

Zastosowanie biopsji chirurgicznej węzłów chłonnych i cytometrii przepływowej w rozpoznawaniu chłoniaków wieloogniskowych u psów*)

JACEK MICUŃ, IGOR BISSENIK*, JUSTYNA SOKOŁOWSKA****, MAGDALENA ŻMUDZKA, ANNA WINNICKA**, ROMAN LECHOWSKI, ELŻBIETA MALICKA***

Zakład Chorób Wewnętrznych, *Zakład Chirurgii Małych Zwierząt, **Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Klinicznej, ***Zakład Patomorfologii Katedry Nauk Klinicznych, ****Zakład Histologii i Embriologii Katedry Nauk Morfologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

Micuń J., Bissenik I., Sokołowska J., Żmudzka M., Winnicka A., Lechowski R., Malicka E.

Application of surgical biopsy of lymph nodes and flow cytometry in diagnosing multicentric lymphomas in dogs

Summary

Lymphoma is one of the most common histological types of carcinoma of the bone marrow. The aim of the study was to determine the usefulness of the flow cytometry in diagnosing lymphomas on the basis of the material obtained from lymph nodes by the surgical biopsy in dogs. The material was lymph nodes obtained by surgical biopsy from 33 dogs suffering from multicentric lymphoma. The control group consisted of 4 clinically healthy dogs. The material was submitted to the flow cytometry analysis using the monoclonal antibodies and fluorochromes. The percentage of the CD4⁺ lymphocytes was lower in the affected animals than in healthy ones. The percentage of CD21-like + lymphocytes was higher in the affected animals than in healthy ones. The percentage of CD5⁺ and CD8⁺ was lower than in the healthy dogs. The research demonstrated that determining the phenotype of lymphocytes from lymph nodes in the case of multicentric lymphoma in dogs is an important addition to immunohistochemical methods.

Keywords: dog, lymphoma, surgical biopsy, flow cytometry

Rozpoznawaniu chorób nowotworowych u zwierząt poświęca się nieco mniej uwagi niż u ludzi, ale prowadzone w tym zakresie badania są ostatnio bardzo intensywne. Zmusiły do tego straty ekonomiczne, jakie powstają z powodu chorób nowotworowych w hodowlach zwierząt oraz coraz większe oczekiwania właścicieli dotyczące nie tylko rozpoznania choroby, ale również, w miarę możliwości, jej skutecznego leczenia.

Największe straty powodują choroby nowotworowe drobiu i bydła, np. enzootyczna białaczka bydła podlegająca ustawowemu zwalczaniu. Natomiast w praktyce lekarsko-weterynaryjnej w miastach problem dotyczy głównie psów i kotów. Wydaje się, że wzrastająca liczba stwierdzanych wśród zwierząt nowotworów jest związana z jednej strony ze zwiększoną wykrywalnością tych chorób, z drugiej zaś – ze stale wzrastającą liczbą czynników karcinogennych w środowisku, na przykład herbicydów na bazie kwasu fenoksyoctowego, na które są narażeni zarówno ludzie, jak i zwierzęta (8, 15).

U psów najczęściej występującymi nowotworami wywodzącymi się z tkanki krwiotwórczej są chłoniaki. Chłoniak złośliwy (*lymphoma malignum*) oznacza rozrost nowotworowy z limfocytów, niezależnie od umiejscowienia pierwotnego procesu nowotworowego (w węzłach chłonnych, śledzionie, grasicy, nieotorbionych grudkach chłonnych, a nawet tam, gdzie fizjologicznie nie istnieją skupiska tkanki limfatycznej) oraz bez względu na fenotyp komórek nowotworowych (limfocyty B, T, podwójnie pozytywne B i T lub nie-B/nie-T) (25, 39).

