

# Jak poprawić skuteczność badania cytologicznego w onkologii weterynaryjnej

**Rafał Sapierzyński**

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Onkologia weterynaryjna jest dziedziną nauk medycznych, w której precyzyjne rozpoznanie badanej zmiany jeszcze przed wprowadzeniem leczenia ma kluczowe znaczenie dla jego efektów oraz pozwala podjąć rozsądną decyzję odnośnie do postępowania z pacjentem onkologicznym. Dawno odeszły w zapomnienie (tak przynajmniej powinno być) czasy, kiedy to na pytanie właściciela, który przyprowadził zwierzę do lecznicy ze stwierdzoną zmianą guzową: „co należy z tym zrobić?” lekarz weterynarii odpowiadał „wyciąć i będzie po kłopotie”, a sam guz trafiał do kosza z odpadami. Oczywiście z różnych przyczyn takie sytuacje zdarzają się i będą się zdarzać i zapewne w części przypadków takie podejście do problemu może być

w pewien sposób uzasadnione (poza faktem wyrzucania guza do kosza bez badania histopatologicznego).

Wiele metod diagnostycznych (włączając w to badanie kliniczne, badania obrazowe, czy badanie endoskopowe) pozwala na doskonałą wizualizację zmian, określenie ich struktury, wielkości, liczby oraz cech złośliwości klinicznej (szybki wzrost, duża objętość zmiany, zwiążanie z tkankami otaczającymi, naciekowy charakter wzrostu, niszczenie struktur sąsiednich, owrzodzenie powierzchni lub obecność ognisk martwicy i wylewów krwi w obrębie zmiany), jednak dopiero badanie mikroskopowe próbek rozrostu pozwala z mniejszym lub większym prawdopodobieństwem (do pewności włącznie) ustalić, czy i z jakim typem

nowotworu mamy do czynienia. Truizmem jest stwierdzenie, że to, czy nowotwór można potencjalnie wyleczyć, jakimi metodami to zrobić lub jakich efektów należy się spodziewać, zależy od wielu czynników, jednak najważniejszym z nich jest typ i podtyp histologiczny nowotworu, stopień jego złośliwości oraz inne cechy mikroskopowe (naciekanie naczyń krwionośnych, obecność obszarów martwicy, wysoka aktywność mitotyczna itd.). Często dzięki badaniu mikroskopowemu właściciel podejmuje decyzję, czy leczenie w ogóle podejmować – np. w przypadku wznowy niskorzóżnicowanego guza z komórek tucznych z przerzutem do regionalnych węzłów chłonnych.

Wieloletnie doświadczenia własne wskazują, że w trakcie procedury pobierania i wysyłania materiału do badań mikroskopowych istnieje wiele punktów krytycznych, których pominięcie lub nieprofesjonalne wykonanie może skutkować poważnymi utrudnieniami, a wręcz uniemożliwia postawienie rozpoznania cytologicznego. Czasami popełnienie nawet drobnego błędu lub pominięcie z pozoru błażej procedury może skutkować brakiem rozpoznania, a co za tym idzie niezadowoleniem właściciela zwierzęcia i niepotrzebnym cierpieniem tego ostatniego.

## Uwagi ogólne

Przy planowaniu badania cytologicznego u pacjenta onkologicznego zakładamy, że rezultatem badania mikroskopowego pobranego materiału komórkowego będzie rozpoznanie cytologiczne, które jednoznacznie wskaże, z jakim typem zmiany nowotworowej mamy do czynienia. Takie podejście jest zdecydowanie słuszne, bowiem w większości przypadków rozpoznanie cytologiczne pokrywa się z rozpoznaniem ostatecznym, jednak taka sytuacja będzie możliwa zazwyczaj, gdy spełnione zostaną liczne wymogi na wszystkich etapach pobrania, przesłania i obróbki materiału w laboratorium. Niektóre działania znacznie zwiększające szanse na uzyskanie wyniku przydatnego klinicznie będą wymagały jedynie pełnego zastosowania się do powszechnie akceptowanych (choć nie zawsze stosowanych) czynności, takich jak szczegółowe wypełnianie skierowania (ryc. 1), poprawne wykonanie rozmazu (ryc. 2), zabezpieczenie go w odpowiedni sposób w trakcie transportu (ryc. 3).

Precyzyjne wypełnienie skierowania (pisma przewodniego) ma kluczowe znaczenie dla zwiększenia przydatności praktycznej uzyskanego wyniku. Ostatnio opublikowane badania własne wykazały, że większa ilość informacji umieszczonych w skierowaniu jest dodatnio skorelowana z przydatnością diagnostyczną wyniku badania cytologicznego (1). Analiza ta objęła wyniki 100 badań cytologicznych przeprowadzonych u psów i kotów, w których materiał komórkowy (pochodzący z różnych zmian) został pobrany różnymi metodami przez lekarzy klinicystów, a następnie przesłany do laboratorium cytologicznego. Uzyskany wynik sklasyfikowano pod względem jego przydatności w procesie diagnostycznym jako nieprzydatny klinicznie (wyniki niediagnostyczne oraz wyniki opisowe, w których udało się zidentyfikować tylko nieliczne komórki, na podstawie których nie można było jednak ustalić rozpoznania) oraz jako wynik przydatny klinicznie (obejmujący zarówno wynik sugerujący rozpoznanie, w którym zawarto sugestię odnośnie do możliwego rozpoznania oraz rozpoznanie cytologiczne, w którym ustalono precyzyjnie, jaki proces patologiczny toczy się w badanej zmianie). Okazało się, że aż w 41% przypadków wynik nie miał wartości diagnostycznej! W pozostałych 59% przypadków można było z wyniku uzyskać informacje przydatne w procesie diagnostycznym, z czego rozpoznanie cytologiczne ustalono w 39% przypadków (1). Analiza statystyczna wyników wykazała, że przydatność diagnostyczna wyniku była dodatnio skorelowana z ilością informacji zawartych w skierowaniu, co w prosty sposób pokazuje, że z pozoru nieistotna,

łatwa w wykonaniu i krótka procedura uzupełnienia formularza skierowania pozwala na zwiększenie przydatności badania cytologicznego u pacjentów onkologicznych. Takie podejście lekarza kierującego sprawą, że osoba oceniająca preparat cytologiczny będzie miała możliwość przeprowadzenia interpretacji uzyskanego obrazu mikroskopowego, a nie tylko określenie składu komórkowego materiału (w wypadku gdy informacjami na temat danego przypadku nie dysponuje). Wydaje się, że w takiej sytuacji nic prostszego, jak wykreślić numer podany na pieczęcie w skierowaniu (o ile takowy jest podany) i uzyskać potrzebne informacje w czasie rozmowy telefonicznej z lekarzem kierującym, jednak sprawa jest prosta przy założeniu, że cytolog nudzi się w pracy, a skontaktowanie się z lekarzem, który przesyłał materiał do badania, to nic trudnego. Z doświadczenia autora wynika, że pracy jest mnóstwo, a skontaktowanie się z lekarzem kierującym wcale nie jest proste (brak odpowiedzi na maile lub nieoddzwanianie to przypadki wcale nie rzadkie!) – jakże proste jest poświęcenie 5 minut na w miarę precyzyjne wypełnienie skierowania, a czasem wypełnienie kilku rubryk w gotowym formularzu. Niestety, odpowiedzi typu: „po co to komu?” lub „a kto ma na to czas?” wcale nie należą do rzadkości.

W przypadku gdy materiał do badań pobiera się ze zmian chrzęstno-kostnych, bardzo pomocne w określeniu rozpoznania albo przynajmniej uzupełnieniu wyniku stosownym komentarzem jest przesłanie zdjęcia rentgenowskiego badanej zmiany (w dobie powszechnej cyfryzacji i dostępu do internetu przesłanie takich zdjęć nie stanowi problemu).



**Ryc. 1.** Rycina prezentuje wybitnie nonszalanckie podejście do kwestii skierowania – materiał, który stanowiły dwa niepodpisane rozmazy, dostarczone w pudełku, z datą i nieczytelnym nazwiskiem właściciela, brak podstawowych informacji odnośnie do przedmiotu badania, opisu pacjenta uniemożliwia interpretację obrazu cytologicznego

## How to improve the efficacy of cytological examination in veterinary oncology

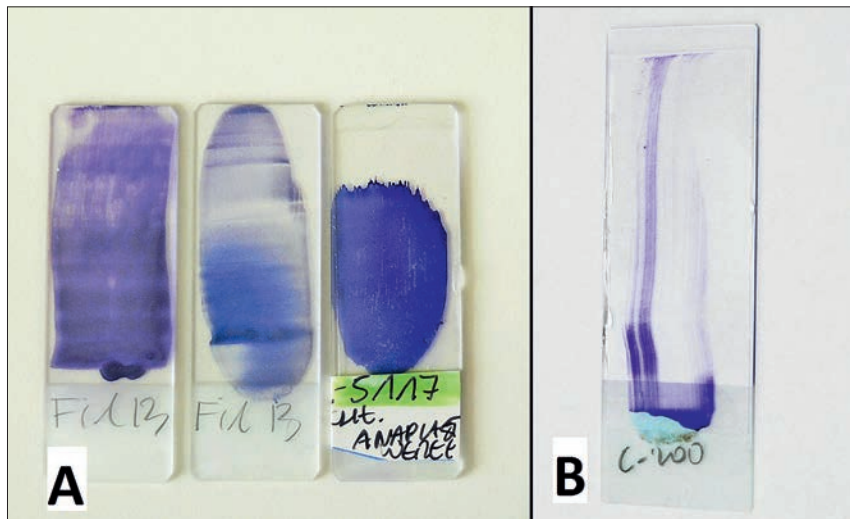
**Sapierzyński R.**, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The aim of this article was to present the benefits of cytological examination in veterinary oncology. Cytopathology or clinical cytology is widely accepted, available, cheap, minimally invasive method that in great majority of oncologic cases allows to obtain reliable preoperative diagnosis. In some cases however, cytological diagnosis is not achieved. According to the author experience, even in such cases, the chance for improving profitability of cytology in oncological diagnostic procedures, still exists. As it has been found in the own study, preparation of good quality smears and provision of a comprehensive cover letter may significantly increase the likelihood of obtaining useful cytological reports. Moreover, additional techniques of smears preparation and staining techniques, including immunocytochemistry, can be performed on fresh and destained slides. Such procedures allow to obtain cytological diagnosis without the need of preparing supplemental smears. Furthermore, due to immunocytochemistry, cytological diagnosis performed by microscopic analysis of smears stained with routine methods, can be confirmed.

