

Cytomorphometry in poorly differentiated oral cavity neoplasms in dogs

Przeździecki R., Sapieryński R. Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The aim of the present study was to estimate the application of cytomorphometry in pre-operative diagnosis of poorly differentiated oral cavity tumors in dogs. Samples for cytological examination were collected by fine-needle biopsy. Cytochemistry was performed on smears stained with Giemsa solution. Analysis was made using Olympus BX41 microscope coupled to a computer equipped with Cella[®] analysis system. Images were captured and formatted as TIFF files, then displayed on the computer monitor. Mean nuclear perimeter (MNP; μm), mean nuclear area (MNA; μm^2), mean nuclear diameter (MND; μm), and mean nuclear roundness (MNR) were determined. Similarly, mean cellular perimeter (MCP; μm), mean cellular area (MCA; μm^2), mean cellular diameter (MCD; μm), and mean cellular roundness (MCR) were determined in each smear. Moreover, nuclear to cytoplasmic ratio (N/C) was calculated. During the study period 19 cases were examined, including 12 oral, amelanotic melanomas and 7 oral, poorly differentiated sarcomas. In every case the cytological diagnosis was supported by histopathology and immunohistochemistry. Cytochemical analysis did not reveal statistically significant differences in examined parameters between cells collected from oral amelanotic melanomas and oral poorly differentiated sarcomas. Additionally, considerable result overlapping between specimens collected from animals with other diseases limits cytochemistry applicability to clinical purposes.

Keywords: cytology, cytomorphometry, oral cavity, amelanotic melanomas, sarcomas, undifferentiated tumors, dogs.

Ocena cytomorfometryczna nisko zróżnicowanych nowotworów jamy ustnej u psów

Rafał Przeździecki, Rafał Sapieryński

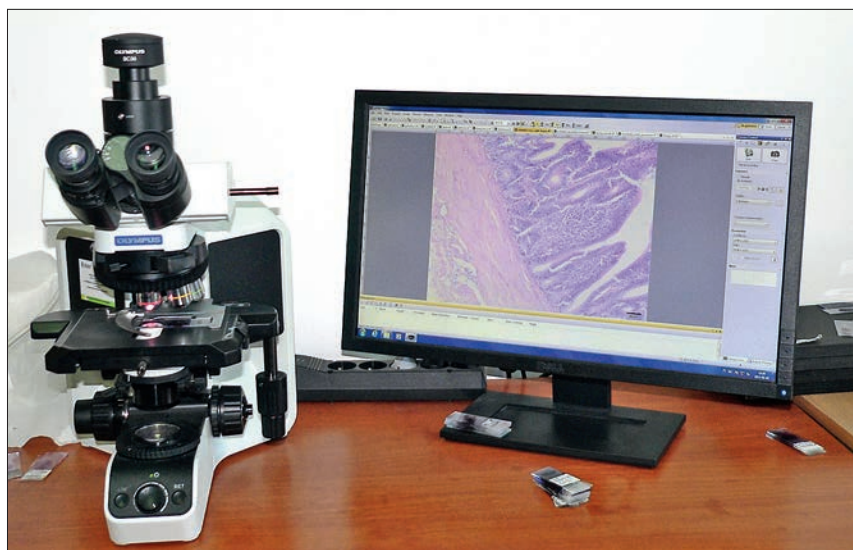
z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

Patolodzy medycy i weterynaryjni stale poszukują metod zwiększających obiektywizm badania histopatologicznego i cytopatologicznego. Pojawia się coraz więcej prac na temat zastosowania morfometrii i cytomorfometrii wspomaganie komputerowo w diagnostyce guzów nowotworowych. Morfometria obrazowa jest metodą badawczą, której istotą jest obiektywna ocena kształtu, wielkości oraz liczby i rozmieszczenia poszczególnych struktur w preparatach mikroskopowych. Analizie takiej podlegają poszczególne narządy, elementy struktury tkanek, pojedyncze komórki, organelle i struktury subkomórkowe, a także struktury patologiczne (w tym patogeny) obecne w cytoplazmie komórek oraz leżące pozakomórkowo (1, 2, 3, 4). Cytochemia wykorzystuje do badania mikroskopy sprzężone z urządzeniami do rejestracji obrazu mikroskopowego oraz z komputerami/aplikacjami komputerowymi umożliwiającymi obiektywne pomiary wybranych parametrów (ryc. 1).

