

B-cell lymphomas in dogs

Kliczkowska-Klarowicz K.¹, Sapieryński R.¹, Jagielski D.², Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW¹, Veterinary Surgery „Białobrzaska” in Warsaw²

The aim of this study was to present the most often recognized types of B-cell lymphomas in dogs. Lymphoma is defined as any neoplastic disorder of lymphoid tissue. Canine malignant lymphoma is the commonest hemopoietic neoplasm in this species. It is characterized by lymphoid tumors in multiple lymph nodes, spleen, liver and other organs. It is estimated that tumors developing from lymphocytes comprise 7–24% of all tumors in dogs. There are two systems used by veterinary pathologists to classify canine lymphomas – the WHO system of non-Hodgkin lymphomas classification (adapted to canine lymphomas), and the updated Kiel classification. The group of B-cell lymphomas is prominent in canine species but it contains several entities with varied morphology, biological behavior and prognosis.

Keywords: centroblastic lymphoma, marginal zone lymphoma, canine lymphomas.

Chłoniak (*lymphoma*) jest nowotworem złośliwym wywodzącym się z limfocytów i stanowi od 7 do 24% wszystkich nowotworów rozpoznawanych u psów. Ich występowanie oszacowano na 33 przypadki na 100 tys. psów, ponadto 1,5 przypadków na 100 tys. młodszych niż jednoroczne i ok. 80 przypadków na 100 tys. psów starszych niż 10-letnie (1, 2, 3). W przeszłości w klasyfikacji chłoniaków stosowano podział anatomiczny (między innymi chłoniaki wielopostaciowe, chłoniaki śródpiersiowe, chłoniaki przewodu pokarmowego), podział na chłoniaki o niskiej i wysokiej złośliwości oraz podział na chłoniaki B- i T-komórkowe. Od pewnego czasu jednak wiadomo, że takie ujęcie zagadnienia chłoniaków jest niewystarczające, w doborze metody postępowania z pacjentem chorym na chłoniaka niezbędna jest dokładniejsza charakterystyka rozrostu w oparciu o ogólnie przyjęte schematy klasyfikacji (4). Powszechnie akceptowana dawniej zasada, że chłoniaki B-komórkowe roją lepiej niż chłoniaki T-komórkowe, została już podważona w wielu badaniach, dla każdej grupy chłoniaków istnieją podkategorie, które różnią się od siebie pod wieloma względami, szczególnie pod względem zachowania biologicznego, wymaganego sposobu leczenia i, co najważniejsze, rokowania (5).

W medycynie ludzi proces diagnostyczny i terapeutyczny chłoniaków został bardzo ujednolicony, czego efektem jest

Chłoniaki B-komórkowe u psów

Katarzyna Kliczkowska-Klarowicz¹, Rafał Sapieryński¹, Dariusz Jagielski²

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie¹ oraz Przychodni Weterynaryjnej „Białobrzaska” w Warszawie²

najnowsza klasyfikacja WHO (6). Klasyfikacja ta została dostosowana również do potrzeb diagnostyki chłoniaków u psów, jednak ze względów praktycznych nadal używana jest też zaktualizowana klasyfikacja kilońska (7). Patolodzy oraz klinicyści na całym świecie starają się ustalić wśród chłoniaków jednostki chorobowe pod kątem wspólnego przebiegu klinicznego i rokowania. W tym artykule zaprezentowano najczęściej występujące podtypy chłoniaków B-komórkowych w oparciu o klasyfikację kilońską, z odniesieniami do współcześnie obowiązującej klasyfikacji WHO. Poruszono również problematykę dotyczącą obowiązujących systemów klasyfikacji.

Chłoniaki B-komórkowe są częściej spotykane u psów niż chłoniaki T-komórkowe, a ich odsetek wydaje się wzrastać w ciągu ostatnich 10 lat z 58,9% do nawet 77,8% (4, 8, 9, 10, 11, 12, 13). Wśród chłoniaków B-komórkowych przeważają chłoniaki o wysokim stopniu złośliwości histologicznej od 51 do 73,9% (9, 12, 13). Średni wiek psów, u których występują chłoniaki B-komórkowe, wynosi 8,5 roku, według niektórych autorów predysponowane są owczarki niemieckie i rottweilery, oraz samce (2, 12, 13). U 92% z chłoniakiem B-komórkowym występuje uogólniona limfadenopatia, u 2% miejscowa, a zaledwie u 5% psów występuje postać pozawęzłowa choroby (13).

Wśród chłoniaków B-komórkowych wyróżnia się obecnie wiele podkategorii różniących się od siebie nie tylko morfologią, ale również przebiegiem klinicznym, rokowaniem i wymagających innego podejścia terapeutycznego, co sprawia, że poszczególne typy chłoniaków wywodzących się z komórek B należy uznać za różne histologiczne jednostki chorobowe (13, 14, 15, 16). Najliczniejszą grupę chłoniaków B-komórkowych stanowią chłoniaki centroblastyczne wielopostaciowe (60–80,3%; 4, 12, 13, 16), które według klasyfikacji WHO tworzą wraz z chłoniakami immunoblastycznymi grupę chłoniaków rozlanych z dużych komórek B (diffuse large B-cell lymphoma – DLBCL). Wśród chłoniaków B-komórkowych o niskiej złośliwości największą grupę (ok. 18%) stanowią chłoniaki ze strefy brzeżnej, w tym charakterystyczne dla psów chłoniaki ze średnich komórek z makrojąderkiem (macronucleolated medium-sized cell lymphoma – MMC) – omówione dalej w tekście (13).

Klasyfikacja chłoniaków

Jak już wspomniano, u ludzi (a w wielu krajach także i u psów) podstawą klasyfikacji nowotworów układu chłonnego jest klasyfikacja WHO, która definiuje histologiczne jednostki chorobowe z uwzględnieniem takich cech, jak: obraz kliniczny, obraz morfologiczny rozrostu (oparty na badaniu histopatologicznym węzła chłonnego), immunofenotyp (ocena obecności poszczególnych części powierzchniowych) i zmiany genotypowe. Podstawą podziału chłoniaków w tej klasyfikacji jest stopień dojrzałości komórek nowotworowych. Rozróżnia się więc chłoniaki z komórek prekursorowych, które wywodzą się z pierwotnych narządów chłonnych (szpik kostny i grasica) oraz chłoniaki z komórek dojrzałych, które w warunkach fizjologicznych znajdują się w tzw. obwodowych narządach limfatycznych (węzły chłonne, śledziona, kępkę Peyera, tkanka limfatyczna związana z błonami śluzowymi – MALT). Chociaż klasyfikacja WHO została stworzona do klasyfikowania chłoniaków u ludzi, zaadaptowano ją do stosowania u psów i pozwala z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć zachowanie biologiczne nowotworu u tego gatunku zwierząt (13, 16, 17, 18). W klasyfikacji chłoniaków wg WHO wyróżnia się ok. 30 podtypów chłoniaków, z których większość przypomina rozpoznawane u ludzi (19). Jednak brak jest badań obejmujących całościową ocenę parametrów immunofenotypowych, genetycznych, molekularnych i klinicznych u psów z chłoniakiem. Pewną niedogodnością stosowania klasyfikacji WHO u zwierząt jest konieczność wykonania badania histopatologicznego węzła chłonnego pobranego w czasie zabiegu chirurgicznego, co w praktyce klinicznej nie zawsze bywa możliwe. Nawet w Stanach Zjednoczonych, gdzie medycyna weterynaryjna stoi na najwyższym poziomie, badanie histopatologiczne jako metoda potwierdzenia rozpoznania chłoniaka jest stosowana jedynie w 28% przypadków (3).