**Keywords:** cover letter, cytology, cytomorphometry, immunocytochemistry.

Pewną rolę w jakości uzyskanego wyniku cytologicznego ma wybór szkiełek mikroskopowych używanych do wykonywania rozmazów. Zdecydowanie bardziej przydatne w badaniach cytologicznych są





**Ryc. 2.** Przykłady rozmazów cytologicznych dobrej jakości (A) i rozmazu (B), w którym większość materiału znajduje się na matowej części szkiełka, co sprawia, że jest on nieprzydatny do celów diagnostycznych



**Ryc. 3.** Próbkę cytologiczną zabezpieczono w nieprawidłowy sposób – szkiełka zostały zlepione ze sobą pobranym materiałem, owinięte gumką i były umieszczone w papierowej torbie

fabrycznie czyste szkiełka mikroskopowe z „matowym/szlifowanym końcem”, na którym ołówkiem (lub flamastrem odpornym na działanie alkoholu) umieszczamy informacje dla laboratorium, takie jak dane identyfikacyjne pacjenta, lokalizacja zmiany, węzeł chłonny, z którego pobrano materiał (jeżeli do badania przesyła się biopaty z różnych węzłów) lub że materiał zawiera rozmaz bezpośredni płynu lub jego osad. Na niektórych szkiełkach powierzchnia matowa znajduje się tylko po jednej stronie szkiełka, dlatego też jeżeli ma być wykorzystana do opisu, to pobrany materiał należy rozmazać na tej właśnie stronie, z której obszar do opisu jest chropowaty i umożliwi pisanie ołówkiem. Wydaje się, że ta prosta czynność może być nieistotna, jednak jest istotna dla cytologa, po pierwsze np. zapobiega przypadkowemu pomyleniu próbki (co w przypadku oceny kilkudziesięciu rozmazów nie może dziwić), a w przypadku skąpego materiału pozwala zorientować się, po której stronie

szkiełka znajduje się rozmazany materiał (czasami trudno jest się dopatrzeć, która strona szkiełka zawiera rozmaz, co może skutkować zniszczeniem próbki w czasie jej przygotowania).

### Technika pobierania materiału i wykonania rozmazów

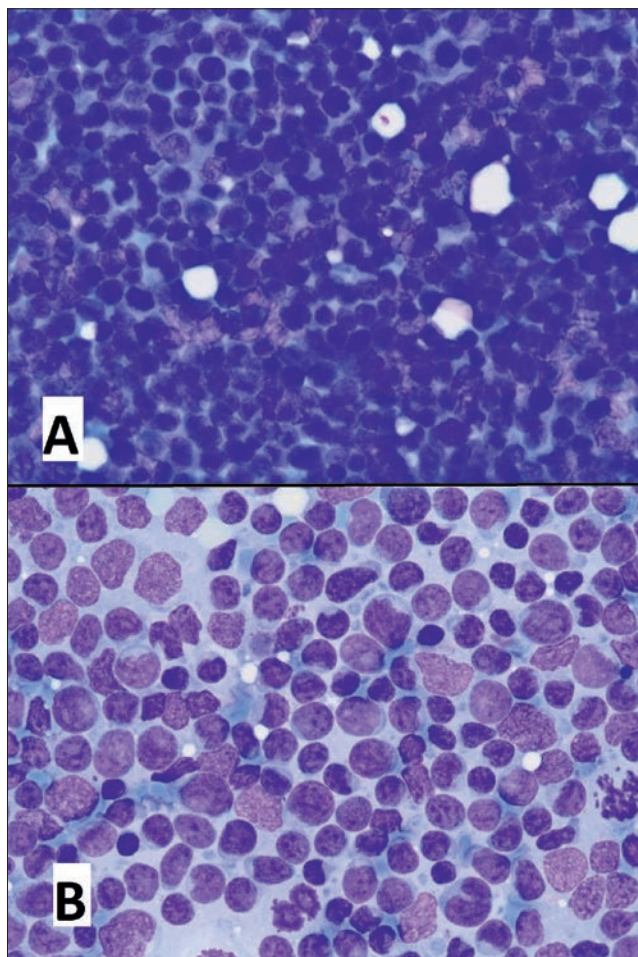
Nawet najbardziej doświadczony patolog nie postawi rozpoznania cytologicznego, gdy otrzyma próbki złej jakości – nie wymagamy przecież od radiologa, aby dokonał opisu zdjęcia rentgenowskiego, które jest „poruszone”, niedoświetlone lub nie zawiera struktury, którą chcemy opisać. Cytowane wyżej badania własne wykazały, że dobra jakość rozmazów wykonanych i nadesłanych przez lekarza klinicystę koreluje dodatnio przydatność diagnostyczną uzyskanego wyniku cytologicznego (1). Co ciekawe, cytowane badanie nie wykazało, aby liczba przesłanych rozmazów wpływała na przydatność

wyniku cytologicznego, co potwierdza zasadę, „że liczy się jakość, a nie ilość”, warto więc wypracować sobie dobrą technikę pobierania materiału i wykonywania rozmazów, których jakość zostanie potwierdzona przez cytologa.

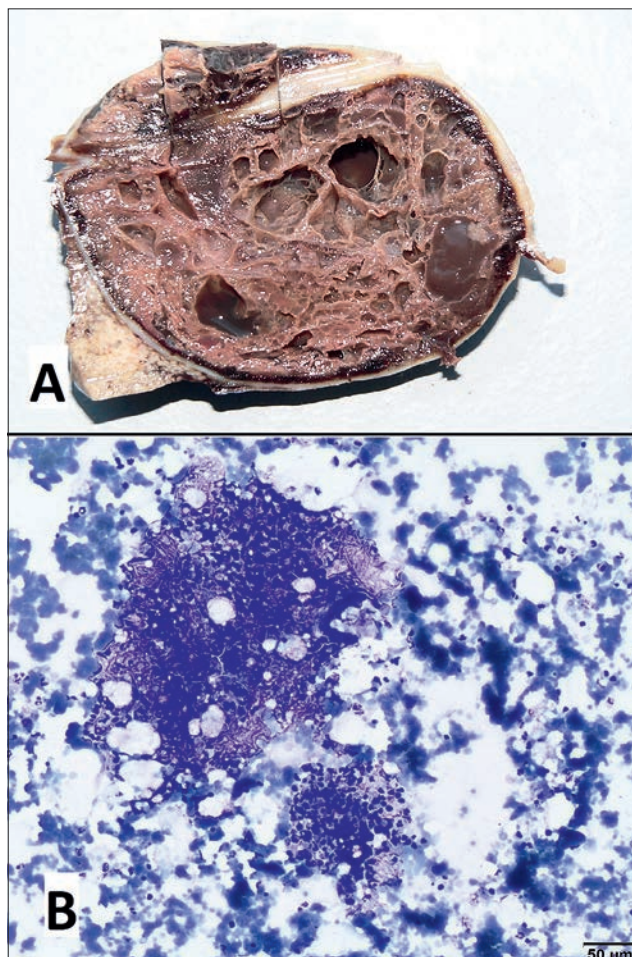
W przypadku zmian bogatokomórkowych (powiększone węzły chłonne), o luźnym utkaniu (śledziona), bogatych w naczynia krwionośne (raki tarczycy) lub obfitujących w obszary wylewów krwi (naczyniakomięsak) korzystne jest zastosowanie techniki biopsji cienkoigłowej bez aspiracji, w której do badanej zmiany wprowadza się samą igłę, a strzykawkę używa tylko do przeniesienia materiału z igły na szkiełko mikroskopowe. Gdy zastosujemy aspirację do pobierania materiału z węzła chłonnego z chłoniakiem, to istnieje duże ryzyko, że materiał będzie tak bogatokomórkowy, że nie uda się go rozmazać w takim stopniu, żeby uzyskać jedną warstwę komórek zdalnych do oceny (**ryc. 4**). W guzach o bogatym unaczynieniu, np. niektórych rakach tarczycy, naczyniakowatej formie guzów gruczolów okołoodbytowych, naczyniakach i naczyniakomięsakach zastosowanie strzykawkę do wytworzenia podciśnienia spowoduje napływ dużej ilości krwi, co skutkuje znacznym rozrzedzeniem próbki, tworzeniem skrzepów na szkiełku lub też tworzy się gruba warstwa materiału uniemożliwiająca poprawną interpretację morfologii nielicznych komórek.

Pomocne w niektórych przypadkach zmian nowotworowych jest pobieranie materiału komórkowego pod kontrolą ultrasonograficzną (jest to wręcz rutynowe działanie w przypadku zmian guzowatych zlokalizowanych w jamach ciała), także w przypadku nowotworów skóry i tkanki podskórnej, czyli takich, które widać bezpośrednio lub które można dokładnie zbadać palpacyjnie. Często mięszsz guza, szczególnie dużego jest heterogenny i oprócz litych pól utworzonych z proliferujących komórek nowotworowych zawiera też obszary torbielowate lub pseudotorbielowate (spowodowane obecnością ogniskowej martwicy guza; **ryc. 5**) oraz obszary wylewów krwi. Struktury jamiste, wypełnione płynem lub półpłynnym materiałem stwierdza się najczęściej w mięszszu gruczolakoraków sutka, naczyniakomięsaków, mięsaków tkanek miękkich u psów oraz mięsaków poniekcyjnych u kotów (**ryc. 6**). W sytuacji gdy igła biopsyjna penetruje obszary lite i zostaje wprowadzona do światła takiej pseudotorbieli, często do igły aspirowana jest duża ilość płynnego materiału, co z pozoru jest korzystne – uzyskujemy obfitą próbkę, jednak w rzeczywistości taki materiał jest często nieprzydatny diagnostycznie, bowiem zawiera płyn, kruszywo komórkowe, komórki nacieku zapalnego i zautolizowane komórki nowotworowe





**Ryc. 4.** Obraz cytologiczny materiału pobranego z węzła chłonного od psa z chłoniakiem. Na rycinie A widoczny rozmaz, w którym materiał pobrano za pomocą biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej (BAC) z aspiracją – widoczna obfita i gęsta populacja komórek, które układają się w liczne warstwy, co sprawia, że struktura komórek jest niewidoczna. Na rycinie B ten sam przypadek, jednak materiał pobrano za pomocą BAC bez aspiracji – widoczna jedna warstwa dobrze rozmazanych komórek limfoidalnych o wyraźnej morfologii. Barwienie barwnikiem Giemsy, powiększenie 400×



**Ryc. 5.** Przykład badania cytologicznego, w którym nie uzyskano jednoznacznej odpowiedzi odnośnie do charakteru zmiany guzowatej. Na rycinie A przedstawiono przekrój poprzeczny zmiany usuniętej chirurgicznie z jamy brzusznej psa – praktycznie całą powierzchnię przekroju tworzy masa martwych tkanek. Na rycinie B zaprezentowano obraz cytologiczny materiału pobranego ze zmiany z ryc. A – widoczne erythrocyty oraz skupiska martwych komórek i kruszywa komórkowego – rozpoznania nie ustalono; barwienie barwnikiem Giemsy, powiększenie 100×

o nieczytelnej morfologii. W tej sytuacji zasadne jest wykonanie biopsji aspiracyjnej lub bez aspiracji pod kontrolą ultrasonografu, co umożliwi wprowadzenie igły i pobranie próbki z obszarów litych guza, które przynajmniej potencjalnie zawierają żywe, proliferujące komórki mięszu nowotworu (**ryc. 7, 8**).

