



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Diana Elżbieta Stopka

Diagnostyczne i prognostyczne zastosowanie
badania cytomorfometrycznego
w wybranych nowotworach u psów

Diagnostic and prognostic value of cytomorphometric analysis
in selected canine tumors

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Rafała Sapieryńskiego

Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Warszawa rok 2025

**Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej
przygotowanej przez doktoranta Szkoły Doktorskiej SGGW**

Oświadczam, że **rozprawa doktorska autorstwa Diany Stopki została przygotowana pod moim kierunkiem na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW** i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 25.08.2025..... Czytelny podpis promotora Piotr Sępczyński

**Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej
będącego doktorantem Szkoły Doktorskiej SGGW**

Świadoma odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że **niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW** i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 24.09.2025..... Czytelny podpis autora rozprawy Diana Stopka

Spis treści

Wyjaśnienie najważniejszych skrótów użytych w pracy	15
1. Streszczenie/Summary	17
2. Wstęp	19
2.1. Rozpoznawanie i rokowanie w przebiegu procesów patologicznych analizowanych w pracy własnej	19
2.1.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej	19
2.1.2. Chłoniaki	29
2.1.3. Guz z komórek tłuszczowych	32
2.2. Cytomorfometria	36
3. Zastosowanie cytomorfometrii w onkologii weterynaryjnej – przegląd literatury	39
3.1. Przegląd literatury o innych typach nowotworów u psów	39
3.1.1. Nowotwory gruczołu sutkowego u suk	39
3.1.2. Nowotwory tkanek miękkich – mięsaki	41
3.1.3. Nowotwory skóry i przydatków	42
3.1.3.1. Nowotwory skóry	42
3.1.3.2. Nowotwory okolicy odbytu	43
3.1.3.3. Inne nowotwory przydatków skóry	44
3.1.4. Inne zmiany nowotworowe u psów	45
3.2. Zastosowanie cytomorfometrii w nowotworach uwzględnionych w badaniach własnych	46
3.2.1. Zastosowanie cytomorfometrii w chłoniakach u psów	46
3.2.1.1. Ocena wartości diagnostycznej i prognostycznej ..	46
3.2.2. Zastosowanie cytomorfometrii w guzach z komórek tłuszczowych u psów	48
3.2.2.1. Ocena przydatności diagnostycznej	48
3.2.2.2. Ocena wartości prognostycznej	50
3.2.3. Zastosowanie cytomorfometrii w zmianach rozrostowych jamy nosowej u psów	52
3.3. Podsumowanie	52
4. Cele, zakres pracy i hipotezy badawcze	54
4.1. Cele pracy	54

4.2. Zakres pracy	54
4.3. Hipotezy badawcze.....	55
5. Materiały i metodyka badań.....	56
5.1. Pacjenci w grupach badanych	56
5.2. Materiał badany i procedura pobrania materiału.....	56
5.2.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej.....	57
5.2.2. Chłoniaki centroblastyczne	57
5.2.3. Chłoniaki T-komórkowe wielopostaciowe mieszane	58
5.2.4. Guzy z komórek tucznych.....	58
5.3. Barwienia preparatów cytologicznych	59
5.3.1. Barwienie metodą Giemsy	59
5.3.2. Barwienie błękitem toluidyny	59
5.3.3. Barwienie immunocytochemiczne	59
5.4. Barwienia histopatologiczne	60
5.4.1. Przygotowanie preparatów parafinowych	60
5.4.2. Barwienie hematoksyliną i eozyną.....	61
5.4.3. Barwienie błękitem toluidyny	62
5.4.4. Barwienie metodą PAS	62
5.5. Ocena mikroskopowa i kryteria rozpoznania.....	62
5.5.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej.....	62
5.5.2. Chłoniaki	65
5.5.3. Guz z komórek tucznych.....	68
5.6. Podział pacjentów na grupy badane	73
5.6.1. Psy ze zmianami rozrostowymi w jamie nosowej	73
5.6.2. Psy z chłoniakiem centroblastycznym	73
5.6.3. Psy z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym	73
5.6.4. Psy z guzem z komórek tucznych	74
5.7. Badania cytomorfometryczne	74
5.7.1. Analizowane parametry cytomorfometryczne	76
5.7.1.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej.....	76
5.7.1.2. Chłoniak centroblastyczny	77
5.7.1.3. Chłoniak T- komórkowy wielopostaciowy mieszany.....	79