Badania wielkości i kształtu poszczególnych komórek i jąder komórkowych w preparatach cytologicznych nazywa się badaniem cytomorfometrycznym. Analiza jakościowa pozwala na obiektywną ocenę charakterystyki morfologicznej badanych

struktur (średnica, obwód, kształt), z kolei analiza ilościowa danych liczbowych umożliwia określenie ilościowych cech badanych struktur (liczba komórek w danej tkance, średnia liczba jąder czy ziarnistości cytoplazmatycznych). Jak pokazały badania przeprowadzone na guzach z komórek tucznych u psów oraz na mięsakach tkanek miękkich u psów, analiza cytomorfometryczna charakteryzuje się wysoką, prawie doskonałą powtarzalnością w analizie przeprowadzonej przez różnych cytologów (interobserver reproducibility), jak i tego samego cytologa wykonującego badania w odstępie czasu (intrabserver reproducibility; 5, 6). Większość badań poświęconych morfometrii w onkologii weterynaryjnej skupia się na ocenie takich parametrów morfometrycznych, jak: średnia powierzchnia jąder (mean nuclear area – MNA), średni obwód jąder (mean nuclear perimeter – MNP), średnia średnica jąder (mean nuclear diameter – MND) i kulistość jąder (nuclear roundness – NR). Parametry te mogą być zastosowane jako obiektywne kryteria diagnostyczne w różnicowaniu pomiędzy guzami łagodnymi i złośliwymi, dodatkowo, na podstawie zebranych wyników i obserwacji pacjentów stawiane są próby określenia ryzyka powstania przerzutów, pojawienia się wznowy operacyjnej, czy czasu przeżycia pacjenta.

W ostatnich latach rozwój komputerowej ilościowej i jakościowej analizy obrazu w onkologii weterynaryjnej dowiódł użyteczności oceny morfometrycznej jąder komórkowych w diagnostyce: raków płaskonabłonkowych u psów (7), guzów gruczołu sutkowego u psów i kotów (8, 9, 10, 11), guzów gruczołów apokrynowych u psów (12), guzów gruczołów okolicy odbytu u psów (13, 14), guzów podstawnokomórkowych u psów (15), guzów gruczołów włoskowinowych u psów (16), guzów z komórek tucznych u psów (17, 18, 19) oraz chłoniaków o wysokiej złośliwości u psów (20, 21). Analizę cytomorfometryczną stosowano też z powodzeniem do różnicowania pomiędzy mięsakami tkanek miękkich i nienowotworowymi, odczynowymi wzrostami tkanki łącznej u psów (5, 22). Dostępne są wyniki badań autorów krajowych dotyczące analizy cytomorfometrycznej



Ryc. 1. Zestaw do analizy cytomorfometrycznej składa się z mikroskopu z kamerą i zestawu komputerowego ze specjalną aplikacją lub programem do analizy obrazu

zmian rozrostowych i naciekowych przebiegających z udziałem aktywowanych makrofagów i odczynowych komórek Langerhansa (23). Porównanie parametrów opisujących jądra komórkowe oraz cytoplazmę analizowanych komórek wskazało na możliwość różnicowania pomiędzy aktywowanymi makrofagami a komórkami miększu histiocytozy (ogniskowy rozrost aktywowanych komórek Langerhansa), ponadto umożliwiło wykazanie zmian morfologicznych, jakie zachodzą w komórkach histiocytozy podczas regresji rozrostu (23).

Nowotwory jamy ustnej stanowią ok. 6% wszystkich nowotworów rozpoznawanych u psów, według publikowanych danych najczęściej diagnozowanymi nowotworami złośliwymi w tej lokalizacji są czerniaki, raki płaskonabłonkowe i włóknakiomięsaki (24, 25, 26, 27). Wśród wszystkich czerniaków jamy ustnej u psów istotną grupę (około 1/3 przypadków) stanowią czerniaki amelanotyczne (pozbawione melaniny), a wśród innych rozrostów nisko zróżnicowane mięsaki i rzadziej raki (26, 28). Badania własne wykazały, że bardzo często nowotwory jamy ustnej charakteryzują się niskim zróżnicowaniem, co oznacza, że komórki rozrostów nie wykazują cech pozwalających na precyzyjne określenie ich pochodzenia (26). W związku z tym, nowotwory te mogą sprawiać poważne problemy w diagnostyce przedoperacyjnej. Dzieje się tak z powodu braku zróżnicowania histologicznego (np. brak ziaren pigmentu, brak cech różnicowania nabłonkowego) i anaplastycznego, a przez to wysoce niespecyficznego wyglądu komórek (28, 29, 30). Dodatkowo czerniaki, niezależnie od zawartości pigmentu często należą do tzw. zmian dwufazowych, co oznacza że komórki mogą przybierać wygląd zarówno komórek mezenchymalnych, jak i nabłonkowych, dlatego w diagnostyce różnicowej tych rozrostów należy uwzględnić nisko zróżnicowane mięsaki i raki. Problemem diagnostycznym mogą też być guzy barwnikowe rozpoznawane w nietypowej lokalizacji lub wykrywanie przerzutów czerniaka do regionalnych węzłów chłonnych (30, 31). O trudnościach, jakie napotyka cytolog oceniający materiał pobrany z nisko zróżnicowanych mięsaków, raków lub czerniaków amelanotycznych, świadczą badania, które opublikowali Regan i wsp. (32). Z badań tych wynika, że w części przypadków różnicowanie pomiędzy powyższymi typami nowotworów może być niemożliwe bez dodatkowych barwień immunocytochemicznych z użyciem swoistych przeciwciał.