Drugą powszechnie stosowaną w badaniach naukowych oraz częściej w praktyce weterynaryjnej klasyfikacją chłoniaków jest klasyfikacja kilońska. Jej podstawowym założeniem jest podział chłoniaków ze względu na immunofenotyp komórek nowotworowych (chłoniaki B-komórkowe i chłoniaki T-komórkowe) oraz stadium

zróznicowania komórek nowotworowych (podział na chłoniaki o niskiej i wysokiej złośliwości). W ocenie cytologicznej chłoniaków w klasyfikacji kilońskiej bierze się pod uwagę następujące kryteria: wielkość komórek (komórki małe, średnie i duże) określoną przez porównanie wielkości jądra komórek do wielkości erytrocytów, kształt jądra komórkowego, struktura chromatyny jądrowej, obecność, wielkość i rozmieszczenie jąder komórkowych, objętość oraz barwność cytoplazmy, wartość indeksu mitotycznego. Określenie fenotypu wymaga przeprowadzenia barwień immunohistochemicznych/immunocytochemicznych z zastosowaniem co najmniej dwu przeciwciał: anti-CD3 (marker limfocytów T) oraz anti-CD79alfa (marker komórek B). Badania własne wykazały, że w wielu podtypach chłoniaków ocena mikroskopowa preparatów cytologicznych barwionych metodami rutynowymi pozwala z dużą dozą prawdopodobieństwa oszacować fenotyp rozrostu; trafność rozpoznania określono na 90% (20). Przydatność klasyfikacji kilońskiej w prognozowaniu efektów chemioterapii różnych typów chłoniaków wykazano w badaniach przeprowadzonych przez badaczy francuskich. W badaniach tych wykazano wyraźne różnice w czasie trwania pierwszej remisji i całkowitego czasu przeżycia pacjentów w zależności od podtypu chłoniaków sklasyfikowanych w oparciu o uaktualnioną klasyfikację kilońską zaadaptowaną do stosowania u psów (4). W większości przypadków udaje się na podstawie badania cytologicznego przyporządkować podtyp chłoniaka określony w klasyfikacji kilońskiej do podtypu określanego według klasyfikacji WHO.

Określenie podtypu chłoniaka w praktyce klinicznej

Pomimo że badanie histopatologiczne jest podstawą rozpoznawania chłoniaków u psów, to badania ankietowe przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych w czasie corocznej konferencji Veterinary Cancer Society w 2009 r. (ponad połowa ankietowanych lekarzy weterynarii była certyfikowanymi onkologami weterynaryjnymi) wykazały, że w 88% przypadków rozpoznawanie w praktyce klinicznej opiera się na badaniu cytopatologicznym materiału komórkowego pobranego ze zmienionych węzłów chłonnych lub narządów wewnętrznych. Z kolei badanie histopatologiczne węzłów chłonnych wykonywano jedynie u 28% psów z chłoniakiem (3), zaś immunofenotypowanie komórek nowotworowych rekomendowało 76% respondentów (3). Z powyższych danych wynika, że obecnie w praktyce klinicznej cytologia odgrywa kluczową rolę w rozpoznawaniu chłoniaków u psów. Badanie to

cechuje się dokładnością, łatwością wykonania, niską ceną, a zgodność z wynikami badania histopatologicznego jest bardzo wysoka, szczególnie w przypadku chłoniaków z dużych rozlanych komórek B, chłoniaków strefy T/chłoniaków z komórek jasnych, chłoniaków ze strefy brzeżnej, chłoniaków z obwodowych komórek T (chłoniaki o wysokiej złośliwości) oraz chłoniaków limfoblastycznych (21). Czynniki, które mogą decydować o znaczącej roli badań cytologicznych w rozpoznawaniu chłoniaków u psów, są: możliwość wykonania immunofenotypowania komórek rozrostu w preparatach cytologicznych (immunocytochemia) oraz fakt, że większość chłoniaków rozpoznawanych u psów to chłoniaki rozlane utworzone z komórek średnich i dużych, stosunkowo łatwe do identyfikacji (3). Jednak nawet w przypadku niektórych chłoniaków utworzonych z komórek małych obraz cytologiczny jest bardzo specyficzny, np. chłoniaki z komórek jasnych. Badania własne wykazały z jednej strony, że w warunkach krajowych rozpoznawanie chłoniaków u psów w 90% przypadków opiera się na badaniu cytologicznym, a z drugiej strony, że to badanie pozwala na precyzyjne rozpoznanie rozrostu u znakomitej większości pacjentów (10, 20).

Coraz więcej publikowanych badań rekomenduje badanie cytologiczne jako wystarczającą metodę rozpoznawania chłoniaków u psów w warunkach praktycznych, szczególnie gdy jest ona poparta barwieniami immunocytochemicznymi lub/i analizą z użyciem cytometrii przepływowej (3, 22, 23, 24). Istnieją dwie podstawowe przesłanki wskazujące cotydiagnozy jako podstawę rozpoznawania chłoniaków u psów. Po pierwsze, biopsja cienkoigłowa, która służy do pobrania materiału, jest metodą akceptowaną przez praktycznie wszystkich właścicieli psów z podejrzeniem chłoniaka. Po drugie, zdecydowana większość rozpoznawanych chłoniaków należy do 3 lub 4 kategorii, w których obraz cytologiczny jest bardzo charakterystyczny, a zastosowanie barwień immunocytochemicznych zazwyczaj rozwiewa wątpliwości w przypadkach niejednoznacznych. Trzeba też pamiętać, że pomimo wysokiej skuteczności badania histopatologicznego w rozpoznawaniu chłoniaków, nawet to badanie, o ile niepoparte barwieniami immunohistochemicznymi, jest obarczone pewnym błędem. W badaniu obejmującym dużą grupę psów z chłoniakami o powolnym przebiegu (chłoniaki B- i T-komórkowe) zastosowanie immunofenotypowania wymagało zmian rozpoznania aż w 20,4% przypadków (18). Największe rozbieżności były w przypadku chłoniaków ze strefy brzeżnej, po wykazaniu dodatniej reakcji z CD3, aż w ¼ przypadków zmieniono

rozpoznanie na chłoniaki ze strefy T – patrz dalej w tekście (18). Niektóre chłoniaki ze strefy T mogą w obrazie histologicznym „naśladować” chłoniaki ze strefy brzeżnej (chłoniaki z komórek B) także u ludzi (25). Wydaje się, że biopsja wycięciowa węzła chłonnego i badanie histopatologiczne powinno być ograniczone jedynie do przypadków niejednoznacznych cytologicznie (24).