### Wykorzystanie materiału płynnego

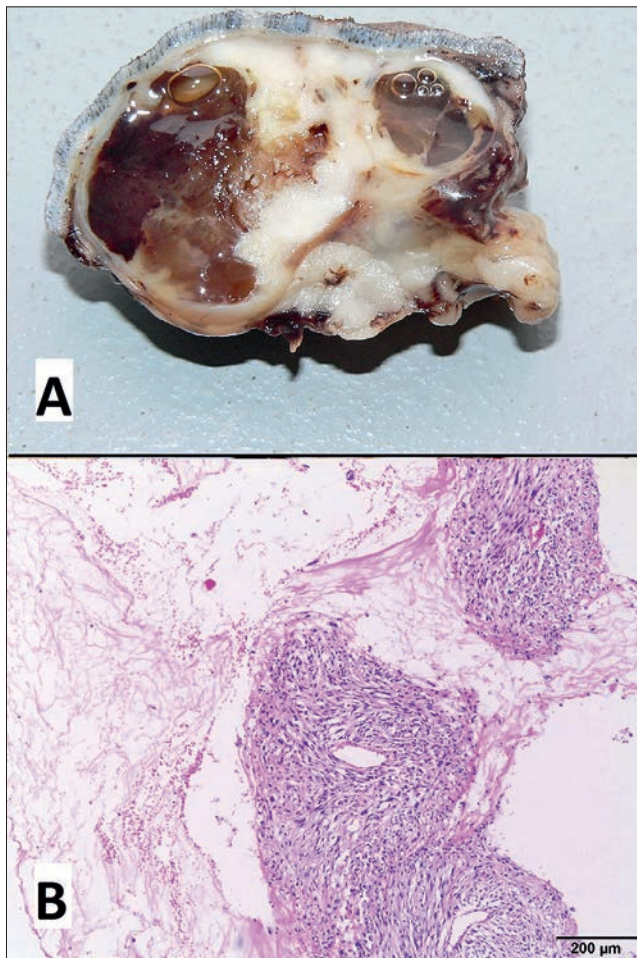
Z doświadczeń własnych wynika, że często, gdy do badania cytologicznego przesyłany jest materiał płynny pobrany z naturalnych jam ciała (np. płyny z jam surowiczych, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn z jamy stawowej), znajduje się on w próbce przeznaczonej do oznaczeń biochemicznych (próbówka „na skrzep”), co sprawia, że w próbce może wytworzyć się skrzep, który wiąże komórki (czyli przedmiot obserwacji w cytologii) i uniemożliwia ich ocenę (**ryc. 9**). Jeżeli już istnieje taka sytuacja, to w dalszym ciągu

istnieje możliwość „uratowania próbki” poprzez umieszczenie skrzepu na powierzchni szkiełka mikroskopowego i rozprowadzenie materiału za pomocą igły techniką „star-fish” (rozgwiazdy), której zasadę przedstawia **rycina 10**. Regułą jest, że próbki płynu przeznaczonego do badania cytologicznego powinny być umieszczane w próbce z EDTA. Kolejnym potencjalnym problemem może być zjawisko autolizy (rozpoczyna się ono już w momencie pobrania próbki i wraz z upływem czasu pogłębia się), jakiej podlegają komórki zawieszony w pobranym płynie i która może zmieniać morfologię komórek (obrzęk komórek i jąder komórkowych, tworzenie się wakuoli cytoplazmatycznych, a niekiedy procesy rozpadu komórek; **ryc. 11**). Dlatego w takiej sytuacji oprócz umieszczenia próbki w lodówce (schłodzenie, ale nie zamrożenie) do czasu jej odbioru przez kuriera należy wykonać kilka (3–4) bezpośrednich rozmazów płynu niewirowanego oraz rozmazy z osadu i dołączyć je wraz

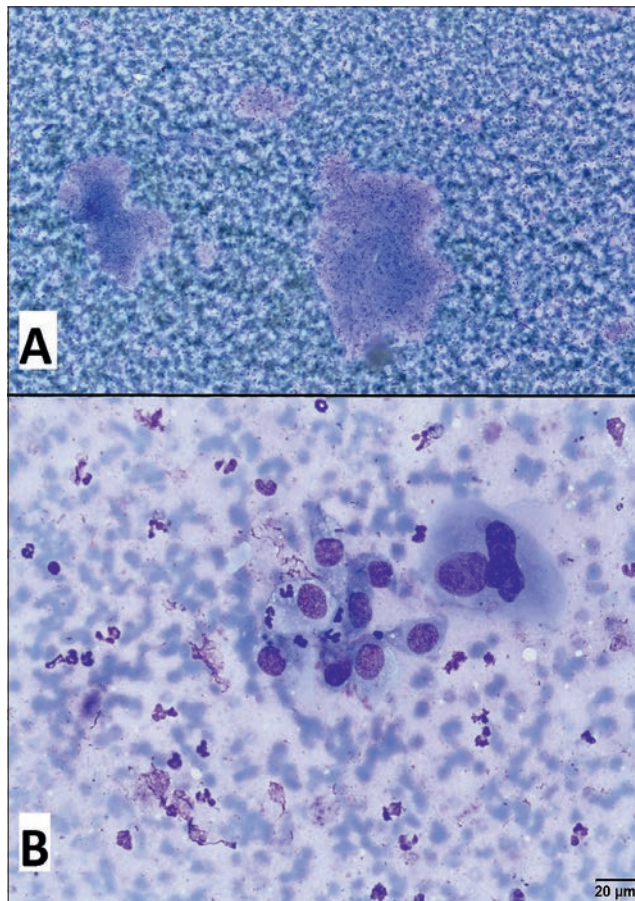
ze skierowaniem do przesyłanej próbki. Jeżeli lecznica dysponuje wirówką, to pobrany płyn należy odwirować i wykonać kilka (4–5) rozmazów z małej kropli osadu komórkowego. Taka procedura sprawi, że oprócz próbki płynnej cytolog otrzyma rozmazy zawierające komórki o pierwotnej morfologii bez artefaktów spowodowanych zmianami autolitycznymi komórek. Jeżeli lecznica nie dysponuje wirówką, to po wykonaniu rozmazów bezpośrednich płyn w próbce z EDTA można na godzinę umieścić w lodówce (nie zamrażać, próbkę postawić pionowo), co umożliwi oddzielenie się części płynnej próbki od stałej – powstanie bogatokomórkowy osad (**ryc. 12**), a następnie najlepiej strzykawką insulinówką usunąć delikatnie płyn nad osadu i z samego osadu wykonać kilka rozmazów cytologicznych.

Inną możliwością, która może ułatwić ocenę cytologiczną materiału płynnego, przy braku wirówki jest wykonanie rozmazów techniką z liniową koncentracją

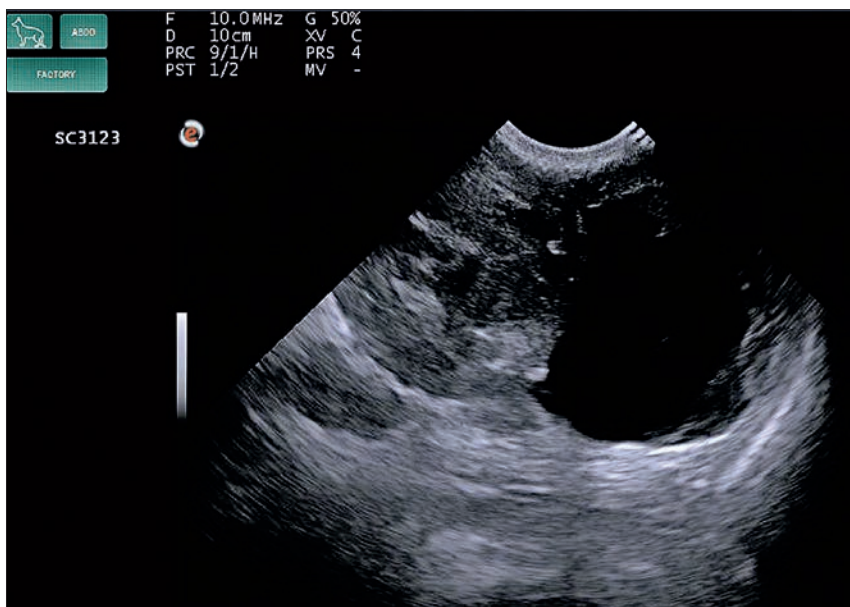




**Ryc. 6.** Na rycinie A widoczny przekrój podłużny guza tkanki podskórnej usuniętego z okolicy łopatki od kota – rozpoznanie cytologiczne: mięsak z cechami mięsaka poiniekiyjnego – obecność jam wypełnionych śluzowatym płynem to typowa cecha morfologiczna tych nowotworów. Na rycinie B obraz mikroskopowy tego guza okazuje oprócz skupisk proliferujących komórek nowotworowych także obszary nagromadzenia śluzu (białe obszary z różowymi pasmami, głównie po stronie lewej) makroskopowo widocznego jako ciągliwy gęsty płyn. Rozpoznanie histopatologiczne: włóknakiomięsak z cechami mięsaka poiniekiyjnego; barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 40×