5.7.1.4. Guz z komórek tucznych	79
5.8. Analiza statystyczna	80
5.8.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej	80
5.8.2. Chłoniaki i guzy z komórek tucznych	81
6. Wyniki	83
6.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej	83
6.1.1. Charakterystyka badanych grup psów z rozrostem w jamie nosowej	83
6.1.2. Analiza cytomorfometryczna.....	83
6.2. Chłoniak centroblastyczny.....	89
6.2.1. Charakterystyka badanych psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym	89
6.2.2. Analiza związku parametrów cytomorfometrycznych z całkowitym czasem przeżycia psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym	89
6.2.3. Analiza różnic w długości całkowitego czasu przeżycia pomiędzy grupami psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym	94
6.3. Chłoniak T-komórkowy wielopostaciowy mieszany	101
6.3.1. Charakterystyka badanych grup psów z chłoniakiem T- komórkowym wielopostaciowym mieszanym.....	101
6.3.2. Oceniane parametry cytomorfometryczne.....	102
6.3.3. Analiza związku parametrów cytomorfometrycznych z całkowitym czasem przeżycia w grupie psów z chłoniakiem T- komórkowym wielopostaciowym mieszanym leczonych chemioterapią.....	104
6.4. Guz z komórek tucznych	108
6.4.1. Charakterystyka badanych grup psów z guzem z komórek tucznych o niskiej złośliwości histologicznej	108
6.4.2. Oceniane parametry morfometryczne.....	109
6.4.3. Zależność między pomiarami cytomorfometrycznymi a obecnością przerzutów guza z komórek tucznych o niskim stopniu złośliwości histologicznej	109

6.4.4. Trafność diagnostyczna wybranych parametrów jądra komórkowego	115
7. Dyskusja	118
7.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej.....	118
7.1.1. Charakterystyka demograficzna	118
7.1.2. Analiza cytomorfometryczna	119
7.2. Chłoniaki	122
7.2.1. Chłoniak centroblastyczny	122
7.2.1.1. Charakterystyka demograficzna	122
7.2.1.2. Pomiary cytomorfometryczne	123
7.2.1.3. Parametry cytomorfometryczne a całkowity czas przeżycia.....	125
7.2.2. Chłoniak T-komórkowy wielopostaciowy mieszany	127
7.2.2.1. Charakterystyka demograficzna	127
7.2.2.2. Pomiary cytomorfometryczne	127
7.2.2.3. Parametry cytomorfometryczne a całkowity czas przeżycia psów	128
7.3. Guz z komórek tucznych.....	129
7.3.1. Charakterystyka demograficzna	129
7.3.2. Parametry cytomorfometryczne i porównanie między grupami	130
7.3.3. Trafność diagnostyczna cytomorfometrii.....	132
7.4. Ograniczenia i wartość badań własnych	133
8. Podsumowanie	137
9. Wnioski	139
10. Bibliografia.....	140
11. Aneks.....	156

Spis rycin

Rycina 1. Pies rasy maltańczyk z przewlekłym zaostrzonym zapaleniem plazmocytarnym – widoczny wypływ z nosa	19
Rycina 2. Pies rasy golden retriever z rakiem jamy nosowej, widoczna jest deformacją twarzoczaszki i jednostronne krwawienie z nozdrza prawego.....	20

Rycina 3. Obraz cytologiczny niespecyficznego zapalenia błony śluzowej nosa u psa - obecność skupiska nienowotworowych komórek nabłonkowych z anizokariozą umiarkowanego stopnia. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x25

Rycina 4. Obraz cytologiczny grzybiczego zapalenia błony śluzowej nosa u psa - obecność skupisk nienowotworowych komórek nabłonka z anizokariozą umiarkowanego stopnia, strzępki grzybów nie są widoczne w tym obrazie (ostateczne rozpoznanie postawiono na podstawie badania histopatologicznego). Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x26

Rycina 5. Obraz cytologiczny przedstawiający grzybnię na powierzchni błony śluzowej jamy nosowej u psa – widoczne liczne, cienkie, nitkowate strzępki grzybów. Barwienie metodą Pas. Powiększenie 400x.....27

Rycina 6. Obraz cytologiczny gruczolakoraka nosa u psa - obecność skupisk nowotworowych komórek nabłonkowych z anizokariozą łagodnego do umiarkowanego stopnia i widocznymi jąderkami. Małe skupisko prawidłowych walcowatych komórek nabłonka rzęskowego jest widoczne w prawym górnym rogu (czarna strzałka). Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x28