Klasyfikacja kilońska jest szczególnie polecana w przypadku oceny mikroskopowej opartej na badaniach cytologicznych, bowiem jej głównym założeniem jest ocena morfologii komórek i jej przyporządkowanie do poszczególnych stadiów dojrzewania limfocytów (26). Fournel-Fleury i wsp. (26) wskazują, że brak dobrze udokumentowanych danych epidemiologicznych, fenotypowych i genetycznych odnośnie do chłoniaków u psów powoduje, że zaadaptowanie klasyfikacji WHO sprawia pewne problemy. Klasyfikacja kilońska zaadaptowana dla psów ma jeszcze inną zaletę, mianowicie istnieje duża korelacja między obrazem cytologicznym komórek nowotworowych a ich immunofenotypem, co sprawia, że określenie dokładnego typu rozrostu (łącznie z jego immunofenotypem) jest stosunkowo łatwe (13). Badania własne przeprowadzone na dużej grupie chłoniaków potwierdziły powyższe spostrzeżenia, że obraz cytologiczny rozmazów barwionych barwnikiem Giemsy pozwala z wysokim prawdopodobieństwem oszacować immunofenotyp komórek chłoniaka (10). Wyjątkiem są chłoniaki limfoblastyczne oraz chłoniaki immunoblastyczne, dla których immunofenotypowanie wymaga zastosowanie barwienia immunocytochemicznego (20, 26).

Chłoniaki z komórek B

Podstawowym kryterium zakwalifikowania rozrostu nowotworowego do grupy chłoniaków B-komórkowych jest wykazanie na powierzchni komórek nowotworowych antygenów powierzchniowych CD79α, CD19, CD20 oraz CD22. Pomimo problemów z zastosowaniem klasyfikacji WHO u psów, jej niezaprzeczną zaletą jest utworzenie jednostek histoklinicznych chłoniaków pod kątem architektury rozrostu, stopnia dojrzałości oraz morfologii komórek nowotworowych, immunofenotypu, genotypu, a co najistotniejsze także przebiegu klinicznego choroby. Stosowanie równoległe dwóch klasyfikacji podczas oceny chłoniaków u psów przysparza wiele trudności zarówno patologom, jak i klinicytom, jednak umożliwia porównywanie wyników badań pomiędzy sobą. Na szczęście w przypadku chłoniaków B-komórkowych u psów większość jednostek sklasyfikowanych na podstawie preparatów

Tabela 1. Poszczególne typy chłoniaków B-komórkowych według klasyfikacji kilońskiej wraz z ich odpowiednikami w klasyfikacji WHO (13)

ZAKTUALIZOWANA KLASYFIKACJA KILOŃSKA	KLASYFIKACJA WHO
Chłoniaki o niskim stopniu złośliwości	Nowotwory z obwodowych komórek B
Z małych komórek B:	
- limfocytowy	Chłoniak z małych limfocytów B o niskim stopniu złośliwości
- prolimfocytowy	
- limfoplazmocytowy	Limfoplazmocytowy
Ze strefy brzeżnej	
	Ze strefy brzeżnej
	- postać węzłowa
	- postać pozawęzłowa
	- postać śledzionowa
Centroblastyczno-centrocytowy	Grudkowy I/II stopnia
Chłoniaki o wysokim stopniu złośliwości	
Centroblastyczny jednopostaciowy	
- podtyp grudkowy	Grudkowy III stopnia
- podtyp rozlany	Chłoniak rozlany z dużych komórek B
Centroblastyczny wielopostaciowy	Chłoniak rozlany z dużych komórek B
Immunoblastyczny	Chłoniak rozlany z dużych komórek B
Typu Burkitta	Chłoniak Burkitta
Plazmocytoïdny	Brak odpowiednika
Limfoblastyczny	Nowotwory z prekursorowych komórek B

cytologicznych za pomocą klasyfikacji kilońskiej ma swoje odpowiedniki w klasyfikacji WHO (tab. 1; 13, 16).

Jak już wspomniano, chłoniaki z komórek B stanowią niejednorodną grupę nowotworów o różnej morfologii oraz przebiegu klinicznym, rokowaniu, a także wymagają innego postępowania terapeutycznego. Poniżej opisano wybrane najpowszechniejsze podtypy chłoniaków B-komórkowych u psów.

Chłoniaki B-komórkowe o wysokiej złośliwości

Chłoniaki rozlane z dużych komórek B (diffuse large B-cell lymphoma – DLBCL)

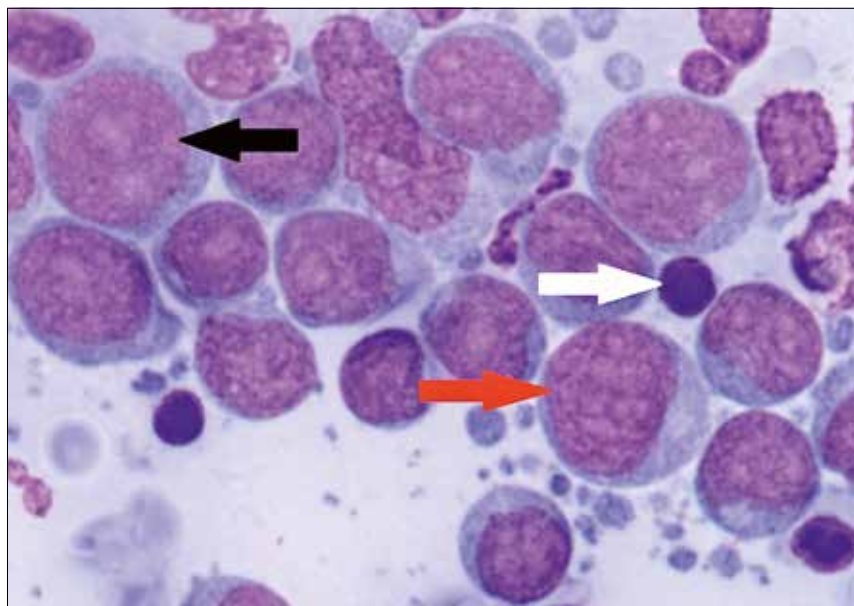
W klasyfikacji WHO jest to grupa chłoniaków o wysokiej złośliwości, utworzonych z dużych (o średnicy jądra komórkowego równej 2–2,5 erytrocytów), niedojrzałych

komórek B. Można je podzielić pod względem morfologii komórek (taki podział występuje w klasyfikacji kilońskiej) na chłoniaki centroblastyczne (CB) oraz immunoblastyczne (IB). Chłoniaki centroblastyczne są najlicniejszą grupą chłoniaków B-komórkowych u psów (8, 9, 12, 27, 13, 28), stanowiąc 76,5–83% chłoniaków rozlanych z dużych komórek B i ponad połowę wszystkich chłoniaków u psów (9, 13, 28); 16–24% chłoniaków rozlanych z dużych komórek B i ok. 15% wszystkich chłoniaków stanowią chłoniaki immunoblastyczne (9, 13, 28). Ze względu na to, że chłoniaki rozlane z dużych komórek B u psów (inaczej niż u ludzi) zawierają pewien odsetek komórek średnich z makrojąderkiem (MMC), nie można wykluczyć, że powstają one przez transformację chłoniaków ze strefy brzeżnej węzła chłonnego (9, 13).