Liczba rocznie notowanych nowych przypadków chłoniaków u psów w USA wynosi od 13 do 33/100 tys. osobników (15, 21, 22, 31). Szacuje się, że ryzyko wystąpienia chłoniaka u psa poniżej jednego roku życia wynosi 1,5/100 tys., zaś u 10-11-letniego – 84/100 tys. osobników (23). Najczęściej opisywane są one u psów w wieku średnim, 6-9 lat (1, 4, 15, 22). Nie obserwuje się natomiast związku częstości zachorowania z płcią (10, 30). Niektóre rasy psów, takie jak: bokserzy, bassety, bernardyny, szkockie teriery, airdale teriery, buldogi angielskie, dogi niemieckie i doberman,

*) Praca wykonana w ramach grantu KBN 3 P06K 02023.

złote retrievery, chow-chow są szczególnie predysponowane do zachorowania na chłoniaka (9, 24, 31). Ononis (25) stwierdził zwiększoną zachorowalność w pewnych liniach ras: rottweiler, bullmastiff i otterhond. U jamników, cocker spanieli i szpiców pomorskich choroba spotykana jest dość rzadko (9, 24, 30, 31).

Klasyfikacja chłoniaków dokonywana jest na podstawie oceny ekspresji cząsteczek różnicowania limfocytów. Do określenia fenotypu limfocytów stosowane są dwie uzupełniające się metody: immunohistochemiczna i cytometryczna (2, 11, 16). Podstawowym badaniem jest określenie, z jakich limfocytów B czy T wywodzi się chłoniak. Większość występujących chłoniaków, zarówno u ludzi, jak i u psów to B komórkowe (18, 26). U psów odsetek chłoniaków z limfocytów T waha się od 10% do 38% i stwierdzenie takiego fenotypu wiąże się z niekorzystnym rokowaniem (5, 29, 30, 31).

Rozpoznawanie chłoniaka opiera się na badaniu klinicznym oraz badaniach dodatkowych: radiologicznym, laboratoryjnym krwi obwodowej oraz diagnostyce histopatologicznej. Zwykle podstawę rozpoznania stanowi ocena materiału uzyskanego z powiększonych węzłów drogą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej (BAC) lub metodą chirurgiczną (29, 34). W medycynie rozpoznawanie nowotworów układu limfatycznego opiera się na badaniu histopatologicznym węzła chłonnego pobranego obiema metodami (11). W weterynarii bardzo często stosuje się jedynie BAC (5, 14, 35). W przypadku uogólnionego powiększenia węzłów chłonnych BAC powinna być wykonywana przynajmniej z dwóch różnych węzłów chłonnych powierzchownych, z wykluczeniem, o ile jest to możliwe, węzłów chłonnych zbierających chłonkę z jamy ustnej, w których stwierdza się często cechy rozrostu odczynowego (6, 7). Jeżeli powiększony jest tylko jeden węzeł chłonny, to sposób pobrania materiału powinien zapewniać uzyskanie materiału do badania histopatologicznego reprezentatywnego dla całego narządu. W tym celu należy podczas BAC dokonać kilku aspiracji materiału z różnych kierunków i głębokości węzła chłonnego (6).

W większości przypadków badanie cytologiczne pozwala na odróżnienie zapalenia węzłów chłonnych od rozrostu odczynowego i rozrostu nowotworowego, a także przyspiesza rozpoznanie nowotworów z towarzyszącymi naciekami w węzłach (6, 7). Jednak we wczesnych stadiach rozwoju chłoniaka lub współistnieniu chłoniaka z rozrostem odczynowym albo zajęciu węzła chłonnego przez nowotwór postawienie rozpoznania tylko w oparciu o ocenę materiału pochodzącego z BAC jest utrudnione lub niemożliwe (29, 35). Autorzy opracowań podkreślają, że chociaż ocena cytologiczna materiału pobranego metodą BAC może być wystarczająca do postawienia rozpoznania, to w każdym przypadku stwierdzenia chłoniaka w materiale cytologicznym powinna być również wykonana biopsja chirurgiczna węzła chłonnego (6, 11).