**Ryc. 8.** Obraz cytologiczny guza z ryciny 7. Na rycinie A widoczny materiał pobrany z obszaru jamistego – zawiera liczne erytrocyty oraz skupiska zautolizowanych komórek i bezpostaciowych mas. Na rycinie B widoczny obraz materiału pobranego pod kontrolą ultrasonografu z litego obszaru guza – oprócz erytrocytów widoczne są też komórki wydłużone i wielokątne ze skrajnie pleomorficznymi jądrami, co sugeruje naczyniakomięsaka (rozpoznanie potwierdzono badaniem histopatologicznym). Barwienie barwnikiem Giemsa, powiększenie 400×



**Ryc. 7.** Obraz ultrasonograficzny naczyniakomięsaka tkanki podskórnej psa – co typowe w takich przypadkach, guz jest utworzony z obszarów litych oraz jam wypełnionych krwistą płynną zawartością

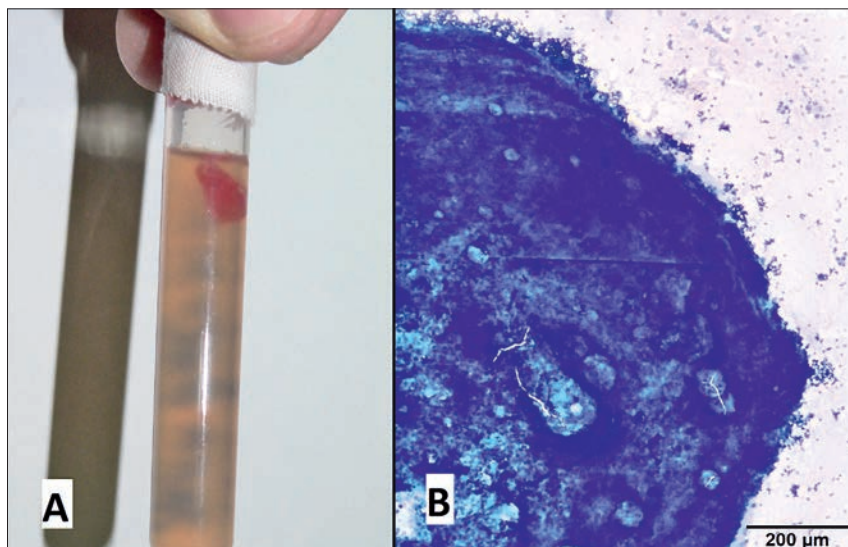
komórek. Taka technika pozwala uzyskać na szkiełku mikroskopowym liniowy obszar bogaty w komórki, co zdecydowanie ułatwia obserwację mikroskopową – pozwala w krótkim czasie ocenić dużą liczbę komórek zawartych w próbce. Aspekty techniczne tej metody wykonywania rozmazów oraz zalety takiego postępowania prezentują [ryciny 13, 14 i 15](#).

#### Badanie cytologiczne próbek moczu

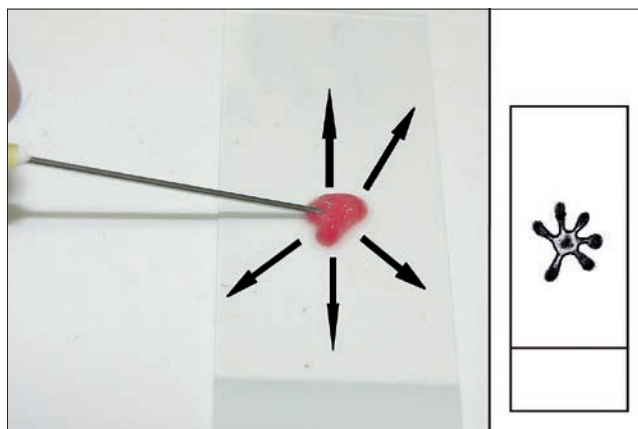
Badanie ogólne moczu jest metodą diagnostyczną powszechnie używaną w celu określania przyczyn powodujących różne objawy kliniczne u pacjentów weterynaryjnych. Częścią badania ogólnego moczu jest mikroskopowa ocena rozmazu, która w badaniu rutynowym jest raczej pobieżna, jednak celowe w niektórych przypadkach jest precyzyjne określenie morfologii komórek obecnych w tym płynie fizjologicznym, co jest możliwe w trakcie badania



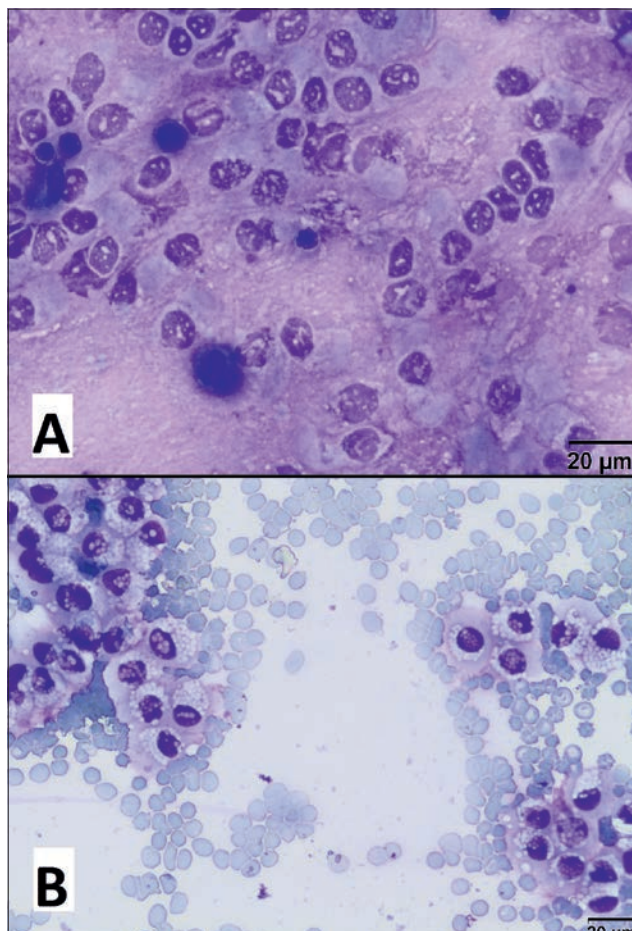
cytologicznego moczu. Z uwagi na wybitnie niekorzystne w stosunku do komórek właściwości moczu, w przypadku gdy planuje się badanie cytologiczne, należy, po zabezpieczeniu stosownych próbek do badania ogólnego i ewentualnego posiewu, zabezpieczyć też oddzielną porcję moczu do oceny cytologicznej. Taką próbkę należy odwirować (najlepiej w wirówce z możliwością jednoczesnego schłodzenia) i wykonać rozmazy z powstałego osadu. Odwlekanie tej procedury sprawia, że obecne w moczu komórki ulegają nasilonym zmianom litycznym i ocena ich morfologii nie jest możliwa lub też analiza może być obciążona błędem. Niektórzy autorzy podają, aby do próbki moczu dodać kilka kropli formaliny, co wstępnie utrwali komórki, jednak, jak się wydaje, formalina może utrudniać penetrację barwnika Giemsy, przez co efekty barwienia nie są zadowalające. W przypadku braku komórek w rozmazach, do momentu odbioru materiału



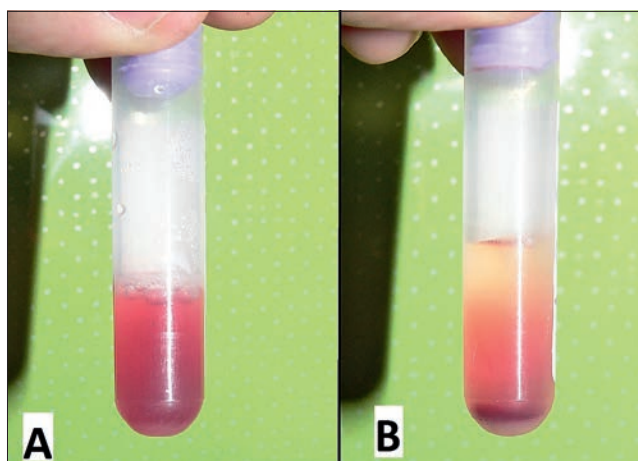
**Ryc. 9.** Konsekwencja umieszczenia próbki płynu w probówce bez antykoagulantu: na rycinie A widoczny pływający skrzep utworzony z komórek, które osadziły się na dnie próbki, na ryc. B obraz mikroskopowy fragmentu skrzepu – widać wyraźnie, że morfologia komórek jest nieczytelna, co uniemożliwia określenie rozpoznania cytologicznego; barwienie barwnikiem Giemsy, powiększenie 10×



**Ryc. 10.** Rycina przedstawia technikę postępowania (tzw. technika „star-fish”), która umożliwia pozyskanie komórek do badania cytologicznego ze skrzepu – za pomocą igły iniekcyjnej rozprządza się skrzep w różnych kierunkach, otrzymując materiał płynno-komórkowy, który przyjmuje kształt rozgwiazdy – jak przedstawiono na schemacie po stronie prawej

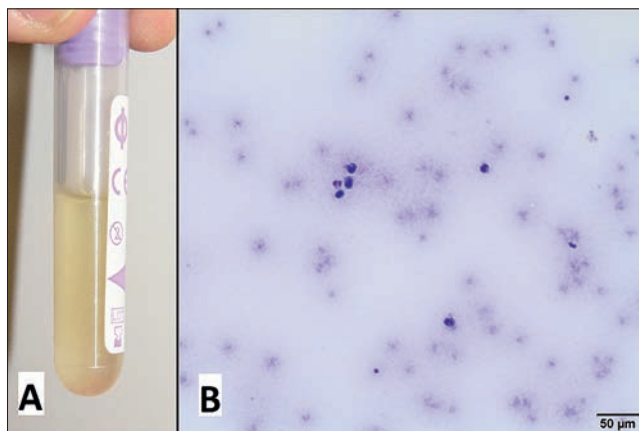


**Ryc. 11.** Przykłady rozmazów cytologicznych wykonanych z materiału, który dostarczono do laboratorium w formie płynnej (czas od pobrania próbki do wykonania rozmazu wynosił kilkanaście godzin). Na rycinie A komórki nabłonka walcowatego tchawicy kota pobrane metodą popłuczyn; na rycinie B komórki aktywowanego międzybłonka psa pobrane w trakcie abdominocentezy z aspiracją płynu. W obu przypadkach widoczne są zmiany autolityczne, przejawiające się powiększeniem komórek, z tworzeniem wakuoli wewnątrzjądrowych (szczególnie na ryc. A) i cytoplazmatycznych (szczególnie na ryc. B), co uniemożliwia obiektywną ocenę morfologii komórek, a co za tym idzie ich stan faktyczny. Barwienie barwnikiem Giemsy, powiększenie 400×

