czas trwania pierwszej remisji są krótsze w tego typu guzach) niż nowotwory z komórek B (12, 16, 18, 23). Istnieją jednakże pewne odstępstwa od tej ogólnej „reguły”, są podtypy chłoniaków z małych, jasnych komórek T rokujące zdecydowanie lepiej i chłoniaki z komórek B (Burkitt-type) z bardzo krótkim okresem przeżycia (16). Należy też zawsze pamiętać, że w miąższu guza może być obecna pewna liczba komórek o innym fenotypie niż fenotyp komórek nowotworowych (obecność komórek T w chłoniakach B komórkowych), co jest wynikiem obecności prawidłowych komórek węzła chłonnego lub odczynu immunologicznego skierowanego przeciwko komórkom guza (1).

Aktywność proliferacyjna komórek chłoniaka jest dobrze znanym i przydatnym czynnikiem prognostycznym. Nowotwory, których komórki dzielą się częściej, rokują gorzej (11). Do parametrów charakteryzujących aktywność proliferacyjną komórek należą: wartość indeksów mitotycznych, ekspresja antygeny jądrowego Ki67, ekspresja antygeny PCNA (proliferation cell nuclear antigen), wielkość regionów organizatorów jąderkowych (AgNOR – agyrophil nucleolar organizer regions). W jednym z opracowań, oceniającym przydatność barwienia preparatów histopatologicznych metodą AgNOR w rokowaniu dla psów z chłoniakiem stwierdzono, że zarówno psy poddane chemioterapii,

jak i te nie leczone żyły dłużej, jeżeli liczba AgNORs w jądrach komórkowych komórek nowotworu była niższa (11). W innej pracy okres wolny od choroby był dłuższy u psów, u których stwierdzono mniejszą liczbę organizatorów jąderkowych w obrębie jądra komórkowego, większy średni obszar AgNOR, większy maksymalny obszar AgNOR i większy całkowity obszar AgNOR. Z kolei całkowity okres przeżycia był dłuższy u osobników, u których stwierdzono większy średni obszar AgNOR i większy całkowity obszar AgNOR (12). Ocena AgNOR jest uważana za najbardziej użyteczny test służący do oceny rokowania w przypadku chłoniaków nieziarniczych u ludzi, gdzie wzrost złośliwości nowotworu był zawsze skorelowany ze wzrostem średniej liczby AgNOR w jądrze komórkowym (11, 27). Metoda AgNOR okazała się też skutecznym sposobem oceny stopnia złośliwości chłoniaków u psów w materiale pobranym za pomocą BAC lub odcisków z powierzchni przekroju węzła chłonnego (24). Badania te wykazały, że liczba AgNOR była istotnie wyższa u psów z chłoniakami w porównaniu do psów kontrolnych, a ponadto wyższa w chłoniakach o wysokiej złośliwości niż w guzach o niskim stopniu złośliwości (24).

Zespół Fournel-Fleury (6) wykazał możliwość zastosowania oraz przydatność barwienia immunocytochemicznego określającego ekspresję antygeny Ki67 w przypadkach chłoniaków u psów. Badacze ocenili odsetek komórek będących w cyklu podziałowym w preparatach cytologicznych (pobranych za pomocą biopsji cienkoigłowej lub w preparatach odciskowych) pochodzących od 30 psów z chłoniakiem. Stwierdzono wyraźną korelację pomiędzy wartością indeksów Ki67 a stopniem złośliwości nowotworu klasyfikowanego systemem kilońskim. Ponadto wyniki badań immunocytochemicznych były zgodne z wynikami badań immunohistochemicznych, a dodatkowo autorzy stwierdzili, że ocena analizy ekspresji antygeny Ki67 była łatwiejsza w preparatach cytopatologicznych w stosunku do preparatów histopatologicznych (6). Ustalono, że w chłoniakach o niskiej złośliwości odsetek komórek wykazujących ekspresję Ki67 (indeks Ki67) jest mniejszy lub równy 21, a dla chłoniaków o wysokiej złośliwości wyższy od 21, a z reguły wyższy niż 29% (6). Problemem w określaniu indeksu Ki67 mogą być trudności w odróżnianiu komórek nowotworowych od prawidłowych komórek węzła chłonnego zaaspirowanych w czasie wykonywania biopsji.

Badanie cytologiczne powiększonego węzła chłonnego u psów wnosi wiele cennych informacji na temat toczonego się w jego obrębie procesu patologicznego, a w większości przypadków pozwala postawić ostateczne rozpoznanie. Zastosowanie różnych technik barwienia i metod badawczych umożliwia precyzyjne rozpoznanie charakteru rozrostu, zasięgu choroby, a także jest źródłem wielu informacji o znaczeniu prognostycznym. W połączeniu z prostotą, małą inwazyjnością i stosunkowo niewielkim kosztem bada-

nie cytologiczne jawi się jako narzędzie szczególnie godne polecenia w warsztacie diagnostycznym każdego lekarza praktyka zajmującego się leczeniem psów, wymaga jednak oceny i interpretacji obrazu przez doświadczonego patomorfologa.