W chłoniaku śródpiersia dodatkowo pobierany jest płyn z jamy opłucnej, a w chłoniaku z naciekiem guza do ośrodkowego układu nerwowego pomocne jest ba-

danie płynu mózgowo-rdzeniowego. Po odwirowaniu materiał poddawany jest badaniu cytopatologicznemu, a dopiero stwierdzenie komórek chłoniaka potwierdza rozpoznanie (13).

Podstawowym badaniem pozwalającym na postawienie wstępnego rozpoznania jest ocena morfologiczna guza na podstawie preparatów barwionych hematoksylina-eozyna. Jednak ze względu na duże podobieństwo między komórkami różnych typów chłoniaka, w medycynie oraz coraz częściej w weterynarii niezastąpionym badaniem jest określenie fenotypu komórek nowotworu przy pomocy przeciwciał monoklonalnych. Aktualnie liczba przeciwciał swoistych dla psów lub wykazujących wiązania krzyżowe z limfocytami psa jest jednak niewielka, zwłaszcza w porównaniu z zestawami przeciwciał monoklonalnych stosowanych u ludzi (4, 15, 27). W dostępnej literaturze weterynaryjnej niewiele jest informacji na temat badań cytometrycznych w diagnostyce chłoniaków, a także brak jest powiązania wyników badań immunohistochemicznych z cytometrycznymi, co powoduje, że wyniki badania immunofenotypu limfocytów z węzłów chłonnych u psów są trudne do interpretacji (2, 11, 37-39).

Celem pracy było określenie przydatności metody cytometrii przepływowej w rozpoznawaniu chłoniaków u psów z materiału uzyskanego z węzłów chłonnych w wyniku biopsji chirurgicznej.

Materiał i metody

Materiałem do badań były pobrane chirurgicznie węzły chłonne od trzydziestu trzech chorych psów. W trzydziestu przypadkach pobrano węzły chłonne podkolanowe, w dwóch węzły chłonne pachowe i w jednym przedłopatkowe. Materiałem kontrolnym były węzły chłonne pobrane od czterech psów zdrowych.

Pobrania węzłów chłonnych dokonywano w znieczuleniu ogólnym, do którego kwalifikowano pacjentów na podstawie wyników wykonanych wcześniej badań: morfologicznych krwi i biochemicznych surowicy oraz badań obrazowych. Zwierzęta przygotowywano wg standardowego schematu, jak do zabiegu chirurgicznego. Farmakologiczne uspokojenie psów uzyskano podając: medetodyminę (Domitor – Orion, Pfizer) w dawce 10-40 µg/kg masy ciała domięśniowo, butorfanol (Butomidol – Richter Farma) w dawce 20-40 µg/kg masy ciała domięśniowo. Tiopental (Thiopental – Sandoz) w dawce 5 mg/kg masy ciała dożylnie powodował indukcję znieczulenia. Do podtrzymania znieczulenia ogólnego używano izofluranu (Izofluran – Baxter) w stężeniu gazu 2-5% podawanego w mieszance z tlenem wzięwicznie. Pobierano cały węzeł chłonny wraz z torebką i umieszczano w PBS. Ranę pooperacyjną zszywano dwoma piętami szwów – tkankę podskórną oraz naczynia krwionośne szyto nicią rozpuszczalną monofilamentową Vicryl 2-0, a skórę szwem prostym przyzywany z Amifilu 2-0. Po dziesięciu dniach zdejmowano szwy. Po zabiegu psy otrzymywały amoksycylinę o przedłużonym działaniu co 48 godzin trzykrotnie oraz miały założony kołnier z chroniący ranę przed lizaniem. Każdy pies po pobraniu węzłów chłonnych otrzymywał preparaty uszczelniające naczynia krwionośne – rutynę oraz wyciąg z kasztanowca.

Węzeł chłonny przygotowywano do badań dzieląc wzdłuż na połowę. Jedną część przekazywano do badania histopato-

logicznego i immunohistochemicznego, a z drugiej połowy usuwano resztki tłuszczu oraz torebkę, rozdrabniano i przecierano na sitku z PBS. Tak otrzymaną zawiesinę wirowano przez 5 minut przy 1200 obr./min. Powstały osad zawieszano w PBS i rozdzielano w ilości 10⁶ µl do próbek cytometrycznych Falcon (USA) do badań komórkowych.