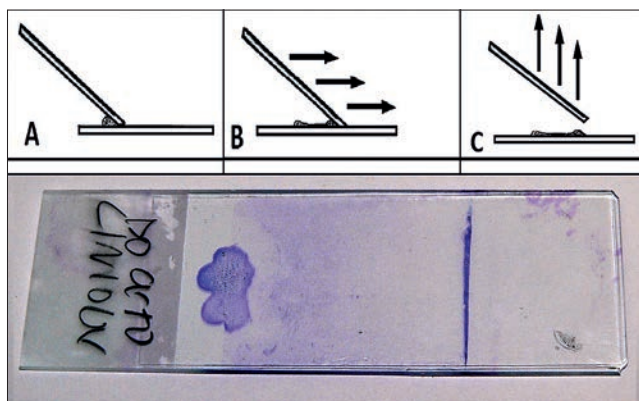


**Ryc. 12.** Pozostawienie płynu pobranego z jamy surowiczej (rycina A) na godzinę w lodówce umożliwiło osadzenie się bogatokomórkowego osadu na dnie próbki (rycina B), przy jednoczesnym spowolnieniu procesów autolitycznych. Badanie cytologiczne osadu pozwoliło na rozpoznanie wysięku nowotworowego – gruczolakorak gruczołu sutkowego rozsiały do jamy klatki piersiowej

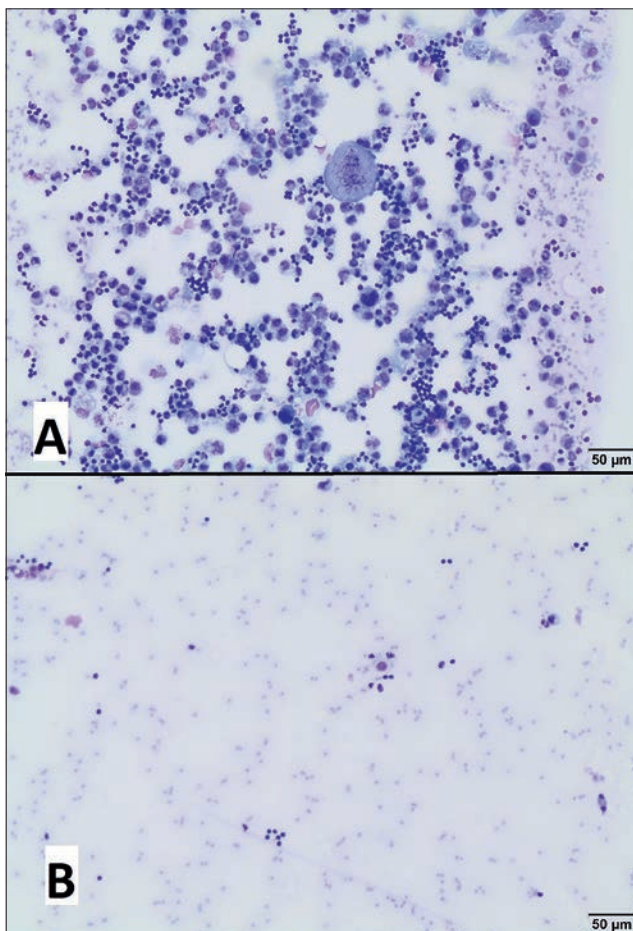




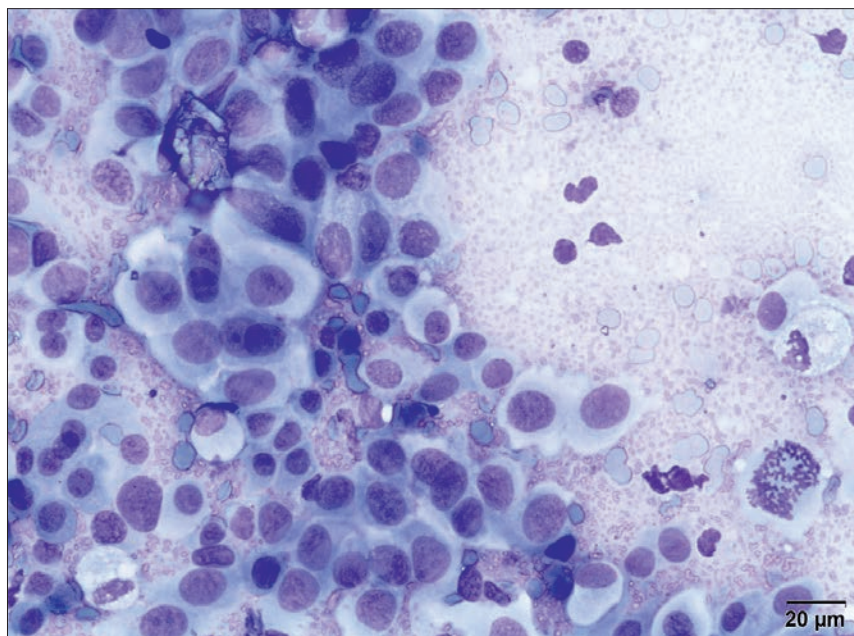
**Ryc. 13.** Płyn pobrany z jamy klatki piersiowej od kota makroskopowo jest wodnisty, przezierny i lekko żółtawy (ryc. A), co sugeruje, że jest ubogokomórkowy. Badanie cytologiczne wykazało (ryc. B), że w rzeczywistości tak jest, płyn zawiera nieliczne erythrocyty i nieliczne komórki jądrowe (neutrofile i makrofagi); barwienie barwnikiem Giemsa, powiększenie 40×



**Ryc. 14.** Technika rozmazu z liniową koncentracją komórek: na górze przedstawiono poszczególne etapy wykonywania rozmazu, a na dole efekt finalny po zabarwieniu barwnikiem Giemsa – po stronie prawej rozmazu widoczna poprzeczna granatowa linia bogata w komórki



**Ryc. 15.** Obraz cytologiczny rozmazu z ryciny 14. Na rycinie A sfotografowano pole z linii zagęszczenia – widoczna obfita populacja komórek jądrowych, głównie makrofagów i neutrofilów, w górnej części obrazu widoczna też olbrzymia komórka z atypową figurą mitotyczną (co nasuwa podejrzenie złośliwego nowotworu nabłonkowego). Na rycinie B sfotografowano pole z obszaru niezagęszczonego – podobny skład komórkowy, jednak liczba komórek jest zdecydowanie mniejsza. Barwienie barwnikiem Giemsa, powiększenie 40×



**Ryc. 16.** Obraz cytologiczny materiału pobranego metodą traumatycznej katetyzacji ze zmiany rozrostowej cewki moczowej – widoczna obfita populacja komórek nabłonkowych z cechami wyraźnej atypii komórkowej i jądrowej, na dole po prawo widoczna figura mitotyczna – obraz wskazuje na raka z nabłonka przejściowego; barwienie barwnikiem Giemsa, powiększenie 100×

przez kuriera z próbką moczu postępuje się jak opisano powyżej w przypadku płynów z jam ciała (jednak w przypadku wirowania próbki moczu wskazane jest zastosowanie krótszego czasu i niższej prędkości wirowania).

Z doświadczeń autora wynika, że w przypadku podejrzenia zmian rozrostowych pęcherza moczowego lekarze klinicyści w pierwszej kolejności przesyłają do badania cytologicznego mocz pobrany podczas mikcji (co wydaje się jak najbardziej uzasadnionym postępowaniem). Należy jednak pamiętać, że jedynie u około 30% psów z rakiem nabłonka przejściowego pęcherza moczowego komórki nowotworowe stwierdza się w moczu, co sprawia, że skuteczność badania cytologicznego osadu moczu w rozpoznawaniu raka pęcherza moczowego została oceniona na niską. Dodatkowo, komórki nabłonka przejściowego pęcherza moczowego w przebiegu procesu zapalnego łatwo ulegają zmianom morfologicznym, które przypominają te obserwowane w zmianach rozrostowych nienowotworowych oraz w nowotworach



złośliwych, co (w przypadku występowania atypowych komórek nabłonka z jednoczesnymi komórkami zapalnymi i bakteriami) uniemożliwia określenie prawidłowego rozpoznania, nawet w próbkach bogatokomórkowych.

Zwiększenie skuteczności badania cytologicznego w rozpoznawaniu nowotworów pęcherza moczowego (nawet do 90% przypadków) można uzyskać, wykonując biopsję cienkoigłową masy guzowatej pęcherza moczowego – jednak takie postępowanie jest obciążone ryzykiem rozsiewu komórek nowotworowych w obrębie tkanek, przez które przechodziła igła biopsyjna. Kompromisem w takich przypadkach może być pobranie materiału do badania cytologicznego za pomocą cewnika, który (w zależności od lokalizacji zmiany) wprowadza się do dróg wyrowadzających mocz lub pęcherza moczowego i uszkadza się powierzchnie zmiany rozrostowej (łatwiej jest tę procedurę wykonać pod kontrolą ultrasonografu), a następnie materiał przenosi się z końcówki cewnika na szkiełko mikroskopowe i wykonuje rozmaz. Pobranie próbek tą techniką pozwala pobrać materiał bezpośrednio ze zmiany rozrostowej, przy jednoczesnym wyeliminowaniu ryzyka rozsiewu nowotworu złośliwego, co jest możliwe w czasie biopsji przezskórnej. Potencjalną wadą tej techniki jest to, że pobiera się materiał z powierzchni guza, w której dominować mogą zmiany o charakterze owrzodzenia i zapalenia. Jednak obserwacje własne wskazują, że opisana technika dostarcza z reguły próbek o wysokiej jakości, co pozwala na uzyskanie rozpoznania cytologicznego (ryc. 16).