W związku z tym istnieje potrzeba wprowadzenia do rutynowego warsztatu diagnostycznego metod, które by pozwalały na bardziej precyzyjną i obiektywną ocenę nowotworów rozpoznanych

w obrębie jamy ustnej u psów, przy jednoczesnym zachowaniu niskich kosztów oraz nieinwazyjnych metod pobierania materiału do takich testów. Celem prezentowanej pracy była ocena możliwości zastosowania analizy cytomorfometrycznej w przedoperacyjnej diagnostyce cytologicznej nisko zróżnicowanych nowotworów jamy ustnej u psów.

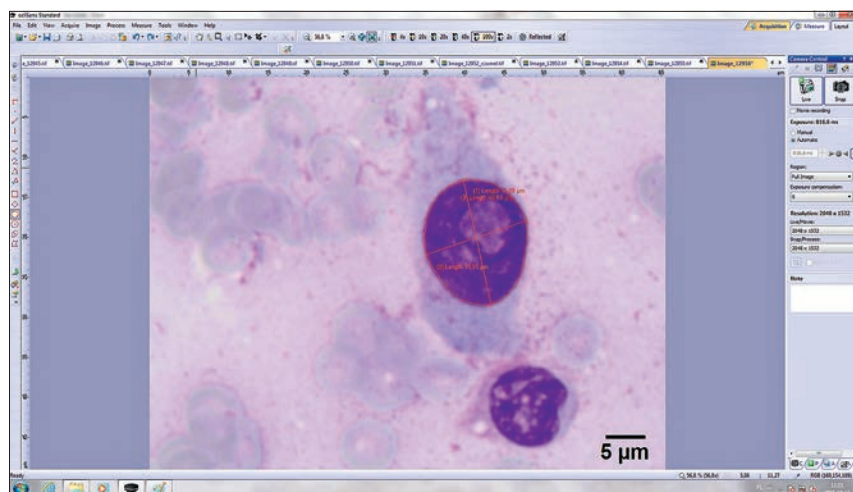
Materiał i metody

Badanie przeprowadzono na materiale cytologicznym pobranym w trakcie rutynowego postępowania diagnostycznego od psów z rozpoznaniem nisko zróżnicowanym złośliwym nowotworem jamy ustnej. Badanie przeprowadzono w Zakładzie Patomorfologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie, a materiał do badań zbierano w latach 2009–2013. Analizę cytomorfometryczną wykonano, poddając ocenie dobrej jakości rozmazy cytologiczne barwione odczynnikami Giemsy, w których charakter rozrostu był potwierdzony badaniem histopatologicznym i immunohistochemicznym. Obserwację mikroskopową prowadzono za pomocą mikroskopu Olympus BX41 sprzężonego z kamerą cyfrową Olympus ColorView IIIv oraz programu do analizy obrazu mikroskopowego Cella[®] (ryc. 1). Analizy dokonywano przy powiększeniu 1000× (powiększenie immersyjne), wybierając losowo obszary preparatu bogate w komórki. Analizie poddano jedynie komórki uznane za komórki nowotworowe. Do analizy wybierano 100 nieuszkodzonych komórek, o wyraźnych granicach cytoplazmy i jąder komórkowych, które nie tworzyły skupisk i nie nakładały się na siebie. Obrazy utrwalano za pomocą kamery cyfrowej i zapisywano w formacie TIFF. Za pomocą kursora określano

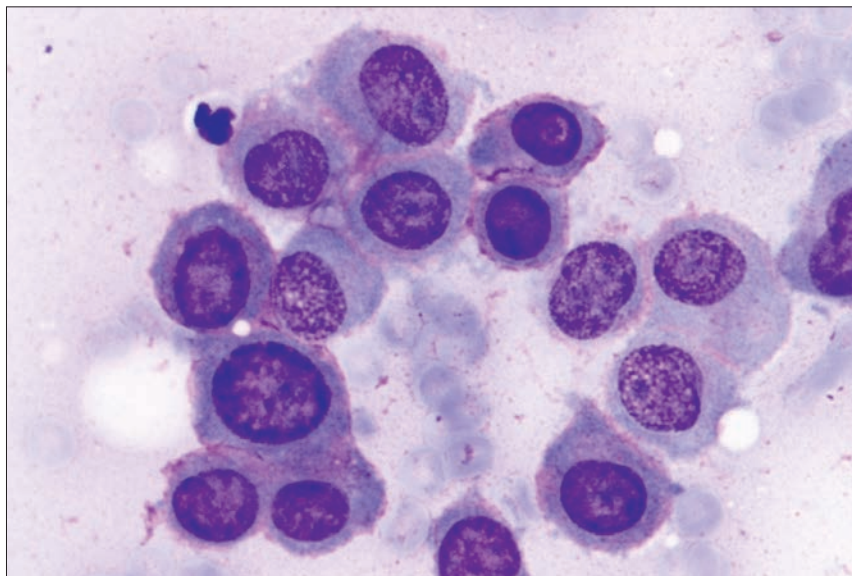
największą i najmniejszą „średnicę” komórki i jądra komórkowego (określone jako długość i szerokość), następnie obrysowywano zarysy cytoplazmy komórek, zarysy jądra komórkowego i w ten sposób automatycznie program komputerowy dokonywał pomiarów obwodu i pola powierzchni każdej komórki i każdego jądra komórkowego (ryc. 2). Badane parametry obejmowały:

- długość komórki – wartości podawano w μm ,
- szerokość komórki – wartości podawano w μm ,
- obwód komórki i pole powierzchni komórki – wartości podawano odpowiednio w μm i μm^2 ,
- krągłość komórki (stosunek długości komórki do szerokości komórki, wartość uznawano za okrągłą, jeżeli wartość tego stosunku wynosiła 1),
- długość jądra komórkowego – wartości podawano w μm ,
- szerokość jądra komórkowego – wartości podawano w μm ,
- obwód i pole powierzchni jądra komórkowego – wartości podawano odpowiednio w μm i μm^2 ,
- krągłość jądra komórkowego (stosunek długości jądra komórkowego do szerokości jądra komórkowego, jądro uznawano za okrągłe, jeżeli wartość tego stosunku wynosiła 1),
- stosunek powierzchni zajmowanej przez jądro komórkowe do powierzchni komórki (indeks jądro-cytoplazmatyczny N/C) – określono za pomocą iloczynu pola powierzchni jądra komórkowego do pola powierzchni komórki) – wartości podawano jako ułamek dziesiętny.

Możliwość zastosowania analizy cytomorfometrycznej jako metody diagnostycznej dokonano poprzez porównanie



Ryc. 2. Zapisany w formacie TIFF obraz mikroskopowy komórki czerniaka amelanotycznego (powiększenie 1000×, barwienie barwnikiem Giemsy), otwarty w programie komputerowym do komputerowej analizy obrazu mikroskopowego. Wybierając z odpowiedniej zakładki narzędzie, dokonuje się pomiaru długości, obwodu komórki lub jej jądra, dodatkowo program obliczy takie parametry, jak pole powierzchni obrysowanej struktury



Ryc. 3. Obraz cytologiczny komórek nisko zróżnicowanego nowotworu jamy ustnej u psa – brak wyraźnych cech morfologicznych, które umożliwiłyby określenie pochodzenia komórek nowotworowych, a tym samym typ histologiczny rozpoznanego nowotworu. Materiał pobrano drogą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej z guza dziąsła, barwienie barwnikiem Giemsy, powiększenie 400×

wartości powyższych parametrów pomiędzy nisko zróżnicowanymi nowotworami należącymi do różnych typów histologicznych. Analizowane parametry opisano za pomocą średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego oraz zakresu. Normalność rozkładu zmiennych oceniono testem Shapiro-Wilk. Wymiary komórkowe i jądrowe porównano z wykorzystaniem hierarchicznej analizy wariancji, w której czynnikiem stałym było rozpoznanie, a zmiennym osobnik, od którego pobrano materiał do badania. Przyjęto poziom istotności równy 0,05. Gdy wynik analizy wariancji był istotny statystycznie, przeprowadzono porównania wielokrotne między grupami, a wynik analizy statystycznej interpretowano z zastosowaniem poprawki Bonferroni. Analizę

statystyczną wykonano w programie IBM SPSS Statistics 21, a wykresy w programie Statistica 10 (StatSoft Inc.).

Wyniki

W analizowanym okresie do badania zakwalifikowano 19 przypadków nisko zróżnicowanych złośliwych nowotworów jamy ustnej u psów (ryc. 3), spośród których badaniem histopatologicznym uzupełnionym barwieniem immunohistochemicznym rozpoznano 12 czerniaków amelanotycznych oraz 7 nisko zróżnicowanych mięsaków. Wyniki pomiarów cytomorfometrycznych poszczególnych parametrów dla czerniaków amelanotycznych i nisko zróżnicowanych mięsaków jamy ustnej u psów przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Stwierdzono brak statystycznie istotnych różnic między analizowanymi parametrami cytomorfometrycznymi komórek obu typów nisko zróżnicowanych nowotworów jamy ustnej u psów. Brak statystycznie istotnych różnic był wynikiem dużych odchyłeń standardowych w wynikach pomiarów jąder i komórek pomiędzy poszczególnymi przypadkami (pacjentami). Ponadto stwierdzono istotne różnice pomiędzy przypadkami (pacjentami) w każdej z grup rozpoznania w zakresie wszystkich ocenianych parametrów – tzn. wyniki pomiarów komórek takich samych typów nowotworów różniły się od siebie bardzo znacznie (przykładowe wykresy prezentują ryc. 4 i 5). Wskazuje to, że oceniane parametry nie są cechami stałymi dla komórek badanych typów histologicznych nowotworów i mogą się znacząco różnić między pacjentami z takim samym rozpoznaniem. Ponadto analiza cytomorfometryczna nie może być zastosowana do odróżniania nisko zróżnicowanych mięsaków od czerniaków amelanotycznych, bowiem komórki tych dwóch typów rozrostów wykazują takie same parametry cytomorfometryczne.