Do określenia składu ilościowego populacji i subpopulacji limfocytów na podstawie danych z piśmiennictwa skompletowano zestaw przeciwciał monoklonalnych przedstawiony w tab. 1.

Rozdziału leukocytów na populacje dokonywano zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami na podstawie cytogramów (forward scatter – FSC/side scatter – SSC) i znakowanego fikoerytryną (PE) kompleksu różnicowania CD18 (19, 20, 39). Do znakowania limfocytów użyto przeciwciał monoklonalnych firmy VMRD Inc. Pullman (USA) i fluorochromów: PE i fluoresceiny (FITC) skoniugowanych z przeciwciałami poliklonalnymi: anti-Mouse IgG /H+L/ R-PE i anti-Mouse IgG + IgM /H+L/ FITC. Ilość przeciwciał i fluorochromów ustalono we wstępnym miareczkowaniu. Próbkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Nadmiar przeciwciał niezwiązanych wypłukiwano przy użyciu 2 ml PBS z 10% NaN₃, 10 ml mM EDTA i 2% surowicą końską pozbawioną IgG, następnie wirowano przez 5 minut przy 1200 obr./min. Lizy erytrocytów dokonywano FACS-lysing solution (Becton-Dickinson). Błony erytrocytarne oraz uwolnioną hemoglobinę wypłukiwano PBS, a po odwirowaniu komórki zawieszano w PBS z 1% formaliną. Odczytu wyników dokonywano przy użyciu cytometru przepływowego FACS Calibur i programu Cell Quest (Becton-Dickinson). Wyniki analizy cytometrycznej przedstawiono w postaci odsetka limfocytów z węzłów chłonnych wykazujących ekspresję CD5, CD21, CD4 i CD8. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica 6.0. W celu określenia istotności statystycznej różnic między średnimi wartościami poszczególnych parametrów stosowano test Kruskala-Wallisa oraz test U Manna Whitneya. Istotność statystyczną wykazywano dla p ≤ 0,05.

Wyniki i omówienie

Przeprowadzone badania cytometryczne limfocytów z węzłów chłonnych pobranych metodą chirurgiczną od psów z chłoniakiem wieloogniskowym wykazały niższy odsetek limfocytów pomocniczych CD4⁺ oraz wyższy odsetek limfocytów CD21-like⁺ w porównaniu do zdrowych zwierząt (tab. 2).

Diagnostyką cytometryczną chłoniaków u psów w Polsce po raz pierwszy zajmował się Jagielski (17), badając subpopulacje limfocytów krwi obwodowej. W wyniku przeprowadzonych obserwacji stwierdził, iż odsetek limfocytów CD5⁺, CD4⁺ i CD8⁺ psów z chłoniakami był istotnie niższy, a odsetek limfocytów CD21⁺ istotnie wyższy w porównaniu do psów zdrowych i psów leczonych lekami cytostatycznymi. W badaniach własnych, w których materiałem były chirurgicznie pobrane węzły chłonne od chorych psów, zaobserwowano statystycznie istotnie niższy odsetek limfocytów CD4⁺ psów z chłoniakiem wieloogniskowym niż u psów zdrowych oraz istotnie wyższy odsetek limfocytów CD21⁺ u psów chorych niż u psów zdrowych.