Chłoniaki centroblastyczne (CB) według klasyfikacji kilońskiej dzielą się pod względem morfologii oraz wielkości komórek na chłoniaki centroblastyczne monomorficzne (jednopostaciowe) oraz chłoniaki centroblastyczne polimorficzne (wielopostaciowe). W obrębie chłoniaków monomorficznych wyróżnia się bardzo rzadki u psów podtyp grudkowy (w którym komórki mają tendencję do tworzenia grudek) oraz podtyp rozlany (brak tworzenia grudek). Chłoniaki pleomorficzne mogą występować z przewagą komórek małych (te są najczęściej spotykane) oraz z przewagą komórek dużych. W klasyfikacji WHO wszystkie wyżej wymienione typy chłoniaków centroblastycznych poza chłoniakiem centroblastycznym monomorficznym grudkowym należą do grupy chłoniaków rozlanych z dużych komórek B. Chłoniak centroblastyczny monomorficzny grudkowy zaliczany jest do grupy chłoniaków grudkowych – follicular lymphoma III stopnia złośliwości. Chłoniaki monomorficzne stanowią zaledwie 3% chłoniaków centroblastycznych, a cała grupa chłoniaków grudkowych jest rzadko spotykana u psów (ok. 2% wszystkich chłoniaków; 9).

Chłoniaki centroblastyczne monomorficzne składają się z jednorodnej populacji (ponad 60% komórek) średnich i dużych komórek (średnica jądra większa niż 2 erytrocyty) z okrągłym jądrem zawierającym 2–4 małe jąderka umieszczone pod błoną jądrową i niewielką ilością lekko zasadochłonnej cytoplazmy (9, 12, 13). Stanowią one nie więcej niż 1,3% chłoniaków centroblastycznych (12, 13).

Chłoniaki centroblastyczne polimorficzne składają się w większości (nawet 80% komórek) z małych blastów z okrągłym jądrem o nieregularnie zagęszczonym chromatynie (z większym zagęszczeniem na obwodzie jądra), licznymi jąderkami i wąskim pasmem silnie zasadochłonnej



Ryc. 1. Obraz cytologiczny chłoniaka centroblastycznego. Zdjęcie pokazuje różnice w wielkości immunoblastów (czarna strzałka), centroblastów (czerwona strzałka) w porównaniu do małych limfocytów (biała strzałka). Barwienie odczynnikiem Giemsa, powiększenie 400×

chromatyny. Oprócz małych blastów obecne są centroblasty (od 20 do 50% komórek), komórki średnie z makrojąderkiem (< 20%) oraz immunoblasty (< 20%; 9, 13; **ryc. 1, 2, 3**). Podtyp wielopostaciowy obserwowany jest w 97% chłoniaków centroblastycznych i stanowi aż 60–83% wszystkich chłoniaków z komórek B (4, 9, 13). Figury mitotyczne są od średnio licznych (3–5/ w polu widzenia przy dużym powiększeniu, zazwyczaj 400×; high power field – HPF) do bardzo licznych – ok. 10 mitoz/HPF (9, 13). Zależnie od wielkości dominujących komórek chłoniaki centroblastyczne wielopostaciowe dzieli się na chłoniaki z przewagą komórek małych – gdy zawierają ok. 80% komórek małych – lub z przewagą komórek dużych (12). Chłoniaki centroblastyczne polimorficzne z przewagą komórek małych stanowią 66% chłoniaków w tej grupie i aż 40% wszystkich chłoniaków B-komórkowych (9, 12). Psy z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym prezentowane są w stadium klinicznym IIIa–Va z uogólnioną limfadenopatią, która rozwija się przez 1–4 tygodnie, początkowo bez innych objawów klinicznych. Następnie dochodzi do zajęcia wątroby, śledziony oraz szpiku kostnego (13).

Czas przeżycia od rozpoczęcia leczenia waha się od 7 do 21 miesięcy (4, 16). Chemioterapia znacząco przedłuża życie psów z chłoniakiem centroblastycznym niezależnie od zawartości daunohydroksyrybicyny w protokole leczniczym, natomiast leczenie wyłącznie prednizonem nie wydłuża znacząco czasu przeżycia (16). Niestety,

niewiele jest szczegółowych danych odnośnie do przeżycia psów z chłoniakiem centroblastycznym.

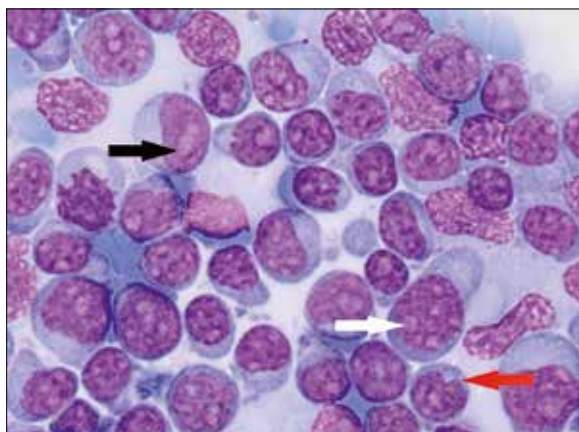
Chłoniaki immunoblastyczne (IB) stanowią ok. 12% chłoniaków B-komórkowych i niecałe 8% wszystkich chłoniaków. Kryterium rozpoznania to stwierdzenie zawartości ponad 80% immunoblastów (komórki z dużym okrągłym jądrem komórkowym z jednym, centralnie położonym jądrem oraz obfitą cytoplazmą; 9, 13). Chłoniak immunoblastyczny może zawierać także komórki średnie z makrojąderkiem, centroblasty oraz małe blasty, ale zawartość każdego z tych rodzajów komórek nie może przekraczać 10%, indeks mitotyczny jest zazwyczaj wysoki, ok. 9 mitoz/HPF (9, 13). Średni czas przeżycia dla psów z chłoniakiem immunoblastycznym wynosi 308 dni, jednak dane te mają charakter orientacyjny, ponieważ obliczone zostały dla wspólnej grupy psów zarówno objętych, jak i nieobjętych leczeniem (16).

Jak wspomniano wyżej, chłoniaki immunoblastyczne oraz chłoniaki centroblastyczne według klasyfikacji WHO tworzą jedną grupę, z kolei klasyfikacja kilońska traktuje je jako dwa oddzielne podtypy. Co więcej, zwykle się uważa, że chłoniaki immunoblastyczne wykazują bardziej agresywny charakter biologiczny niż chłoniaki centroblastyczne (16). Obecnie odchodzi się od tego poglądu, czego odzwierciedleniem jest połączenie omawianych chłoniaków w grupę DLBCL w klasyfikacji WHO. Ponieważ jednak DLBCL są bardzo obszerną grupą, niejednorodną