Omówienie wyników

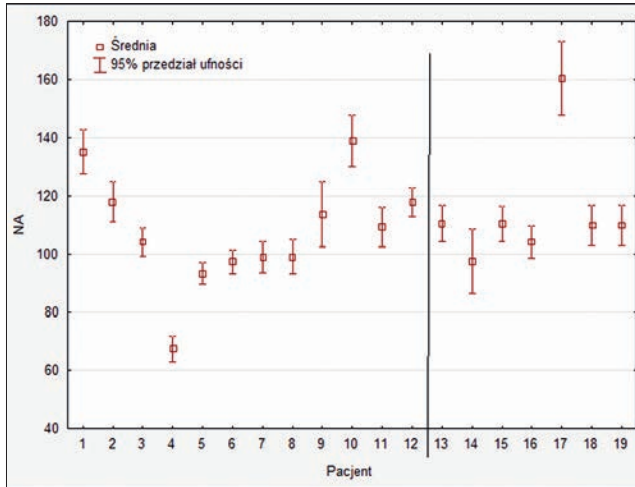
Wydaje się oczywiste, że zaakceptowanie przez właściciela psa bardzo radykalnych technik chirurgicznych, wymaganych często przy leczeniu nowotworów jamy ustnej, będzie zależne od spodziewanych wyników leczenia i korzystnego długookresowego rokowania. W przeciwieństwie do mięsaków jamy ustnej (nawet tych nisko zróżnicowanych) oraz raków dziąsła, które są nowotworami o agresywności raczej miejscowej (przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych i miejsc odległych stwierdza się w 3–36% tych nowotworów), czerniaki jamy ustnej u psów charakteryzują się

Tabela 1. Wyniki pomiarów cytomorfometrycznych poszczególnych parametrów komórkowych w przypadku czerniaków amelanotycznych i nisko zróżnicowanych mięsaków jamy ustnej u psów; wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD (zakres)

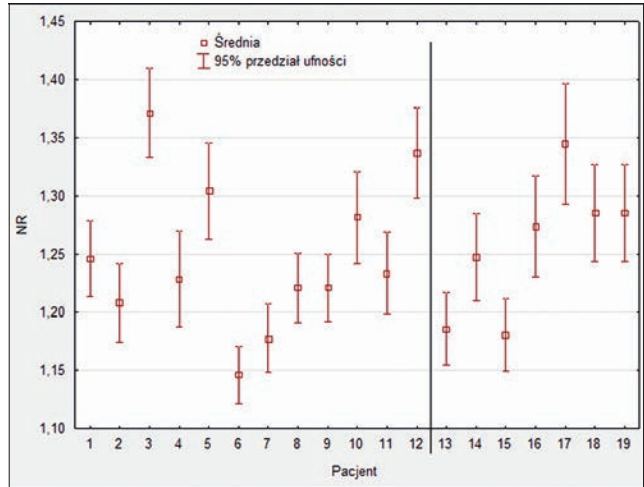
| Grupa | Długość (μ m) | Szerokość (μ m) | Obwód (μ m) | Powierzchnia (μ m ²) | Krągłość |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| Czerniaki amelanotyczne (n=12) | 19,65 \pm 3,54 (10,67–46,70) | 15,36 \pm 2,75 (8,45–29,79) | 59,84 \pm 9,81 (34,95–27,75) | 234,25 \pm 83,25 (72,01–1017,36) | 1,29 \pm 0,9 (1,0–2,27) |
| Nisko zróżnicowane mięsaki (n=7) | 21,91 \pm 5,10 (13,51–48,39) | 15,87 \pm 2,76 (9,26–28,69) | 64,80 \pm 12,35 (43,73–125,38) | 269,05 \pm 99,93 (119,64–737,22) | 1,40 \pm 0,32 (1,00–3,32) |
| p (Nested ANOVA) | 0,077 | 0,418 | 0,119 | 0,145 | 0,060 |