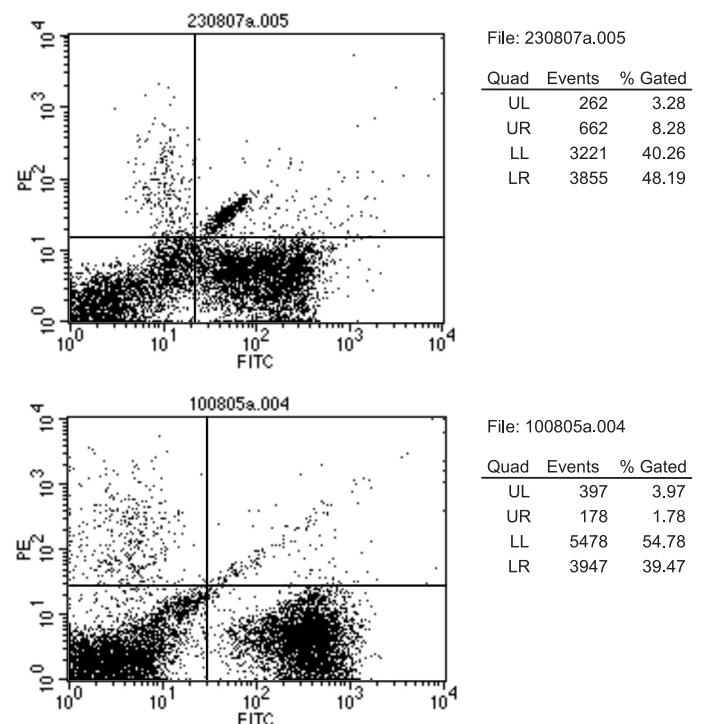
Tab. 1. Przeciwciała monoklonalne (VMRD Inc. Pullman – USA) i fluorochromy (Medac – Niemcy) do immunofenotypowania limfocytów z węzłów chłonnych psów z chłoniakiem wieloogniskowym

Cząsteczka różnicowania	Przeciwciało monoklonalne	Izotyp przeciwciała	Koniugat przeciwciał poliklonalnych i fluorochromów
CD18	BAQ30A	IgG1	Anti-Mouse IgG /H+L/ R-PE
CD8	CAD046A	IgG1	Anti-Mouse IgG /H+L/ R-PE
CD4	DH29A	IgM	Anti-Mouse IgG + IgM /H+L/ FITC
CD5	DH13A	IgM	Anti-Mouse IgG + IgM /H+L/ FITC
Cr-B1(CD21-like)	F46A	IgG1	Anti-Mouse IgG /H+L/ R-PE

Tab. 2. Odsetek subpopulacji limfocytów z węzłów chłonnych u psów zdrowych i z chłoniakiem wieloogniskowym

Limfocyty z węzłów chłonnych	Odsetek komórek z węzłów chłonnych ($\bar{x} \pm SE$)	
	psy zdrowe, n = 4	psy przed leczeniem, n = 37
CD5 ⁺	53,70 ± 1,47	50,23 ± 2,34
CD4 ⁺	46,01 ± 2,57	38,07 ± 3,14*
CD8 ⁺	5,99 ± 2,41	4,84 ± 2,79
CD4/CD8	4,14 ± 1,76	5,78 ± 1,92
CD21like ⁺	39,08 ± 1,47	45,17 ± 2,87*

Objaśnienia: * – różnica statystycznie istotna, przy p ≤ 0,05 wobec grupy psów zdrowych



Ryc. 1. Przykładowy cytogram limfocytów CD8⁺ (PE) i CD4⁺ (FITC) z węzła chłonnego psa zdrowego i psa z chłoniakiem wieloogniskowym

Ponadto stwierdzono niższy odsetek limfocytów CD5⁺ i CD8⁺ u psów chorych niż u zdrowych zwierząt. Wilkerson i wsp. (35) badali metodą cytometrii przepływowej materiał uzyskany w wyniku BAC oraz biopsji