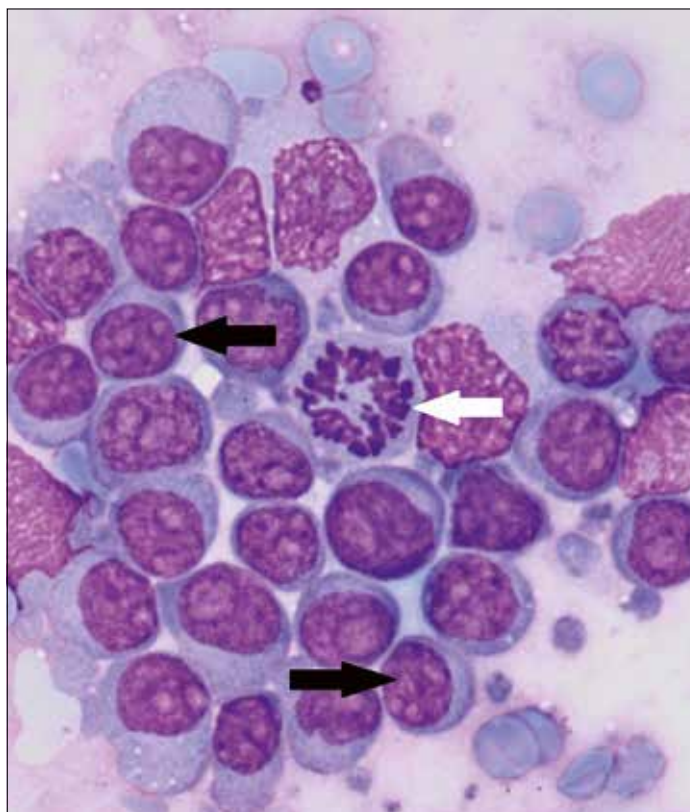
pod względem charakteru biologicznego, Valli zaproponował, żeby różnicować DLBCL pod względem aktywności proliferacyjnej, mierzonej za pomocą wartości indeksów mitotycznych – IM (16). W jego badaniach obejmujących 944 psy z chłoniakiem z USA, Kanady i Europy czas przeżycia wśród psów z DLBCL różnił się znacząco zależnie od wartości indeksów mitotycznych. Przy wartości indeksu mitotycznego mniejszej niż 20/HPF średni czas przeżycia od momentu rozpoznania wynosił 188 dni, natomiast przy wartości 21 lub więcej/HPF tylko 31 dni (16).

Chłoniaki z komórek średnich o wysokim stopniu złośliwości – chłoniaki limfoblastyczne – chłoniaki typu Burkitta

Chłoniaki te zarówno w klasyfikacji kilońskiej, jak i WHO stanowią dwie oddzielne grupy – z tym że w klasyfikacji WHO chłoniak limfoblastyczny (lymphoblastic lymphoma – LBL) występuje jako rozrost z komórek prekursorowych. Jednak ze względu na wspólne cechy, takie jak złośliwy charakter biologiczny, trudności w leczeniu i krótki okres remisji choroby, chłoniaki limfoblastyczne z komórek B i T oraz chłoniaki typu Burkitta można omawiać jako wspólną grupę chłoniaków z komórek średnich o wysokim stopniu złośliwości (16). Dodatkowo zbliżona morfologia powoduje, że odróżnianie chłoniaków limfoblastycznych B-komórkowych od chłoniaków typu Burkitta nastęrcza wiele trudności nawet po



Ryc. 2. Obraz cytologiczny chłoniaka centroblastycznego. Widoczne duże blasty – immunoblast (duże centralnie położone jąderko – strzałka czarna), centroblast (liczne jąderka położone na obwodzie jądra – strzałka biała) oraz komórka w typie centrocyta, z charakterystycznym wcięciem jądrowym (strzałka czerwona). Barwienie odczynnikiem Giemsa, powiększenie 400×



Ryc. 3. Obraz cytologiczny chłoniaka centroblastycznego wielopostaciowego. W tym typie chłoniaka większość komórek stanowią małe blasty z okrągłym jądrem o nieregularnie zagęszczonej, licznymi jąderkami i wąskim pasmem silnie zasadochłonnej chromatyny (czarne strzałki). Figury mitotyczne są od średnio licznych do licznych (biała strzałka). Barwienie odczynnikiem Giemsa, powiększenie 400×

zastosowaniu immunofenotypowania (11). W przypadku chłoniaków limfoblastycznych określenie immunofenotypu jest niemożliwe bez wykonania barwienia immunocytochemicznego, jednak z klinicznego punktu widzenia takie barwienie nie jest konieczne, ponieważ nie wykazano związku pomiędzy immunofenotypem chłoniaków limfoblastycznych i rokowaniem (16).

Aktualnie brakuje ujednoczonych kryteriów rozpoznawania chłoniaków limfoblastycznych u psów na podstawie morfologii komórek. Jądra komórkowe opisywane są jako małej lub średniej wielkości, chromatyna jest rozproszona, o nieregularnej kondensacji, czasami z zagęszczeniem na obwodzie. Według niektórych autorów małe jąderka w ilości jednego lub więcej są wyraźnie widoczne, jednak większość opisuje jąderka jako słabo widoczne lub całkowicie przesłonięte chromatyną. Cytoplazma komórek jest skąpa, lekko zasadochłonna, tworząca cienką obwódkę dookoła jądra (4, 9, 12, 16). Komórki chłoniaków limfoblastycznych dzielą się bardzo intensywnie, w związku z czym występują bardzo liczne figury mitotyczne (4, 9). Komórki pobrane ze szpiku kostnego lub z krwi mogą być mniejsze od komórek pobranych z węzłów chłonnych (4).

Chłoniaki limfoblastyczne z komórek B cechuje wysoka złośliwość i stanowią od 1 do 8% wszystkich chłoniaków u psów (9, 12, 16). Chociaż odsetek chłoniaków z komórek B wśród wszystkich chłoniaków limfoblastycznych u psów wyniósł według Valli nawet 40% (16), to w większości badań wykazano, że przeważają chłoniaki limfoblastyczne o immunofenotypie T, a w niektórych pracach chłoniaki limfoblastyczne T-komórkowe były w ogóle jedynymi chłoniakami limfoblastycznymi (4, 13, 28). Z tego powodu brak jest danych klinicznych dotyczących psów z chłoniakiem limfoblastycznym B-komórkowym.

Chłoniaki typu Burkitta wywodzą się z dojrzałych, obwodowych limfocytów B ośrodków rozmnażania grudek chłonnych i stanowią 1–16% chłoniaków B-komórkowych (4, 9, 13) oraz ok. 2% wszystkich chłoniaków u psów (16). Grupa ta występuje zarówno w klasyfikacji kilońskiej, jak i WHO. Morfologicznie są to średniej wielkości komórki z okrągłym jądrem z chromatyną pozbijaną w grudki i licznymi jąderkami. Cytoplazma jest silnie zasadochłonna i czasami zwakuolizowana (9, 13). Indeks mitotyczny jest wysoki (powyżej 6 mitoz/HPF, nawet 24/400x) z odsetkiem komórek dzielących się (Ki67) ok. 80% (4, 9, 13). U psów z chłoniakiem typu Burkitta obserwuje się uogólnioną limfadenopatię, rzadko limfadenopatię miejscową lub postać pozawęzłową (z zajęciem m.in. śledziony lub migdałków), często z zajęciem jelita; 70% pacjentów prezentowanych jest

w zaawansowanym stadium klinicznych choroby (III i IV). Najczęściej obserwowane objawy kliniczne to anoreksja, osłabienie, biegunka oraz polidypsja/poliuria z hiperkalcemią, powiększenie śledziony i wątroby, a także krwista biegunka tuż przed śmiercią (4, 13). Średni czas od rozpoczęcia leczenia do śmierci wynosi 15 dni (7–21 dni; 4).