Tabela 2. Wyniki pomiarów cytomorfometrycznych poszczególnych parametrów jądrowych w przypadku czerniaków amelanotycznych i nisko zróżnicowanych mięsaków jamy ustnej u psów; wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD (zakres)

| Grupa | Długość (μ m) | Szerokość (μ m) | Obwód (μ m) | Powierzchnia (μ m ²) | Krągłość | N/C |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Czerniaki amelanotyczne (n=12) | 13,24 \pm 2,06 (7,05–24,26) | 10,66 \pm 1,56 (5,99–16,84) | 41,10 \pm 5,86 (23,65–72,85) | 107,90 \pm 31,29 (33,64–324,71) | 1,25 \pm 0,15 (1,00–1,83) | 0,47 \pm 0,0 (0,4–0,70) |
| Nisko zróżnicowane mięsaki (n=7) | 13,73 \pm 2,31 (8,98–22,49) | 10,99 \pm 1,76 (7,22–18,38) | 42,02 \pm 6,39 (29,24–70,75) | 114,81 \pm 37,33 (54,86–311,91) | 1,26 \pm 0,16 (1,00–1,86) | 0,44 \pm 0,10 (0,18–0,72) |
| p (Nested ANOVA) | 0,450 | 0,447 | 0,607 | 0,473 | 0,754 | 0,233 |



Ryc. 4. Wykres przedstawia wartości średniej powierzchni pola jąder komórkowych (NA; wyrażonej w μm^2) komórek nowotworów jamy ustnej dla poszczególnych przypadków (u pacjentów oznaczonych 1-12 rozpoznano czerniaka amelanotycznego, u pacjentów 13-19 rozpoznano nisko zróżnicowanego mięsaka). Wartości przedstawiono jako średnią wraz z przedziałem ufności



Ryc. 5. Wykres przedstawia wartości średniej krągłości jąder komórkowych (NR) komórek nowotworów jamy ustnej dla poszczególnych przypadków (u pacjentów oznaczonych 1-12 rozpoznano czerniaka amelanotycznego, u pacjentów 13-19 rozpoznano nisko zróżnicowanego mięsaka). Wartości przedstawiono jako średnią wraz z przedziałem ufności

dużą skłonnością do rozsiewu i zazwyczaj źle rokują (25, 33, 34, 35, 36). U zdecydowanej większości psów z czerniakiem (ponad 80% przypadków) już na wczesnym etapie choroby dochodzi do powstania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych i miejsc odległych, co skutkuje śmiercią zwierzęcia lub decyzją o jego eutanazji. Badanie cytologiczne może umożliwić oszacowanie zachowania biologicznego wykrytego nowotworu, a tym samym precyzyjne określenie rokowania pod warunkiem ustalenia jednoznacznego rozpoznania jeszcze przed planowanym zabiegiem chirurgicznym. W prezentowanej pracy podjęto próbę określenia, czy obiektywizacja mikroskopowej oceny komórek poprzez zastosowanie analizy cytomorfometrycznej może ułatwić przedoperacyjną diagnostykę cytologiczną nisko zróżnicowanych złośliwych nowotworów jamy ustnej u psów.

Może się wydawać zaskakujące, że w badaniach własnych nie stwierdzono różnic w wynikach obiektywnej oceny cytomorfometrycznej komórek czerniaków amelanotycznych i nisko zróżnicowanych mięsaków. Żaden z badanych parametrów opisujących kształt i wielkość zarówno komórek, jak i jąder komórkowych nie różnił się pomiędzy obiema grupami badanych zmian nowotworowych. Wskazuje to na fakt dużego podobieństwa w wyglądzie komórek tych dwóch typów rozrostów złośliwych. Powyższe wyniki pozostają w zgodności z tymi, które uzyskali Simeonov i wsp. (22), badając morfologię mięsaków tkanek miękkich u psów. Badacze ci wykazali, że istnieją różnice dotyczące wielu parametrów jądrowych (pole powierzchni jądra, średnica jądra i obwód jądra) pomiędzy komórkami nienowotworowych rozrostów tkanki łącznej a komórkami mięsaków tkanek miękkich. Z drugiej

strony wykazali, że jądra komórkowe poszczególnych podtypów mięsaków (analizie poddano komórki włóknakomięsaków, tłuszczakomięsaków i obłoniaków) nie różniły się od siebie nawzajem (22). Zbliżone wnioski płyną z pracy opublikowanej przez Meachem i wsp. (5), w której wykazano różnice dotyczące jądrowych parametrów cytomorfometrycznych pomiędzy komórkami odczynowej tkanki mezenchymalnej a komórkami mięsaków tkanek miękkich, jednakże nie obserwowano różnic w morfologii jąder komórkowych pomiędzy komórkami mięsaków tkanek miękkich o różnym stopniu złośliwości histologicznej czy o różnym nasileniu proliferacji komórek rozrostu. W badaniach własnych porównywano morfologię komórek nisko zróżnicowanych mięsaków i czerniaków amelanotycznych, czyli guzów o odmiennym pochodzeniu histogenetycznym, cechujących się różnym stopniem histologicznej złośliwości czy aktywnością mitotyczną komórek mięszu guza.

Niestety, ze względu na małą liczbę zebranych przypadków nie udało się w badaniach własnych przeprowadzić analizy cytomorfometrycznej komórek nisko zróżnicowanych raków jamy ustnej. Chociaż rozrosty tego typu stanowią istotną grupę złośliwych nowotworów w jamie ustnej u psów, to w większości przypadków są zmianami dobrze zróżnicowanymi, które nie przysparzają trudności diagnostycznych. Jednak w części przypadków, w których komórki raka nie wykazują różnicowania płaskonabłonkowego, mogą być one nie do odróżnienia od czerniaków amelanotycznych, szczególnie tych określanych mianem epiteloidalnych.