tnącej od 59 psów. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzili, że chłoniaki z limfocytów B (CD79 α + i CD21+) stanowiły 30 przypadków, chłoniaki z limfocytów T (CD3+CD4+CD8+) rozpoznano u 16 psów, zaś chłoniaki o podwójnym fenotypie B i T (CD79 α + CD21+CD3+CD4+CD8+) rozpoznali aż u 13 zwierząt. W badaniach własnych stwierdzono występowanie chłoniaków z limfocytów B (CD79 α + i CD21+). W 73% badanych przypadków oraz 27% chłoniaków z limfocytów T (CD3+CD4+CD8+). Clumsee i wsp. (1) badali cytometrycznie materiał z węzłów chłonnych uzyskany na drodze BAC od 30 psów i stwierdzili 20 chłoniaków B komórkowych (CD79 α +) i 10 chłoniaków T komórkowych. Limfocyty chłoniaków T wykazywały ekspresję CD4, a nie wykazywały ekspresji cząsteczki CD8. We wcześniejszych badaniach Teske i wsp. (33), badając materiał uzyskany metodą BAC, ocenił 34 chłoniaki jako T komórkowe: CD4+ w 9 przypadkach, zaś CD8+ w 8 przypadkach. W immunocytochemicznych badaniach własnych otrzymano podobne wyniki, przy czym materiał uzyskano poprzez biopsję chirurgiczną węzłów chłonnych. Stwierdzono 9 przypadków chłoniaków wielogniskowych z limfocytów T: w 5 przypadkach wykazano ekspresję CD4, a w 4 przypadkach wykazano ekspresję CD8. W wyniku przeprowadzonych badań własnych potwierdzono wskazywaną w piśmiennictwie (29, 35) konieczność uzyskiwania materiału do badań immunohistochemicznych i cytometrycznych w drodze biopsji chirurgicznej. Materiał otrzymany w wyniku biopsji chirurgicznej węzłów chłonnych pozwala na rozpoznanie chłoniaka we wczesnych stadiach rozwoju, jak również przy współistnieniu chłoniaka z rozrostem odczynowym lub zajęciu przez nowotwór całego węzła chłonnego.

Przeprowadzone badania wykazały, że cytometryczne fenotypowanie limfocytów z węzłów chłonnych psów z chłoniakiem wielogniskowym stanowi cenne uzupełnienie badań immunohistochemicznych.