Rycina 7. Obraz kliniczny psa boksera z chłoniakiem wieloogniskowym – widoczny powiększony węzeł chłonny podżuchwowy lewy (czarna strzałka), w badaniu cytologicznym rozpoznania chłoniaka centroblastycznego wielopostaciowego ..30

Rycina 8. Mastocytoma niskiego stopnia złośliwości histologicznej u boksera – w okolicy pośladkowej prawej widoczny pozbawiony włosa guz o zrogowaciałej, zaschniętej powierzchni33

Rycina 9. Obraz histopatologiczny wycinka błony śluzowej jamy nosowej psa z zapaleniem grzybiczym – widoczny naciek komórkowy, głównie neutrofilowy oraz grzybnia wybarwiona na czerwony kolor (czarna strzałka). Barwienie hematoksyliną i eozyną. Powiększenie 100x63

Rycina 10. Obraz histopatologiczny błony śluzowej jamy nosowej psa z nieswoistym zapaleniem limfocytarno-plazmocytnym – widoczny masywny naciek utworzony z limfocytów oraz plazmocytnych. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Powiększenie 100x64

Rycina 11. Obraz histopatologiczny wycinka zmiany guzowatej małżowin nosowych pobranego w czasie rynoskopii od psa, w badaniu mikroskopowym rozpoznano gruczolakoraka – widoczna proliferacja komórek nisko zróżnicowanego nowotworu (czarna strzałka). Barwienie hematoksylina i eozyna. Powiększenie 200x 65

Rycina 12. Obraz cytologiczny chłoniaka centroblastycznego wielopostaciowego u psa, materiał pobrano z powiększonego węzła chłonnego – widoczne duże blastyczne komórki limfoidalne z dużymi okrągłymi jądrami komórkowymi i licznymi, wyraźnymi jąderkami. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x 66

Rycina 13. Obraz cytologiczny chłoniaka T-komórkowego wielopostaciowego mieszanego u psa, materiał pobrano z powiększonego węzła chłonnego – widoczne komórki o różnej wielkości, z dużym lub małym jądrem komórkowym o nieregularnym zarysie i niewielką ilością cytoplazmy.

Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x 67

Rycina 14. Obraz cytologiczny guza z komórek tucznych I stopnia złośliwości cytologicznej u psa –obecność komórek o wyglądzie komórek tucznych, z widocznymi okrągłymi jądrami komórkowymi o jednakowej wielkości i obfitą cytoplazmą z równomiernie rozmieszczonymi zasadochłonnymi ziarnistościami cytoplazmatycznymi. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x 68

Rycina 15. Obraz cytologiczny guza z komórek tucznych I/II stopnia złośliwości cytologicznej u psa – widoczne komórki o morfologii mastocytów z okrągłymi jądrami komórkowymi z widoczną anizokariozą o łagodnym nasileniu, w cytoplazmie mniej liczne ziarnistości cytoplazmatyczne.

Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x 69

Rycina 16. Obraz histopatologiczny guza z komórek tucznych o niskim stopniu złośliwości histologicznej według skali Kiupel (low grade) u psa – widoczne skupiska okrągłych do owalnych komórek z zasadochłonnymi, okrągłymi i centralnie położonymi jądrami komórkowymi oraz obfitą i kwasochłonną cytoplazmą. Barwienie hematoksylina i eozyna. Powiększenie 400x..... 70

Rycina 17. Obraz cytologiczny węzła chłonnego z przerzutem guza z komórek tucznych I stopnia złośliwości cytologicznej do regionalnego węzła chłonnego u psa – widoczne

liczne nowotworowe komórki tuczne rozproszone wśród komórek limfoidalnych węzła chłonnego. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 400x 71

Rycina 18. Obraz histopatologiczny węzła chłonnego z przerzutem guza z komórek tucznych I stopnia złośliwości cytologicznej do regionalnego węzła chłonnego u psa – widoczne komórki z silnie wybarwionymi na kolor granatowy ziarnistościami cytoplazmatycznymi. Barwienie błękitem toluidyny. Powiększenie 200x 72

Rycina 19. Rozmaz cytologiczny chłoniaka centroblastycznego wielopostaciowego z dobrze widocznymi komórkami.

Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 400x 75

Rycina 20. Obraz cytologiczny chłoniaka T-komórkowego wielopostaciowego mieszanego z dużą ilością artefaktów – komórki ułożone gęsto, nachodzące na siebie. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 400x 75

Rycina 21. Zrzut ekranu programu cellSens Life Science do analizy cytomorfometrycznej 76

Rycina 22. Schemat wykonywanych pomiarów cytomorfometrycznych 77

Rycina 23. Schemat wykonywanych zaznaczeń na przykładzie komórki chłoniaka centroblastycznego wielopostaciowego. Ręczne obrysowanie konturów komórki (kolor zielony) oraz jądra komórkowego (kolor biały) pozwoliło na automatyczny pomiar wybranych parametrów 78

Rycina 24. Średnia szerokość jądra komórkowego (MNW) w trzech grupach diagnostycznych. Przedstawiono średnią arytmetyczną, 95% przedział ufności (CI 95%). Gwiazdka (*) oznacza istotną różnicę w porównaniach parami 85

Rycina 25. Rozkład szerokości jąder komórkowych na podstawie 50 pomiarów wykonanych u każdego psa. Przedstawiono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe i zakres 85

Rycina 26. Średnia średnica jądra komórkowego (MND) w trzech grupach diagnostycznych. Przedstawiono średnią arytmetyczną, 95% przedział ufności (CI 95%). Gwiazdka (*) oznacza istotną różnicę w porównaniach parami 86

- Rycina 27. Rozkład średnicy jąder komórkowych na podstawie 50 pomiarów wykonanych u każdego psa. Przedstawiono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe i zakres 87
- Rycina 28. Średnia pola powierzchni jądra komórkowego (MNA) w trzech grupach diagnostycznych. Przedstawiono średnią arytmetyczną, 95% przedział ufności (CI 95%). Gwiazdka (*) oznacza istotną różnicę w porównaniach parami 88
- Rycina 29. Rozkład pola powierzchni jąder komórkowych na podstawie 50 pomiarów wykonanych u każdego psa. Przedstawiono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe i zakres 88
- Rycina 30. Wykres rozrzutu pomiędzy całkowitym czasem przeżycia psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym a zmiennością wypukłości jądra komórkowego..... 94
- Rycina 31. Zmienność wypukłości jądra komórkowego w grupach psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym różniących się całkowitym czasem przeżycia..... 95
- Rycina 32. Wykres rozrzutu pomiędzy całkowitym czasem przeżycia psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym poddanych chemioterapii a parametrami wypukłości komórki dla średniej wartości wypukłości komórki. Każdy punkt odpowiada wartości uzyskanej dla pojedynczego pacjenta 107
- Rycina 33. Wykres rozrzutu pomiędzy całkowitym czasem przeżycia psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym poddanych chemioterapii a parametrami wypukłości komórki dla zmienności wypukłości komórki. Każdy punkt odpowiada wartości uzyskanej dla pojedynczego pacjenta..... 108
- Rycina 34. Rozkład wartości dla pola powierzchni jądra komórkowego w obu badanych grupach psów z MCT o niskiej złośliwości histologicznej. Pomarańczowa przerywana linia oznacza punkt optymalny punkt odcięcia (9.8µm; optymalna wartość graniczną) 114

Rycina 35. Rozkład wartości dla średnicy jądra komórkowego w obu badanych grupach psów z MCT o niskiej złośliwości histologicznej. Pomarańczowa przerywana linia oznacza punkt optymalny punkt odcięcia

(9.8µm; optymalna wartość graniczną)..... 114

Rycina 36. Rozkład wartości dla obwodu jądra komórkowego w obu badanych grupach psów z MCT o niskiej złośliwości histologicznej. Pomarańczowa przerywana linia oznacza punkt optymalny punkt odcięcia

(9.8µm; optymalna wartość graniczną)..... 115

Rycina 37. Krzywe ROC dla wybranych parametrów jądra komórkowego (poła powierzchni, średniej średnicy, obwodu) komórek mastocytozy o niskiej złośliwości histologicznej u psów. Analizowane parametry charakteryzowały się wysoką czułością i swoistością (wszystkie krzywe ROC przebiegały blisko górnego rogu wykresu)..... 116

Rycina 38. Rozkład średnich wartości średnicy jądra komórkowego w obu grupach psów z guzem z komórek tłuszczowych o niskiej złośliwości histologicznej. Pomarańczowa przerywana linia oznacza punkt optymalny punkt odcięcia (9.8µm; optymalna wartość graniczna)..... 117