Z przedstawionych wyników jawi się jeszcze inna istotna kwestia. Mianowicie,

jeżeli obiektywna ocena morfologii komórek oraz ich jąder komórkowych nie wykazuje istotnych statystycznie różnic pomiędzy, przykładowo, polem powierzchni jąder komórkowych, wymiarami komórek, obwodu cytoplazmy czy wartości N/C, to świadczy to o tym, że komórki różnych nowotworów, które różnią się od siebie pod względem zachowania biologicznego, mogą być nie do odróżnienia jedynie na podstawie rutynowego badania cytologicznego. Z tego z kolei wynikają dwa wnioski, po pierwsze, że wykazana w poprzednich badaniach własnych umiarkowana czułość (szacowana na 55,6–66,7%) rutynowej cytologii w rozpoznawaniu złośliwych nowotworów jamy ustnej u psów nie powinna dziwić, a po drugie, że w takich przypadkach najprostsze testy diagnostyczne mogą nie być wystarczające (37). Dlatego też wskazane jest poszukiwanie innych metod przedoperacyjnej diagnostyki omawianych nowotworów w oparciu o analizę materiału pobranego w toku szeroko dostępnych, małoinwazyjnych procedur biopsyjnych, takich jak biopsja aspiracyjna cienkoigłowa. Podsumowując wyniki prezentowanych badań, można stwierdzić, że analiza cytomorfometryczna nisko zróżnicowanych nowotworów złośliwych jamy ustnej u psów nie ma przydatności diagnostycznej.

Piśmiennictwo

- De Vico G., Sfacteria A., Maiolino P., Mazzullo G.: Comparison of nuclear morphometric parameters on cytologic smears and histologic sections of spontaneous canine tumors. *Vet. Clin. Pathol.* 2002, **1**, 16–18.
- Sarria R., Latorre R., Henroteaux M., Henroteaux N., Soria F., Perez-Cuadrado E., Lopez Albro O.: Morphometric study of the layers of the canine small intestine at five sampling sites. *Vet. J.* 2012, **192**, 498–502.
- Eljadar M.S., Singla L.D., Mustafa R.A., Uppal S.K.: Morphometric variations in gametocytes of *Hepatozoon canis* from naturally infected dogs. *J. Parasitol. Dis.* 2013, **37**, 143–147.