### Piśmiennictwo

1. *Caniatti M., Roccabianca P., Scanziani E., Paltrieri S., Moore P. F.*: Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Vet. Pathol.* 1996, 33, 204-212.
2. *Czumińska K., Winnicka A., Malicka E., Lechowiski R., Jagielski D., Sokółowska J., Miciuń J., Mieczkowska J.*: Trudności diagnostyczne w klasyfikacji chłoniaków o nietypowym fenotypie u psów. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 1196-1201.
3. *Das D. K.*: Value and limitations of fine-needle aspiration cytology in diagnosis and classification of lymphomas. A review. *Diagn. Cytopathol.* 1999, 21, 240-249.
4. *Foulner-Fleury C., Magnol J.-P., Guelfi J.-F.*: The lymph node, [w:] *Color Atlas of Cancer Cytology of the dog and cat.* (ed.), PMCAC, Paris 1994, 243-321.
5. *Fournel-Fleury C., Magnol J. P., Bricaire P., Marchal T., Chabanne L., Delverdier A., Bryon P. A., Felman P.*: Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J. Comp. Pathol.* 1997, 117, 35-59.
6. *Fournel-Fleury C., Magnol J. P., Chabanne L., Ghernati I., Marchal T., Bonnefond C., Bryon P. A., Felman P.*: Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. *J. Comp. Pathol.* 1997, 117, 61-72.
7. *Fournel-Fleury C., Ponce F., Felman P., Blavier A., Bonnefond C., Chabanne L., Marchal T., Cadore J. L., Goy-Thollot I., Ledieu D., Ghernati I., Magnol J. P.*: Canine T-cell Lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet. Pathol.* 2002, 39, 92-109.
8. *Guija de Arespacochaga A., Schwedendenwein I., Weissenbock H.*: Retrospective study of 82 cases canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. *J. Comp. Pathol.* 2007, 136, 186-192.
9. *Harris N. L., Jaffe E. S., Stein H., Banks P. M., Chan J. K. C., Cleary M. L., Delson G., De Wolf-Peters C., Falini B., Gatter K. C., Grogan T. M., Isaacson P. G., Knowles D. M., Mason D. Y., Muller-Harmelink H. K., Pileri S. A., Piris M. A., Ralfkiaer E., Warnke R. A.*: A revised European-American classification of lymphoid neoplasm: a proposal from the International Study Group. *Blood* 1994, 84, 1361-1392.
10. *Jubala C. M., Wojcieszyn J. W., Valli V. E. O., Getzy D. M., Fosmire S. P., Coffey D., Bellgrau D., Modiano J. F.*: CD20 expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma. *Vet. Pathol.* 2005, 42, 468-476.
11. *Kiupel M., Bostock D. E., Bergmann V.*: The prognostic significance of AgNOR- and PCNA-counts and histological grading of canine malignant lymphomas. *J. Comp. Pathol.* 1998, 119, 407-418.
12. *Kiupel M., Teske E., Bostock D.*: Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet. Pathol.* 1999, 36, 292-300.
13. *Langenbach A., MacManus P. M., Hendrick M. J., Shofer F. S., Sorenmo K. U.*: Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2001, 218, 1424-1428.
14. *Lennert K., Feller C. A.*: *Histologie des Lymphomes Malins Non-Hodgkiniens Selon la Classification de Kiel Actualisee.* Doin, Paris 1991, s. 1-883.
15. *Orell S. R., Skinner J. M.*: The typing of non-Hodgkins lymphomas using fine needle aspiration cytology. *Pathology* 1982, 14, 389-394.
16. *Ponce F., Magnol J. P., Ledieu D., Marchal T., Turinelli V., Chalvet-Monfray K., Fournel-Fleury C.*: Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet. J.* 2004, 167, 158-166.
17. *Saba C. F., Thamm D. H., Vali D. M.*: Combination chemotherapy with L-asparaginase, Lomustine, and prednicone for relapsed or refractory canine lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 2007, 21, 127-132.
18. *Siedlecki C. T., Kass P. H., Jakubiak M. J., Dank G., Lyons J., Kent M. S.*: Evaluation of an actinomycin-D-containing combination chemotherapy protocol with extended maintenance therapy for canine lymphoma. *Can. Vet. J.* 2006, 47, 52-59.
19. *Sozmen M., Tascas S., Carli E., DeLorenzi 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, 323-330.
20. *Sueiro F. A. R., Alessi A. C., Vassallo J.*: Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoeexpression. *J. Comp. Pathol.* 2004, 131, 207-213.
21. *Taylor J. A., Baker R.*: The lymphatic system-lymph nodes, spleen, and thymus, [w:] *Baker R., Lumsden J. H.* (ed.): *Color Atlas of Cytology of the Dog and Cat.* Mosby St. Louis 2000, 71-94.
22. *Teske E., van Heerde P.*: Diagnostic value and reproducibility of fine-needle aspiration cytology in canine malignant lymphoma. *Vet. Q* 1996, 18, 112-115.
23. *Teske E., van Heerde P., Rutteman G. R., Kurzman H. D., Moore P. F., MacEwen G.*: Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994, 205, 1722-1728.
24. *Vajdovich P., Psader R., Toth Z. A., Perge E.*: Use of the argyrophilic nucleolar region method for cytologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs. *Vet. Pathol.* 2004, 41, 338-345.
25. *Van Heerde P., Go D., Koolman-Schellekens M. A., Peterse J. L.*: Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol. 1984, 403, 213-233.
26. *Williams L. E., Broussard M. T., Johnson J. L., Neel J.*: Comparison of results of clinicians' assessments, cytologic examination of fine-needle lymph node aspirates, and flow cytometry for determination of remission status of lymphoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005, 226, 562-566.
27. *Yekeler H., Ozeran M. R., Yumbul A. Z., Ajgan M., Ozeran I. H.*: Nucleolar organizer regions in lymphomas: a quantitative study. *Pathologica* 1993, 85, 353-362.
28. *Yohn S. E., Hawkins E. C., Morrison W. B., Reams R. Y., DeNicola D. B., Blevins W. E.*: Confirmation of a pulmonary component of multicentric lymphosarcoma with bronchoalveolar lavage in two dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994, 204, 97-101.

Adres autora: dr Rafał Sapierzyński, ul. Nowoursynowska 159c, 02-766 Warszawa; e-mail: sapieh@wp.pl