### Barwienie preparatów cytologicznych

#### Barwienia dodatkowe

Niezwykle istotną rolę w onkologicznej diagnostyce cytologicznej pełnią histochemiczne barwienia dodatkowe, które umożliwiają wykrycie specyficznych związków chemicznych w pobranych komórkach. Do owych metod należą między innymi wykrywanie niewielkich ilości melaniny w komórkach czerniaków amelanotycznych (srebrzenie metodą Fontana), wykrywanie ziarnistości komórek tłuszczowych (barwienie błękitem toluidyny), wykrywanie substancji śluzowych w komórkach śluzakomięsaka lub gruczolakoraka (barwienie metodą PAS) czy wykrywanie żelaza w komórkach mięsaków histiocytarnych, takie dodatkowe barwienia z powodzeniem wykonuje się od wielu lat w utrwalonych rozmazach materiału pobranego ze zmian nowotworowych. Wykazano jednak, że powyższe barwienia dodatkowe można wykonać też na rozmazach zabarwionych

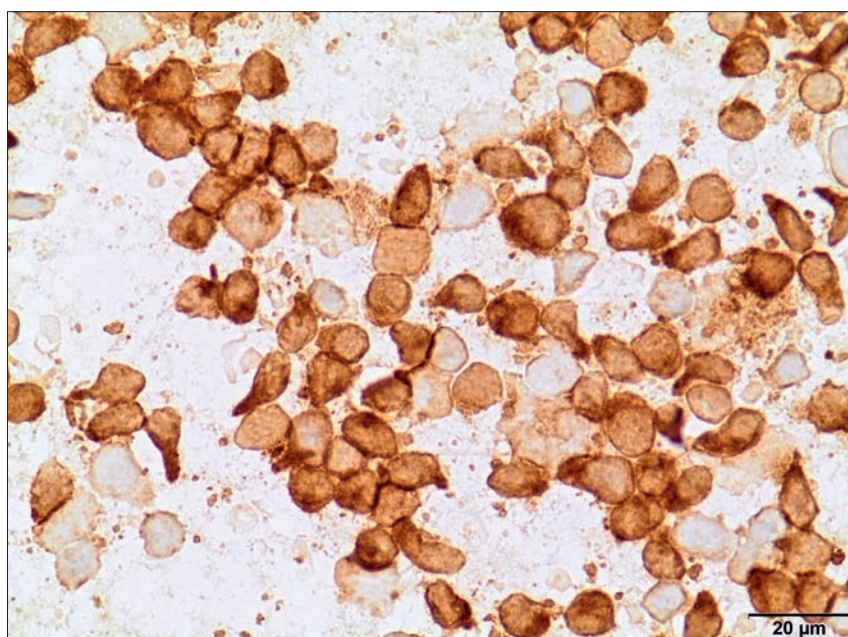
wcześniej metodą opartą na barwieniu metodą Romanowskiego, po ich odbarwieniu. Co jest istotne, w metodzie tej wybrane do dodatkowego barwienia rozmazy są wcześniej oceniane pod względem ich przydatności do barwienia – ocena pierwotnie zabarwionego rozmazu pozwala stwierdzić, że rzeczywiście zawiera on dobrze zachowane, liczne komórki, więc warto taki rozmaz zabarwić metodą dodatkową (2).

#### Barwienie immunocytochemiczne

Przydatność badania cytologicznego preparatów barwionych metodami rutynowymi jest niepodważalna, jednak w przypadku niektórych zmian jej skuteczność bywa niezadowalająca (3). Jest to spowodowane faktem, że komórki różnych typów rozrostów mogą wykazywać podobną morfologię, co wykazano w zobiektywizowanych badaniach cytomorfometrycznych z zastosowaniem systemów komputerowej analizy obrazu mikroskopowego umożliwiających precyzyjne pomiary komórek i ich jąder (4, 5). Zastosowanie barwienia immunocytochemicznego z użyciem powszechnie dostępnych przeciwciał (przeciwciała anty-cytokeratyna, anty-wimentyna, anty-MelanA) pozwala poprawić skuteczność (swoistość i czułość wynoszącą 100%) rozpoznawania niskozróżnicowanych nowotworów złośliwych jamy ustnej u psów, a także poprawić skuteczność rozpoznawania przerzutów czerniaków amelanotycznych do regionalnych węzłów chłonnych (3). Z kolei barwienie immunocytochemiczne przeciwciałami przeciw filamentom pośrednim (przeciwciała

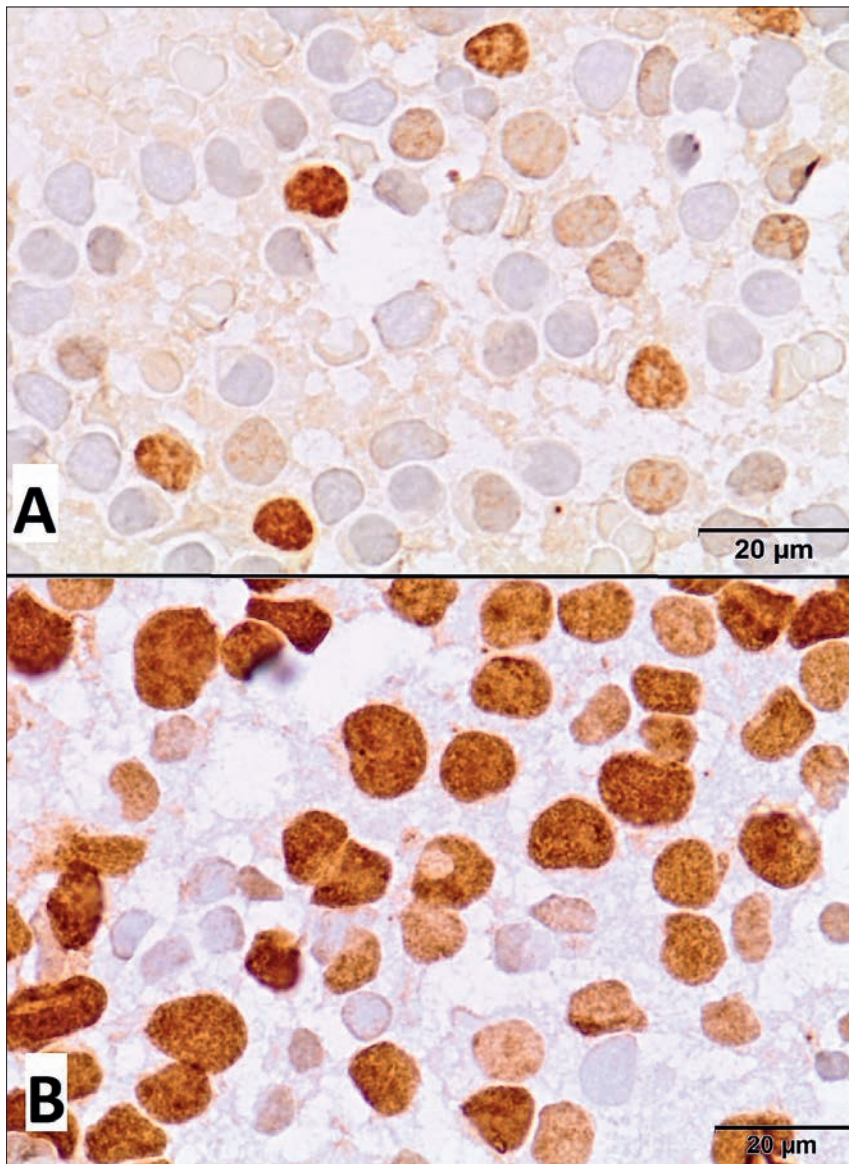
anty-cytokeratyna, anty-wimentyna, anty-desmina) umożliwia różnicowanie pomiędzy komórkami raka/gruczolakoraka oraz międzybłoniaka, a także pomiędzy komórkami raka/gruczolakoraka oraz komórkami międzybłonka odczynowego (6). W przypadku chłoniaków zastosowanie ma barwienie immunocytochemiczne, które pozwala na ocenę immunofenotypu komórek nowotworowych (chłoniaki B i T komórkowe; ryc. 17) oraz ocena aktywności proliferacyjnej komórek nowotworowych (wykrywanie antygenu Ki67 w jądrach komórek dzielących się; ryc. 18). Badania własne wykazały, że preparaty, które planuje się zabarwić metodą immunocytochemiczną przeciwciałami anty-cytokeratyna, anty-wimentyna, anty-desmina, anty-MelanA, nie muszą być utrwalane i przesyłane do laboratorium w specyficznych warunkach (utrwalanie w zimnym acetonie, schłodzenie podczas transportu), wystarczy, że zostaną dostarczone do laboratorium w ciągu 24 godzin od momentu pobrania (3, 6).

W przypadku gdy dysponujemy niewielką liczbą rozmazów cytologicznych, a określenie rozpoznania pochodzenia nieodróżnicowanych komórek nowotworowych wymaga zastosowania co najmniej dwóch metod immunocytochemicznych, możliwe jest wykonanie ich na pojedynczym rozmazie. W tym celu stosując odpowiedni marker/pisak, obrysowuje się obszar rozmazu, dzieląc go na dwie części, przeznaczone do barwień różnymi przeciwciałami. Zaletą owego pisaka jest to, że tworzy on dookoła zaznaczonego obszaru pas, który izoluje obrysowane części rozmazu i uniemożliwia przemieszczanie



Ryc. 17. Obraz cytologiczny materiału pobranego z powiększonego węzła chłonnego od psa – badanie rozmazów barwionych barwnikiem Giemsa wykazało obecność chłoniaka, a kolei pozytywna reakcja barwienia immunocytochemicznego przeciwciałem anty-CD3 (brązowa barwa cytoplazmy) wskazuje na pochodzenie rozrostu z limfocytów T. Barwienie immunohistochemiczne przeciwciałem anty-CD3, powiększenie 100×





**Ryc. 18.** Obraz cytologiczny dwóch przypadków chłoniaków u psów, w których wykonano barwienie immunohistochemiczne przeciwciałem MIB-1 (wykrywa immunoekspresję antygenu Ki67, którego obecność obserwuje się w jądrach komórek znajdujących się w cyklu podziałowym). Na rycinie A komórki chłoniaka o niskiej złośliwości – dodatnia reakcja, o różnym nasileniu obecna jest w poniżej 20% jąder komórkowych, co wskazuje na niską aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych. Na rycinie B komórki chłoniaka o wysokiej złośliwości – dodatnia reakcja obecna w około 80% widocznych jąder komórkowych, co wskazuje na wysoką aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych. Barwienie immunohistochemiczne przeciwciałem MIB-1, powiększenie 400×

się użytych odczynników z jednego fragmentu rozmazu do drugiego. Autor stosował taką technikę barwienia do immunofenotypowania komórek chłoniaka (umożliwia wykazanie na jednym rozmazie wykazanie ekspresji CD3 i CD79alfa), odróżniania mięsaków od raków (barwienie cytokeratyny i wimentyny) czy komórek czerniaków amelanotycznych od raków (barwienie cytokeratyny i MelanA). Informacje na temat możliwych zastosowań barwienia immunocytochemicznego w onkologii weterynaryjnej przedstawiono w tabeli 1.