4. Liotta J.L., Sandhu G.K., Rishniw M., Bowman D.D.: Differentiation of the microfilariae of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in stained blood films. *J. Parasitol.* 2013, **99**, 421–425.
5. Meachem M.D., Burgess H.J., Davies J.L., Kidney B.A.: Utility of nuclear morphometry in the cytologic evaluation of canine cutaneous soft tissue sarcomas. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2012, **24**, 525–530. doi: 10.1177/1040638712440988.
6. Barbosa D.E.L., Paraventi M.D., Strefezzi F.: Reproducibility of nuclear morphometry parameters from cytologic smears of canine cutaneous mast cell tumors – intra- and interobserver variability. *Vet. Clin. Pathol.* 2014, **43**, 469–472.
7. Maiolino P., Restucci B., Papparella S., De Vico G.: Nuclear morphometry in squamous cell carcinomas of canine skin. *J. Comp. Path.* 2002, **127**, 114–117.
8. Simeonov R., Simeonova G.: Computerized morphometry of mean nuclear diameter and nuclear roundness in canine mammary gland tumors on cytologic smears. *Vet. Clin. Pathol.* 2006, **35**, 88–90.
9. Simeonov R., Simeonova G.: Computerized cytomorphometric analysis of nuclear area, nuclear perimeter and mean nuclear diameter in spontaneous canine mammary gland tumours. *Vet. Res. Comm.* 2007, **31**, 553–558.
10. De Vico G., Maiolino P., Cataldi M., Mazzullo G., Restucci B.: Nuclear morphometry in relation to lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet. Res. Commun.* 2007, **31**, 1005–1011.
11. Simeonov R., Simeonova G.: Nuclear cytomorphometry in feline mammary gland epithelial tumours. *Vet. J.* 2009, **179**, 296–300.
12. Simeonov R., Simeonova G.: Use of quantitative analysis as a method for differentiation between canine cutaneous apocrine adenomas and apocrine carcinomas on cytological smears. *J. Vet. Med. A* 2007, **54**, 542–544.
13. Simeonov R., Simeonova G.: Quantitative analysis in spontaneous canine anal sac gland adenomas and carcinomas. *Res. Vet. Sci.* 2008, **85**, 559–562.
14. Simeonov R., Simeonova G.: Computer-assisted nuclear morphometry in the cytological evaluation of canine perianal adenocarcinomas. *J. Comp. Path.* 2008, **139**, 226–230.
15. Simeonov R., Simeonova G.: Comparative morphometric analysis of recurrent and nonrecurrent canine basal cell carcinoma: a preliminary report. *Vet. Clin. Pathol.* 2010, **39**, 96–98.
16. Simeonov R.: Nuclear morphometry in cytological specimens of canine ceruminous adenomas and carcinomas. *Vet. Comp. Oncol.* 2012, **10**, 246–251.
17. Strefezzi R.F., Xavier J.G., Catao-Dias J.L.: Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 2003, **40**, 268–275.
18. Marconato L., Marchetti V., Francione D., Masserdotti C., Gregori M., Leotta R., Abramo E.: Morphometrical approach for predicting regional lymph node micrometastatic load in canine mast cell tumours: preliminary results. *Vet. Comp. Oncol.* 2008, **6**, 162–170.
19. Strefezzi R.F., Xavier J., Kleeb S., Catao-Dias L.: Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2009, **21**, 821–825.
20. Papakonstantinou S., O'Brien P.J.: High content imaging for the morphometric diagnosis and immunophenotyping prognosis of canine lymphomas. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2014, **86**, 373–382.
21. Munasinghe L.I., Kidney B.A., MacDonald-Dickinson V., Larson V.L., Jackson M.L., Fernandez N.J.: Evaluation of lymph node aspirates at diagnosis and relapse in dogs with high-grade multicentric lymphoma and comparison with survival time. *Vet. Clin. Pathol.* 2015. doi: 10.1111/vcp.12243.
22. Simeonov R., Ananiev J., Gulubova M.: Quantitative morphology in canine cutaneous soft tissue sarcomas. *Vet. Comp. Oncol.* 2014. doi: 10.1111/vco.12099.
23. Paździor-Czapula K., Otrocka-Domagala L., Rotkiewicz T., Gęsek M.: Cytomorphometry of canine cutaneous histiocytoma. *Pol. J. Vet. Sci.* 2014, **17**, 413–420.
24. Ramos-Vara J.A., Beissenherz M.E., Miller M.A.: Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet. Pathol.* 2000, **37**, 597–608.
25. Liptak J.M., Withrow S.J.: Oral Tumors. W: Withrow SJ, Vail DM.: *Withrow&MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4th ed., St. Louis, Saunders Elsevier; 2007, 455–475.
26. Sapieryński R., Malicka E., Bielecki W., Sendecka H., Krawiec M.: Nowotwory jamy ustnej u psów i kotów. Przegląd 143 przypadków. *Med. Weter.* 2007, **63**, 1196–1199.
27. Bonfanti U., Bertazzolo W., Gracis M., Roccabianca P., Romanelli G., Palermo G., Zini E.: Diagnostic value of cytological analysis of tumors and tumour-like lesions of oral cavity in dogs and cats: A retrospective study on 114 cases. *Vet. J.* 2014. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.10.022.
28. Smedley R.C., Lamoureaux J., Sledge D.G., Kiupel M.: Immunohistochemical diagnosis of canine oral amelanotic melanocytic neoplasms. *Vet. Pathol.* 2011, **48**, 32–40.
29. Banerjee S.S., Harris M.: Morphological and immunophenotyping variations in malignant melanomas. *Histopathology*. 2000, **36**, 387–402.
30. Höinghaus R., Mischke R., Hewicker-Trautwein M.: Use of immunocytochemical techniques in canine melanoma. *J. Vet. Med. A*. 2002, **49**, 198–202.
31. Sathiyamoorthy S., Ali S.Z.: Malignant melanoma in neobladder urinary cytology: A brief report. *Diagn. Cytopathol.* 2012. doi: 10.1002/dc.22878.
32. Regan R.S., Rassnick K.M., Malone K.M., McDonough S.P.: A retrospective evaluation of the impact of second-opinion histopathology on diagnostic testing, cost and treatment in dogs and cats with cancer. *Vet. Comp. Oncol.* 2013, **13**, 106–116.
33. Blackwood L., Dobson J.M.: Radiotherapy of oral malignant melanomas in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1996, **209**, 98–102.
34. Theon A.P., Rodriguez C., Madewell B.R.: Analysis of prognostic factors and patterns of failure in dogs with malignant oral tumors treated with megavoltage irradiation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1997, **210**, 778–784.
35. Frazier S.A., Johns S.M., Ortega J.: Outcome in dogs with surgically resected oral fibrosarcoma (1997–2008). *Vet. Comp. Oncol.* 2012, **10**, 33–43.
36. Dank G., Rassnick K.M., Sokolovsky Y.: Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. *Vet. Comp. Oncol.* 2012. doi: 10.1111/j.1476–5829.2012.00338.x.
37. Przędziecki R., Czopowicz M., Sapieryński R.: Accuracy of routine cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of oral amelanotic melanomas in dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 2015. doi:10.1111/vcp.12292.