Piśmiennictwo

- Clumsee K., Simon D., Mischke R.: Possibilities of Flow Cytometric Analysis for Immunophenotypic Characterization of Canine Lymphoma. *J. Vet. Med.* 2001, 48, 199-206.
- Czumińska K., Winnicka A., Malicka E., Lechowski R., Jagielski D., Sokolowska J., Miciuń J., Mieczkowska J.: Trudności diagnostyczne w klasyfikacji chłoniaków o nietypowym fenotypie u psów. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 1196-1201.
- Dobson J. M., Blackwood L. B., McInnes E. F.: Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J. Small Anim. Pract.* 2001, 42, 377-384.
- Dobson J. M., Blackwood L. B., McInnes E. F., Bostock D. E., Nicholls P., Hoather T. M., Tom B. D.: Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *J. Small Anim. Pract.* 2001, 42, 377-384.
- Dzimira S.: Immunocytochemical and cytomorphometric diagnostics of malignant lymphomas in dogs. *Biull. Vet. Inst. Pulawy* 2007, 51, 71-78.
- Fournel-Fleury C., Magnol J. P., Bricaire P., Marchal T., Chabanne L., Deverdier 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.
- Fournel-Fleury C., Ponce F., Felman P.: Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Vet. Pathol.* 2002, 39, 92-109.
- Gavazza A., Presiuttini S., Barale R., Lubas G., Gugliucci B.: Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *J. Vet. Intern. Med.* 2002, 15, 190-195.
- Gorman N. T.: The Haemolymphatic System, [w:] White R.A.S. (wyd): Manual of Small Animal Oncology. British Small Animal Veterinary Association, Oxford 1991, 207-235.
- 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.
- Harris N. L., Jaffe E. S., Diebold J.: The World Health Organization classification of neoplastic disease of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, Nov 1997. *Histopathology* 2000, 36, 69-87.
- Hawkins E. C., Morrison W. B., DeNicola D. B.: Cytologic analysis of bronchoalveolar lavage fluid from 47 dogs with multicentric malignant lymphoma. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1993, 203, 1418-1425.
- Hayes H. M., Tarione R. E., Cantor K. P.: Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with dog owners use of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid herbicides. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991, 85, 1226-1231.
- Hildebrand W.: Wykorzystanie badań laboratoryjnych krwi w diagnostyce i leczeniu chłoniaka złośliwego u psów. *Magazyn Wet.* 2005, 3, 13-14.
- Jacobs R. M., Messick J. B., Valli V. E.: Tumors of the haemolymphatic system, [w:] Meuten D. J. (wyd): Tumors in Domestic Animals. Iowa State Press 2002, 119-144.
- Jaffe E. S., Harris N. L., Stein H., Vardiman J. M.: World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Tumors of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon 2001.
- Jagielski D.: Epidemiologia, rozpoznawanie i leczenie postaci wielogniskowej chłoniakomięsaka psa. *Praca dokt., Wydz. Med. Wet. SGGW, Warszawa* 2001.
- Jakóbsiak M.: Populacje i subpopulacje limfocytów, [w:] Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W. (wyd.): Immunologia. PWN, Warszawa 2002, 94-102.
- Klucziński W., Winnicka A., Kawiak J.: Analiza subpopulacji limfocytów krwi obwodowej przeżuwaczy metodą cytometrii przepływowej. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 588-591.
- Klucziński W., Winnicka A., Lechowski R.: Analiza cytometryczna limfocytów krwi obwodowej kotów. *Mat. IX Zjazdu Pol. Tow. Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawa* 16-18.09.1998, s. 23.
- Lechowski R.: Stężenie AFP i CAE w surowicy oraz skład procentowy subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej u psów z rozpoznany chłoniakiomięsakiem. *Mat. 3 sesji nauk., Stan Badań Naukowych w Weterynarii, Puławy* 18-19.12.2000, s. 26.
- MacEwen E. G., Hayes A. A., Mooney S.: Levamisole as adjuvant to chemotherapy for canine lymphosarcoma. *J. Biol. Response Mod.* 1985, 4, 427-433.
- Novotny B. J.: Canine Cancer: An Overview. *Canine Cancer, Hill's Pet Nutrition, Topeca* 1998, 1-8.
- Ogilvie G. K., Moore A. S.: Managing the Veterinary Cancer Patient. *Veterinary Learning System Co., Inc. Trenton, New Jersey* 1996, 228-259.
- Ononis D. E.: A prospective survey of familial canine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 1984, 72, 909-910.
- Parodi A. L.: Historia i ewolucja zasad klasyfikacji złośliwych chłoniaków u zwierząt domowych. *Magazyn Wet.* 2003, 77, 9-13.
- Ponce F., Magnol J. P., Ledieu D.: Prognostic significance of morfological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Vet. J.* 2004, 167, 158-166.
- 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.
- Sokolowska J.: Aktywność proliferacyjna w chłoniakach u psów. *Praca dokt., Wydz. Med. Wet. SGGW, Warszawa* 2005.
- Sozmen M., Tasca 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.
- Teske E.: Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodkin's lymphoma. *Vet. Q.* 1994a, 16, 209-219.
- Teske E., Heerde P., Rutterman G. R., Kurzman I. D., Moore P. F., McEwen E. G.: Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994b, 205, 1722-1728.
- Teske E., Wisman P., Moore P. F., van Heerde P.: Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. *Exp. Hematol.* 1994c, 12, 1179-1187.
- Timothy M., Fan B., Kitchell E.: Obecne i nowe metody rozpoznawania i leczenia chłoniaka u psów. *Wet. Dypl.* 2003, 4, 25-34.
- Wilkerson L., Dolce K., Koopman T., Shuman W., Chun L., Garrett L., Barber L., Avery A.: Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005, 106, 179-196.
- 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. Ass.* 2005, 226, 562-566.
- Winnicka A., Jagielski D., Hoffmann-Jagielska M., Lechowski R.: Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy. *J. Vet. Med. A.* 2002, 42, 303-306.
- Winnicka A., Jagielski D., Lechowski R.: Cytometric evaluation of peripheral blood in dogs with malignant lymphoma. *Cytometry* 2000, Suppl. 10, 154.
- Withrow S. J., MacEwen E. G.: Small Animal Clinical Oncology. Saunders W. B., Philadelphia 2001.