#### Barwienie metodą immunohistochemiczną preparatów, które były wcześniej zabarwione metodami rutynowymi

Pewną niedogodnością barwienia immunocytochemicznego jest brak pewności,

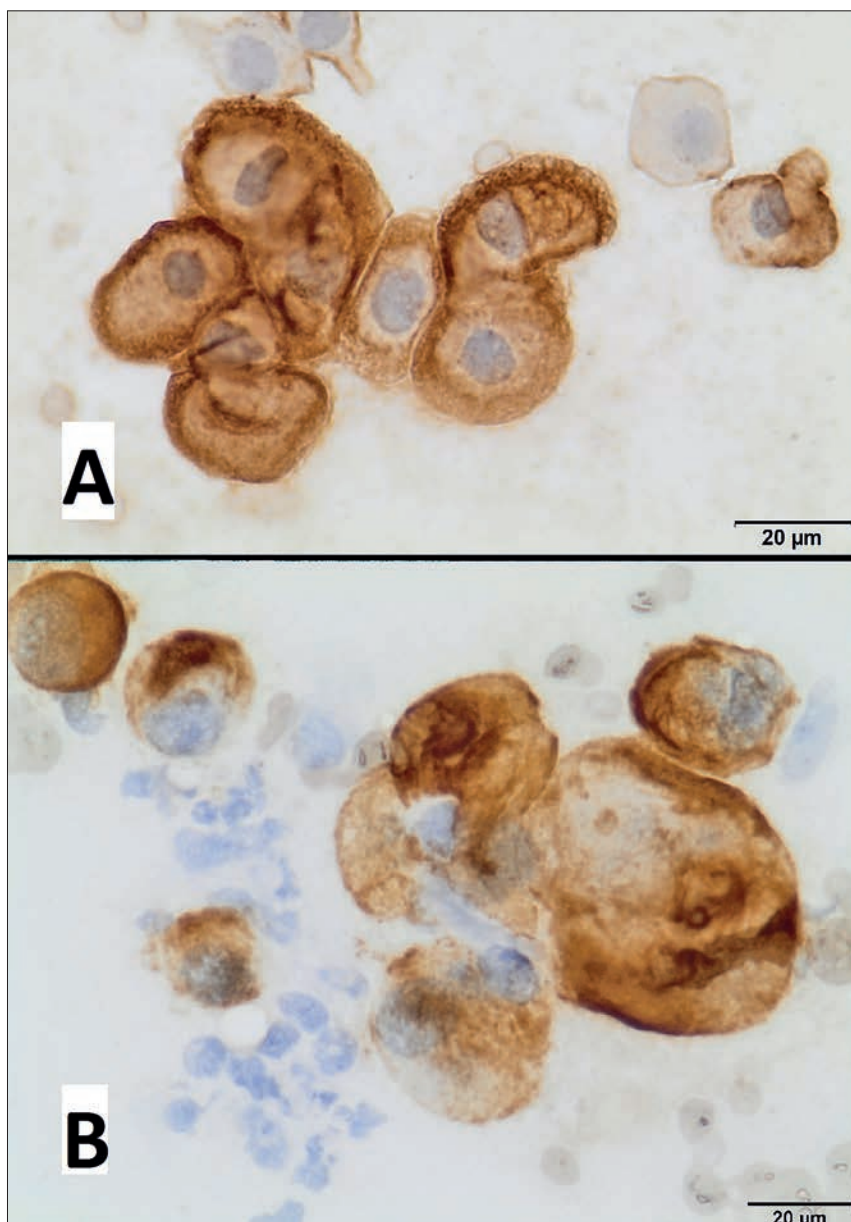
**Tabela 1.** Uwagi do barwienia immunohistochemicznego/immunocytochemicznego

Barwienie immunocytochemiczne służy do wykrywania konkretnych antygenów (Ag) w badanych komórkach. Próbką jest barwiona specyficznymi przeciwciałami (Ab), które rozpoznają konkretny antygen, a technika barwienia umożliwia wykazanie miejsca reakcji znanego przeciwciała z szukanym antygenem (najczęściej brązowa barwa). Barwienie to najczęściej wykorzystuje się przy ocenie pochodzenia komórek lub niektóre antygeny o wartości rokowniczej bądź przydatne przy planowaniu leczenia, stosując poniższe przeciwciała

Stosowane przeciwciała/poszukiwany antygen	Charakterystyka poszukiwanego antygenu
Cytokeratyna	marker komórek nabłonka
Wimentyna	marker komórek mezenchymalnych
Desmina	marker tkanki mięśniowej
MelanA	marker melanocytów, melanoblastów
CD3	marker limfocytów T
CD11/CD18, CD68	markery histiocytów/makrofagów
CD20, CD21, CD79alfa, Pax5	markery limfocytów B
CD34	marker komórek blastycznych, komórek śródbłonka
CD117 (c-KIT)	receptor kinazy tyrozynowej
Aktyna	marker mięśni gładkich
Chromogranina, synaptofizyna	markery komórek endokrynowych
ER – receptory estrogenowe	obecność receptorów estrogenowych
Ki67	ocena aktywności proliferacyjnej komórek
Podoplanina	marker podocytów
S-100	komórki układu nerwowego, komórki czerniaka
TTF-1	pierwotne raki płuc i tarczycy

W związku z dość dużym kosztem barwienia, sugestia o konieczności zastosowania barwienia immunohistochemicznego jest wskazana przez patologa po badaniu cytologicznym preparatów barwionych metodą przeglądową, jeżeli wynik nie jest jednoznaczny. Decyzję o wykonaniu barwienia potwierdza lekarz kierujący poprzez zgłoszenie tego faktu do laboratorium





**Ryc. 19.** Przykład wykorzystania preparatów cytologicznych barwionych metodami rutynowymi do barwień immunocytochemicznych, na przykładzie komórek gruczolakoraka. Na rycinie A widoczne komórki nowotworowe z dodatnią immunoekspresją cytokeratyny (brązowa barwa cytoplazmy) – preparat barwiono standardową metodą. Na rycinie B komórki tego samego rozrostu z dodatnią reakcją na obecność cytokeratyny – w tym przypadku do barwienia immunocytochemicznego użyto rozmazu, który wcześniej był barwiony barwnikiem Giemsa. Barwienie immunohistochemiczne przeciwciałem anti-cytokeratyna, powiększenie 400×

czy przesłany rozmaz rzeczywiście zawiera komórki nowotworowe, co jest o tyle istotne, że koszt jednostkowego badania wynosi od kilkudziesięciu złotych (za jedno przeciwciało) do kilkuset złotych za panel (3–4 przeciwciała, najczęściej do określenia rozpoznania stosuje się panel przeciwciał). Brak komórek na dostarczonych rozmazach sprawia, że rezultat wykonanych (i opłaconych przez właściciela) barwień może nie być rozstrzygający, co może skutkować frustracją lekarza kierującego i niezadowolaniem właściciela pacjenta. Rozwiązaniem problemu może być barwienie metodą immunohistochemiczną preparatów, które były wcześniej zabarwione odczynnikiem Giemsa i wiadomo,

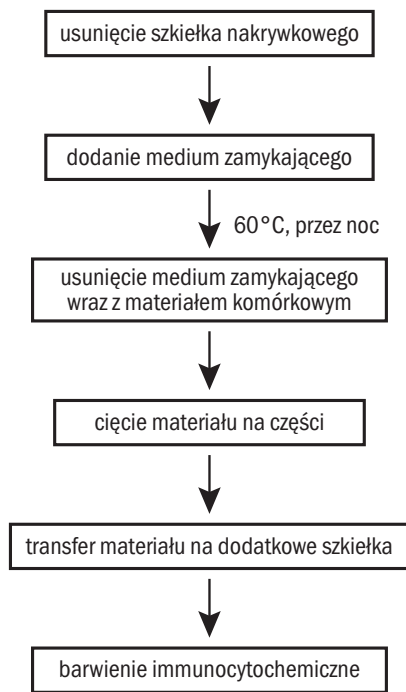
że zawierają komórki, które mają cechy komórek nowotworowych. Niestety, z taką procedurą wiąże się poważny problem, bowiem procedura barwienia odczynnikiem Giemsa może zmieniać właściwości poszukiwanych antygenów (zmiany antygeny mogą wynikać z upływu czasu oraz wpływu, jaki wywierają chemikalia użyte w trakcie barwienia, w szczególności metanol) w taki sposób, że reakcja antygen-przeciwciało nie wystąpi, pomimo że poszukiwany antygen będzie obecny w badanych komórkach. Autor stosował barwienie immunocytochemiczne preparatów zabarwionych wcześniej odczynnikiem Giemsa, z zastosowaniem przeciwciał anti-cytokeratyna do różnicowania

pomiędzy guzami nabłonkowymi (rakami) i mezenchymalnymi (mięśniami), z różnym powodzeniem, jednak w części przypadków (około 50%) udało się uzyskać reakcję barwną potwierdzającą obecność komórek nabłonkowych. Wynika z tego, że taka procedura może z powodzeniem służyć do potwierdzania nabłonkowego pochodzenia komórek nowotworowych (w przypadku gdy reakcja barwna się pojawia; **ryc. 19**), jednak takiego pochodzenia nie może wykluczyć (w przypadku gdy reakcja się nie pojawia).