Średni czas przeżycia dla chłoniaków z komórek średnich o wysokim stopniu złośliwości (chłoniaki limfoblastyczne T i B oraz Burkitta) liczony dla wspólnej grupy psów leczonych oraz nieleczonych wynosi 160 dni (16).

Chłoniaki plazmocytoïdne B-komórkowe

Chłoniaki te są rzadko rozpoznawane u psów, stanowią bowiem ok. 1,5% chłoniaków B-komórkowych i poniżej 1% wszystkich chłoniaków u tego gatunku zwierząt (13). Fenotyp B-komórkowy został rozpoznany jedynie w ¼ wszystkich chłoniaków plazmocytoïdnych u psów. Ponieważ ten typ rozrostu nie występuje u ludzi, nie ma on swojego odpowiednika w klasyfikacji WHO, rozpoznawany jest jedynie w oparciu o klasyfikację kilońską (13). Chłoniak plazmocytoïdny B-komórkowy utworzony jest z komórek o biegunowo położonym, okrągłym, małym lub średniej wielkości jądrze komórkowym z małym, centralnie położonym jąderkiem. Charakterystyczna jest obfita, zasadochłonna cytoplazma z przejaśnieniem w okolicy jądra komórkowego przypominająca cytoplazmę komórek plazmatycznych (13). Indeks mitotyczny jest wysoki i wynosi ok. 7 mitoz/HPF (13). Chłoniaka plazmocytoïdnego B-komórkowego trzeba różnicować z chłoniakiem typu Burkitta o różnicowaniu plazmatycznym – chłoniak plazmocytoïdny ma jednak większe jądro komórkowe, jedno, centralnie położone jąderko oraz niższy indeks mitotyczny (13). Dane kliniczne dla tej grupy chłoniaków są skąpe. Średnia wieku u psów z chłoniakiem plazmocytoïdnym B-komórkowym w momencie postawienia rozpoznania wynosi 10 lat, samce wydają się być predysponowane [w badaniach Ponce (13) 5 na 6 psów było samcami (13)]. Psy prezentowane są najczęściej z uogólnioną limfadenomegalią (13). Większość danych klinicznych na temat chłoniaków plazmocytoïdnych dotyczy chłoniaków T-komórkowych, dlatego została zaprezentowana w artykule dotyczącym chłoniaków T-komórkowych u psów.

Chłoniaki o niskiej złośliwości

Grupa chłoniaków B-komórkowych o niskim stopniu złośliwości klinicznej (low grade B cell lymphoma – LGBC) może występować jako konsekwencja długotrwałych

rozrostów odczynowych tkanki limfatycznej, część chłoniaków z tej grupy zaliczana jest do chłoniaków indolentnych (chłoniaki o łagodnym/powolnym przebiegu klinicznym; 12, 14). Poza chłoniakami z komórek B, do tej grupy chłoniaków zalicza się także chłoniaki ze strefy T, które są liczniejsze od B-komórkowych (62%; 18). Według klasyfikacji WHO do chłoniaków B-komórkowych o niskim stopniu złośliwości należą: chłoniaki z komórek płaszczka (mantle cell lymphomas – MCL), chłoniaki ze strefy brzeżnej ośrodków rozmnażania grudek chłonnych w węzłach chłonnych lub śledzionie (marginal zone lymphomas – MZL), chłoniaki grudkowe (follicular lymphomas – FL), chłoniaki centrocytarne, chłoniaki limfoplazmocytoïdne i chłoniaki plazmocytoïdne (14, 18). W tym miejscu należy zaznaczyć, że jednostki te stworzone zostały w oparciu o badania histopatologiczne i większości z nich nie da się rozpoznać w badaniu cytopatologicznym, ze względu na brak możliwości oceny architektury tkankowej (16, 18). Postawienie rozpoznania bywa trudne także na podstawie oceny preparatów histopatologicznych, zwłaszcza w chłoniakach o zaawansowanym stadium, ponieważ tracą one wtedy charakterystyczny układ grudkowy i mogą zostać pomyłone z chłoniakami o wysokim stopniu złośliwości (głównie DLBCL; 14, 18). Do postawienia prawidłowego rozpoznania w przypadku chłoniaków indolentnych nieocenione jest badanie immunohistochemiczne; w badaniach Flood-Knapik i wsp. (18) zastosowanie immunofenotypowania wymusiło zmianę rozpoznania podtypu chłoniaka w 10% przypadków. U ludzi do rozpoznania niektórych chłoniaków B-komórkowych o niskiej złośliwości, takich jak MCL, wymagane jest wykazanie ekspresji CD5 oraz cykliny D1, braku ekspresji CD10 i CD23 oraz wykazanie translokacji konkretnego genu (13).

Bazując na klasyfikacji kilońskiej, do chłoniaków B-komórkowych o niskiej złośliwości zalicza się chłoniaki z małych limfocytów, prolimfocytowe, limfoplazmocytoïdne, MZL i centroblasto-centrocytoïdne (13).

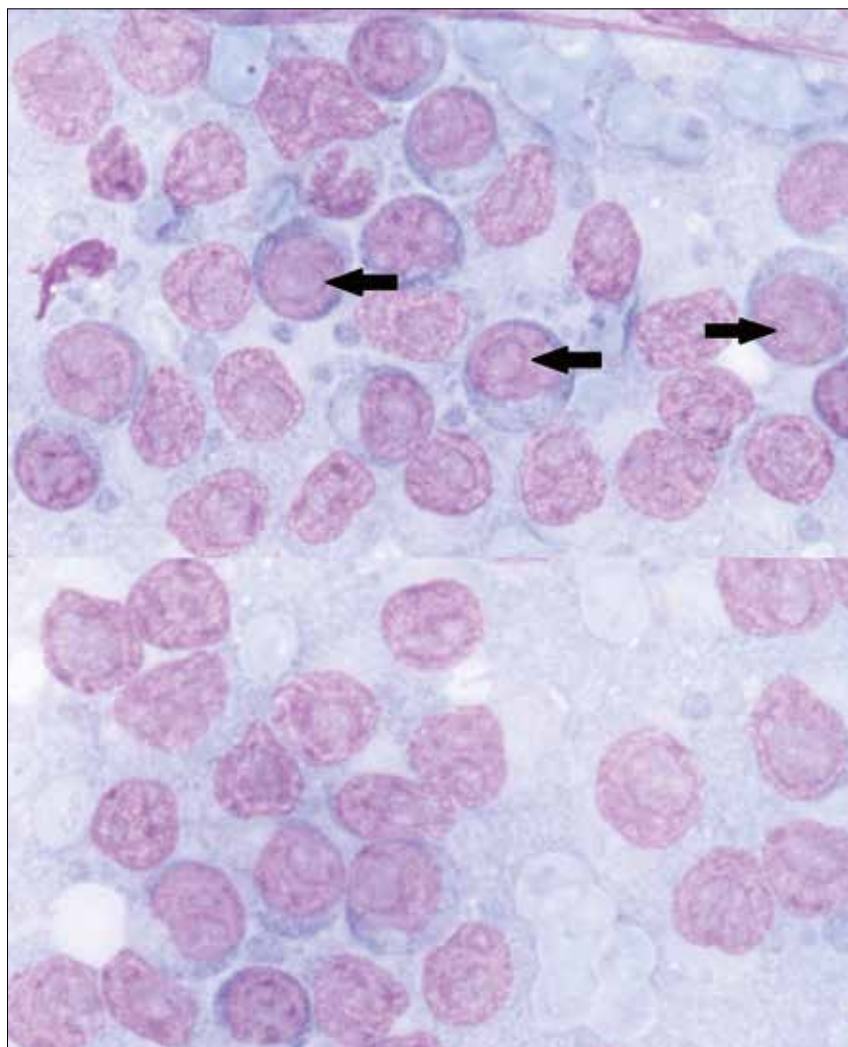
Chłoniaki strefy brzeżnej (w dawnej klasyfikacji kilońskiej chłoniaki z MMC)