### Technika transferu materiału komórkowego

Interesującą procedurą, która umożliwia przeprowadzenie licznych dodatkowych metod barwienia (barwienia histochemiczne i barwienia immunocytochemiczne) na nielicznych rozmazach, jest transfer zabarwionego materiału komórkowego z powierzchni oryginalnego szkiełka mikroskopowego na dodatkowe szkiełka mikroskopowe (7, 8). W tym przypadku zabarwiony metodą Romanowskiego rozmaz (którego jakość można ocenić pod mikroskopem) zatapia się w medium zamykającym – Pertex (Medits, Burgdors, Niemcy), do spodu którego przykleja się materiał komórkowy z powierzchni szkiełka. Następnie medium zamykające wraz z rozmazem się odkleja od szkiełka pierwotnego, dzieli na części i poszczególne części rozmazu nakleja na dodatkowe szkiełka podstawowe, a następnie usuwa medium, pozostawiając na szkiełku wtórnym jedynie materiał komórkowy (fragment pierwotnego rozmazu). Preparat taki poddaje się barwieniom dodatkowym, w tym histochemicznym (barwienie na obecność grzybów, prątków kwasoodpornych, amyloidu) i immunocytochemicznym. Poszczególne etapy tej procedury prezentuje **rycina 20**. Stosując technikę transferu rozmazu, Stone i Gan (8) wykazali, że archiwalne rozmazy (przechowywane nawet przez wiele miesięcy) materiału cytologicznego pobranego z węzłów chłonnych od psów z chłoniakiem można z powodzeniem używać do oceny immunofenotypu komórek nowotworowych (zastosowano przeciwciała anti-CD3 – marker limfocytów T oraz przeciwciała PAX5 – marker limfocytów B). Wykazano też, że technika transferu rozmazów cytologicznych nadaje się również w przypadku barwienia materiału komórkowego w kierunku wykrywania następujących antygenów: cytokeratyny (marker komórek nabłonkowych), S-100 (marker komórek nerwowych i melanoblastów), HMB-45 (marker komórek czerniaka), TTF-1 (marker komórek raka tarczycy i płuc), CD20 (marker limfocytów B) oraz antygen receptorów estrogenowych (8).





**Ryc. 20.** Rycina prezentuje kolejne etapy transferu rozmazów cytologicznych, które można wykorzystać do wykonania kilku dodatkowych metod barwienia, w tym barwienia immunocytochemicznego

Podobną analizę przeprowadzono w onkologii medycznej, gdzie transfer rozmazu został użyty do oceny możliwości zastosowania immunocytochemii z zastosowaniem około 20 przeciwciał stosowanych w rutynowej onkologicznej diagnostyce

cytologicznej (7). Procedura okazała się bardzo skuteczna, aż w 95% przypadków udało się z powodzeniem przenieść materiał komórkowy z pierwotnego szkiełka na szkiełka dodatkowe i wykonać barwienie immunocytochemiczne, którego zgodność z barwieniem rozmazów świeżych oceniono bardzo wysoko (97%). Autorzy pracy konkludują jednak, żeby przy interpretacji wyników barwienia zachować ostrożność w przypadku barwienia materiału ubogokomórkowego lub wtedy gdy pojawia się reakcja barwna tła preparatu (7).

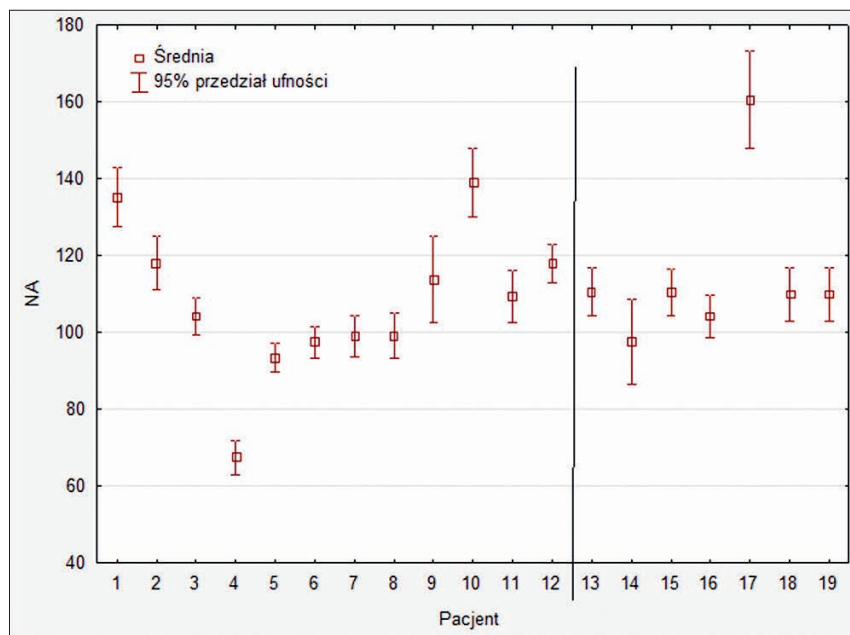
### Analiza cytomorfometryczna

W niedawno opublikowanej pracy przeglądowej zaprezentowano potencjalne korzyści, jakie płyną z analizy cytomorfometrycznej komórek pobranych ze zmian o charakterze nowotworowym (9). W wielu pracach wykazano, że obiektywna ocena wymiarów komórek i jąder komórkowych za pomocą systemów komputerowej analizy obrazu mikroskopowego pozwala na zastosowanie cytomorfometrii jako metody pomocnej w różnicowaniu pomiędzy złośliwymi i niezłośliwymi nowotworami skóry (guzów gruczołów apokrynowych odbytu, guzów podstawnokomórkowych), pomiędzy niezłośliwymi i złośliwymi nowotworami gruczołu sutkowego, a także w określaniu rokowania w przypadku

guzów gruczołu sutkowego i w guzach komórek tucznych u psów (szczegółowe informacje na ten temat dostępne w cytowanej wyżej publikacji). Niedawno opublikowano także badania własne z tego zakresu, mianowicie oceniono przydatność cytomorfometrii w ocenie komórek pobranych ze zmian rozrostowych jam surowiczych oraz pochodzących z niskodróżnicowanych zmian nowotworowych jamy ustnej u psów (4, 5). W pierwszym badaniu porównano wymiary (obwód, średnicę, pole powierzchni oraz krągłość) komórek i jąder komórkowych komórek prawidłowego międzybłonka, międzybłonka odczynowego, międzybłoniaków oraz raków i gruczolakoraków i wykazano znaczne (często istotne statystycznie) różnice dotyczące średniej wartości tych parametrów dla grup zmian, co sugerowało przydatność cytomorfometrii jako metody ułatwiającej różnicowanie pomiędzy tymi zmianami (4). Jednak szczegółowa analiza wykazała, że istnieją znaczne odchylenia od wartości średnich w poszczególnych grupach, a także stwierdzono istotne różnice dla poszczególnych przypadków takich samych zmian w badanych grupach. Innymi słowy, komórki zmian z tym samym rozpoznaniem, ale pochodzące od różnych pacjentów znacznie różniły się od siebie. Podobnie było, gdy porównano wymiary komórek i jąder komórkowych pobranych z niskodróżnicowanych nowotworów jamy ustnej u psów – czerniaków amelanotycznych i niskodróżnicowanych mięsaków (5). Stwierdzono znaczne różnice w wymiarach komórek i jąder komórkowych komórek z tym samym rozpoznaniem, ale pochodzących od różnych pacjentów, a ponadto komórki czerniaków amelanotycznych nie różniły się morfologicznie od komórek mięsaków niskodróżnicowanych. Przykładowy wykres ilustrujący opisane powyżej wyniki zaprezentowano na **ryc. 21**.

### Podsumowanie

Istnieje wiele działań, które mogą wydatnie zwiększyć skuteczność badania cytologicznego w rozpoznawaniu nowotworów u zwierząt. Z obserwacji własnych wynika, że w wielu przypadkach osiągnięcie założonego celu można uzyskać, stosując proste czynności, które wymagają jedynie poprawnego stosowania zalecanych procedur, takich jak precyzyjne wypełnienie skierowania lub poprawienie techniki pobierania materiału i wykonywania rozmazów. Istnieją także dodatkowe procedury, takie jak specjalne techniki wykonywania rozmazów, barwienia dodatkowe wykonywane na preparatach już raz użytych do analizy cytologicznej, które wymagają jedynie nieznanego nakładu



**Ryc. 21.** Wykres prezentujący wartości średniej powierzchni jąder komórkowych (NA-nuclear area, mierzony w  $\mu\text{m}^2$ ) komórek dla poszczególnych przypadków niskodróżnicowanych nowotworów jamy ustnej u psów (u pacjentów 1–12 rozpoznano czerniaka amelanotycznego, a u pacjentów 13–19 rozpoznano niskodróżnicowanego mięsaka). Wykres wskazuje, że pola powierzchni jąder komórek nowotworowych czerniaków różnią się znacznie w zależności od przypadku. Ponadto wskazuje, że pola powierzchni jąder komórek niskodróżnicowanych mięsaków nie różnią się od pól powierzchni jąder komórek czerniaków. Wartości przedstawiono jako średnią wraz z przedziałem ufności (Wykres pochodzi z pracy: Przeździecki R., Sapieryński R.: Ocena morfometryczna niskodróżnicowanych nowotworów jamy ustnej u psów. *Życie Wet.* 2015, **90**, 806–810)



finansowego lub czasowego, jednak pozwalają uniknąć konieczności pobierania dodatkowych próbek do badań.

## Piśmiennictwo

1. Sapierzyński R., Czopowicz M., Ostrzeszewicz M.: Factors affecting the diagnostic utility of canine and feline cytological samples. *J. Small Anim. Pract.* 2016, doi: 10.1111/jsap.12598.
2. Marcos R., Santos M., Santos N., Malhao F., Ferreira F., Montiero R.A.F., Rocha E.: Use of destained cytology slides for the application of routine special stains. *Vet. Clin. Pathol.* 2009, **38**, 94–202.
3. Przeździecki R., Czopowicz M., Sapierzyński 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.
4. Przeździecki R., Czopowicz M., Sapierzyński R.: Cytomorphometry of serosal effusion in dogs. *Pol. J. Vet. Sci.* 2015, **18**, 481–487.
5. Przeździecki R., Sapierzyński R.: Ocena morfometryczna niskozróżnicowanych nowotworów jamy ustnej u psów. *Życie Wet.* 2015, **90**, 806–810.
6. Przeździecki R., Sapierzyński R.: Using of immunocytochemistry in differential diagnosis of neoplasms of serosal cavities in dogs. *Pol. J. Vet. Sci.* 2014, **17**, 149–159.
7. Gong Y., Joseph T., Sneige N.: Validation of commonly used immunostains on cell-transferred cytologic specimen. *Cancer* 2005, **105**, 158–164.
8. Stone B.M., Gan D.: Application of the tissue transfer techniques in veterinary cytopathology. *Vet. Clin. Pathol.* 2014, **43**, 295–302.
9. Przeździecki R., Sapierzyński R.: Zastosowanie cytomorfometrii w onkologii weterynaryjnej. *Życie Wet.* 2013, **88**, 633–636.

Dr hab. Rafał Sapierzyński, prof. nadzw. SGGW;  
e-mail: sapie@wp.pl