U psów, tak jak u ludzi chłoniaki ze strefy brzeżnej dzielą się na 3 postaci ze względu na miejsce występowania – węzłową, śledzionową i powstające w obrębie rozproszonej tkanki limfatycznej związanej z błoną śluzową (mucosa – associated lymphoid tissue – MALT), głównie jelit. Postać węzłowa u psów stanowi 85% przypadków i cytologicznie jawi się jako chłoniak z komórek średnich z makrojąderkiem (u ludzi, jak już wspomniano, ten typ komórek nie występuje), chłoniak z małej do średniej

wielkości komórek (jądro o średnicy ok. 1,5 RBC) z okrągłym jądrem z jednym, dużym, centralnie położonym jąderkiem. Cytoplazma jest lekko zasadochłonna umiarkowanej ilości (9, 12, 13; **ryc. 4**). MMC są charakterystyczne dla psów i wszystkie te komórki wykazują immunofenotyp B (12, 14). Są one podobne do immunoblastów, jednak należy pamiętać, że immunoblasty są znacznie większe (średnica jądra 2–2,5 RBC; 16). MZL stanowi 17% chłoniaków B-komórkowych (13) i 8–10% wszystkich chłoniaków u psów (9, 13). Charakter nacieku jest rozproszony, jednak wiele komórek, przynajmniej miejscowo, tworzy grudki (13). Indeks mitotyczny na początku trwania choroby jest niski (praktycznie brak mitoz), jednak aktywność proliferacyjna może się zwiększać w zaawansowanym stadium choroby (nawet do 5–10/HPF; 9, 14). Średnia wieku psów z chłoniakiem ze strefy brzeżnej wynosi 9 lat, a objawy kliniczne obejmują najczęściej uogólnione lub miejscowe powiększenie węzłów chłonnych, rzadziej obecność ogniskowych mas nowotworowych w śledzionie, wykrytych za pomocą palpacji lub jako przypadkowe odkrycie podczas badania ultrasonograficznego (14, 18). Stopień zaawansowania choroby podczas postawienia rozpoznania, wielkość komórek, ilość mitoz w HPF, odsetek komórek dzielących się (mierzonych za pomocą barwienia immunocytochemicznego w kierunku ekspresji antygenu Ki67) nie ma znaczenia prognostycznego w tym typie chłoniaka (18). Ocena ekspresji antygenu Ki67 może być przydatna do różnicowania późnego stadium chłoniaka ze strefy brzeżnej od wczesnego stadium DLBCL, jednak nie zostało to jeszcze dostatecznie udokumentowane (18).

Chłoniak z małych limfocytów B

Rozpoznanie cytologiczne chłoniaka z małych limfocytów B (który stanowi jedynie 0,5% chłoniaków B-komórkowych; 13) jest możliwe wtedy, gdy w preparacie cytologicznym materiału pobranego z powiększonego węzła chłonnego zamiast mieszanej populacji komórkowej (typowej dla rozrostu odczynowego) obserwujemy jednolitą populację małych komórek przypominających limfocyty, z okrągłym jądrem z chromatyną zbitą w grudki i skąpą cytoplazmą i dodatkowo potwierdzimy immunofenotyp B. Może występować domieszka prolimfocytów, które są nieco większe (jądro od małej do średniej wielkości) i mają bardziej obfitą cytoplazmę oraz centralnie położone jąderko (13). Indeks mitotyczny jest niski (0–2 mitozy/HPF), nie dochodzi do wystąpienia postaci białaczkowej (nowotworowe limfocyty nie pojawiają się w szpiku kostnym ani w krwi; 9, 13). Prolimfocyty mogą się też pojawiać



Ryc. 4. Obraz cytologiczny chłoniaka z komórek średnich z makrojąderkiem (macronucleolated medium-sized cell - MMC). Komórki MMC, charakterystyczne dla MZL u psów to średniej wielkości komórki z okrągłym jądrem i jednym, dużym, centralnie położonym jąderkiem. Barwienie odczynnikiem Giemsa, powiększenie 400×

jako jednolita populacja komórek i takiego chłoniaka nazywa się chłoniakiem prolimfocytowym. Jest on bardzo rzadki i stanowi zaledwie 0,25% chłoniaków B-komórkowych u psów (13).

Chłoniak limfoplazmocytowy

Ten typ rozrostu stanowi ponad 2% chłoniaków B-komórkowych u psów. Mięsz rozrostu zawiera mieszaninę małych limfocytów różnicujących się w kierunku komórek plazmatycznych (małe komórki z okrągłym jądrem i silnie zasadochłonną cytoplazmą z przejaśnieniem przyjądrowym) i tworzących grudki (13). Komórki te, tak jak komórki plazmatyczne, produkują IgM oraz łańcuchy lekkie lambda przeciwciał, co można stwierdzić, wykonując badanie immunohistochemiczne (13).

Chłoniak centroblastyczno-centrocytowy

Chłoniak centroblastyczno-centrocytowy utworzony jest z mieszanej populacji centrocytów, centroblastów i komórek

dendrytycznych. Komórki tworzą układy grudkowe i według klasyfikacji WHO ten typ chłoniaka zalicza się do chłoniaków grudkowych I/II stopnia (13).

Psy z chłoniakiem o niskiej złośliwości lub z chłoniakiem indolentnym reagują gorzej na chemioterapię od psów z chłoniakami o wysokim stopniu złośliwości (ponieważ chemioterapia jest celowana w komórki intensywnie dzielące się), jednak choroba ma łagodniejszy przebieg kliniczny i dłuższy średni czas przeżycia. Co więcej, w badaniach Flood-Knapik i wsp. (18) leczenie ogólnoustrojowe psów z chłoniakiem indolentnym w postaci chemioterapii (protokół CP lub CHOP) lub samego prednizonu nie wpłynęło znacząco na średni czas przeżycia leczonych psów. Nie wiadomo jednak, czy brak różnic w czasie przeżycia pomiędzy psami, u których stosowano poszczególne rodzaje farmakoterapii, oraz u psów nieleczonych nie wynika z faktu, że sposób leczenia dobierany był przez lekarza na podstawie stanu klinicznego pacjenta oraz miejscowej lub uogólnionej postaci choroby. Na przykład 60% psów niepoddanych

leczeniu farmakologicznemu miało postać miejscową choroby i zostało poddanych zabiegowi chirurgicznemu, który był wystarczającą formą terapii. Zastanawiać może również fakt, że więcej psów zmarło z powodu chłoniaka w grupie psów leczonych według protokołu CHOP, co może świadczyć o tym, że do takiego rodzaju leczenia kwalifikowano przypadki o bardziej agresywnym przebiegu choroby (18).

Chociaż według Valli (16) średni czas przeżycia dla całej grupy psów z chłoniakami B-komórkowymi o niskiej złośliwości (LGBC) wynosi ok. 5,5 miesiąca, to liczony oddzielnie dla psów z MZL wyniósł aż 21 miesięcy (18). Należy pamiętać, że jest to klasyfikacja WHO, według której do LGBC zaliczany jest także chłoniak z komórek płaszczka, który mimo spokojnego wyglądu mikroskopowego ma znacznie gorsze rokowania od pozostałych chłoniaków indolentnych (6). Ponieważ postać śledzionowa MZL prawie zawsze ograniczona jest tylko do tego narządu (rzadko zmiany obejmują także węzeł chłonny węzła śledziony), dlatego leczy się ją wyłącznie za pomocą splenektomii (14, 18).

Piśmiennictwo

- Edwards D.S., Henley W.E., Harding E.F., Dobson J.M., Wood J.L.N.: Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Vet. Comp. Oncol.* 2003, **1**, 200–206.
- Pastor M., Chalvet-Monfray K., Marchal T., Keck G., Magnol J.P., Fournel-Fleury C., Ponce F.: Genetic and environmental risk indicators in canine non-Hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *J. Vet. Intern. Med.* 2009, **23**, 301–310.
- Regan R.C., Kaplan M.S.W., Bailey D.B.: Diagnostic evaluation and treatment recommendations for dogs with substage-a high-grade multicentric lymphoma: results of a survey of veterinarians. *Vet. Comp. Oncol.* 2012, **11**, 287–295.
- 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**, 125–126.
- Rebhun R.B., Kent M.S., Borrorfka S.A.E.B., Frazier S., Skorupski K., Rodriguez C.O.: CHOP chemotherapy for the treatment of canine multicentric T-cell lymphoma. *Vet. Comp. Oncol.* 2010, **9**, 38–44.
- Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L.: *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, Lyon, 2008.
- Stein H., Lennert K., Mason D.y., Gerdes J., Ziegler A., Naiem M., Wernet P.: Morphology and immunohistology of malignant lymphomas. W: *Advances in Comparative Leukemia Research*, Elsevier North Holland, New York, 1981.
- Teske E., Rutteman G.R., Kuipers-Dijkshoorn N.J., van Dieendonck J.H., van Heerde P., Cornelisse C.J.: DNA ploidy and cell kinetic characteristics in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp. Hematol.* 1993, **21**, 579–584.
- 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.
- Sapierzyński R.: Practical aspects of immunocytochemistry in canine lymphomas. *Pol. J. Vet. Sci.* 2010, **13**, 661–668.
- Vezzali E., Parodi A.L., Marcato P.S., Bettini G.: Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Vet. Comp. Oncol.* 2010, **8**, 38–49.
- Sözmen M., Tasca S., Carli E., De Lorenzi D., Furlanello T., Caldin M.: Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005, **17**, 323–330.
- Ponce F., Marchal T., Magnol J.P., Turinelli V., Ledieu D., Bonnefont C., Chabanne L., Pastor M.L., Delignette M.L., Fournel-Fleury C.: A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet. Pathol.* 2010, **47**, 414–443.
- Valli V.E., Vernau W., de Lorimier L.P., Graham P.S., Moore P.F.: Canine indolent nodular lymphoma. *Vet. Pathol.* 2006, **43**, 241–256.
- Poggi A., Miniscalco B., Morello E., Comazzi S., Gelain M.E., Aresu L., Riondato E.: Flow cytometric evaluation of ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. *Vet. Comp. Oncol.* 2013, doi: 10.1111/vco.12078.
- Valli V.E., Kass P.H., San Myint M., Scott F.: Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Vet. Pathol.* 2013, **50**, 738–748.
- Aresu L., Martini V., Rossi F., Vignoli M., Sampaolo M., Aricò A., Laganga P., Pierini A., Frayssinet P., Mantovani R., Marconato L.: Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic correlation. *Vet. Comp. Oncol.* doi: 10.1111/vco.12048
- Flood-Knapik K.E., Durham A.C., Gregor T.P., Sanchez M.D., Durney M.E., Sorenson K.U.: Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. *Vet. Comp. Oncol.* 2012, **11**, 272–286.
- Marconato L.: The staging and treatment of multicentric high-grade lymphoma in dogs: A review of recent developments and future prospects. *Vet. J.* doi:10.1016/j.tvjl.2010.04.027.
- Sapierzyński R., Dolka I., Fabisiak M.: High agreement of routine cytopathology and immunocytochemistry in canine lymphomas. *Pol. J. Vet. Sci.* 2012, **15**, 247–252.
- Comazzi S., Guscetti F., Marconato L.: First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma. CH-Lugano, 22 June 2013. *Hematol. Oncol.* 2014, **32**, 68–71.
- Avery P.R., Burton J., Bromberek J.L., Seelig D.M., Elmshie R., Correa S., Ehrhart E.J., Morley P.S., Avery A.C.: Flow Cytometric Characterization and Clinical Outcome of CD4+ T-Cell Lymphoma in Dogs: 67 Cases. *J. Vet. Intern. Med.* 2014, **28**, 538–546.
- Martini V., Poggi A., Riondato E., Gelain M.E., Aresu L., Comazzi S.: Flow-cytometric detection of phenotypic aberrancies in canine small clear cell lymphoma. *Vet. Comp. Oncol.* 2013, doi: 10.1111/vco.12043.
- Comazzi S., Guscetti F., Marconato L.: First meeting of the European canine lymphoma group. Workshop: state of the art and comparative aspects in canine lymphoma. CH-Lugano, 22 June 2013. *Hematol. Oncol.* 2014, **32**, 68–71.
- Uherova P., Ross C.W., Finn W.G., Singleton T.P., Kansal R., Schnitzer B.: Peripheral T-cell lymphoma mimicking marginal zone B-cell lymphoma. *Mod. Pathol.* 2002, **15**, 420–425.
- Fournel-Fleury C., Ponce F., Felman P., Blavier A., Bonnefont C., Chabanne L., Marchal T., Cadore J.L., Goy-Thollet 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.
- Greenlee P.G., Filippa D.A., Quimby F.W., Patnaik A.K., Calvano S.E., Matus R.E., Kimmel M., Hurvitz A.I., Lieberman P.H.: Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Canc.* 1990, **66**, 480–490.
- Valli V.E., San Myint M., Barthel A., Bienzle D., Caswell J., Colbatzky F., Durham A., Ehrhart E.J., Johnson Y., Jones C., Kiupel M., Labelle P., Lester S., Miller M., Moore P., Moroff S., Roccabianca P., Ramos-Vara J., Ross A., Scase T., Tvedten H., Vernau W.: Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet. Pathol.* 2011, **48**, 198–211.