Spis tabel

Tabela 1. Charakterystyka demograficzna badanych psów z rozrostem w jamie nosowej 83

Tabela 2. Ilość badanych psów z rozrostem w jamie nosowej oraz uzyskanych pomiarów cytomorfometrycznych wraz z wynikami 84

Tabela 3. Charakterystyka demograficzna badanych psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym 89

Tabela 4. Średnie wartości i zmienność parametrów cytomorfometrycznych wyrażona jako mediana, zakres międzykwartylowy i zakres oraz korelacja z całkowitym czasem przeżycia u psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym..... 90

Tabela 5. Wyniki pomiarów cytomorfometrycznych w trzech grupach psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym o różnym czasie przeżycia 95

Tabela 6. Charakterystyka demograficzna badanych psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym	102
Tabela 7. Całkowite czasy przeżycia w badanych grupach psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym, w zależności od zastosowanego leczenia	102
Tabela 8. Średnie wartości i zmienność parametrów cytomorfometrycznych u psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym wyrażona jako mediana, zakres międzykwartyłowy i zakres	103
Tabela 9. Związek między pomiarami cytomorfometrycznymi a całkowitym czasem przeżycia w grupie psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym leczonych chemioterapią	105
Tabela 10. Charakterystyka demograficzna badanych psów z guzem z komórek tucznych o niskim stopniu złośliwości histologicznej	109
Tabela 11. Porównanie pomiarów cytomorfometrycznych między badanymi grupami psów z guzem z komórek tucznych o niskim stopniu złośliwości histologicznej	110
Tabela 12. Trafność wybranych parametrów cytomorfometrycznych w odróżnianiu psów z guzem z komórek tucznych o niskim stopniu złośliwości histologicznej z przerzutami i bez przerzutów	116

Wyjaśnienie najważniejszych skrótów użytych w pracy

Skrót	Rozwinięcie po angielsku	Rozwinięcie po polsku
MNA	Mean nuclear area	Średnia pola powierzchni jądra
NA	Nuclear area	Pole powierzchni jądra
MNP	Mean nuclear perimeter	Średnia obwodu jądra
MND	Mean nuclear diameter	Średnia średnica jądra
Dmean	Diameter mean	Średnia średnica
Dmax	Diameter maximum	Średnica maksymalna
Dmin	Diameter minimum	Średnica minimalna
MNR	Mean nuclear radius	Średni promień jądra
Rmean	Radius mean	Średni promień
Rmax	Radius maximum	Promień maksymalny
Rmin	Radius minimum	Promień minimalny
NR	Nuclear roudness	Okrągłość jądra
MNW	Mean nuclear width	Średnia szerokość jądra
MNL	Mean nuclear length	Średnia długość jądra
N/C ratio	Nuclear to cytoplasm ratio	Stosunek powierzchni jądra do cytoplazmy/stosunek jądrocytoplazmatyczny
HE	Hematoxylin and eosin	Barwienie hematoksyliny i eozyna
MCT	Mast cell tumor	Guz z komórek tucznych/mastocytoma

1. Streszczenie/Summary

In recent years, computer-assisted tools have been increasingly used in veterinary pathology to support the diagnosis of neoplastic diseases through the analysis of digital microscopic images. One such method is cytomorphometry. This technique employs digital images to analyze cellular structures present in slides obtained during routine cytological examinations. It enables both quantitative assessment (number and size of structures) and qualitative evaluation (e.g., shape), thus allowing the detection of differences not visible in standard cytological evaluation. In clinical practice, dogs are frequently diagnosed with chronic nasal diseases such as a non-specific rhinitis, fungal infections, and malignant epithelial tumors, as well as hematopoietic neoplasms such as centroblastic lymphoma and pleomorphic mixed T-cell lymphoma, and cutaneous neoplasms such as mast cell tumors. These conditions represent a significant diagnostic and prognostic challenge.

The aim of this dissertation was to assess the usefulness of cytomorphometric analysis as a tool supporting diagnosis and prognosis in selected canine neoplasms. The study focused on evaluating the value of this method in differentiating non-neoplastic from malignant epithelial lesions of nasal cavity, in survival analysis of dogs with centroblastic lymphoma and pleomorphic mixed T-cell lymphoma undergoing chemotherapy, and in assessing the risk of metastasis of low-grade mast cell tumors (according to Kiupel) to regional lymph nodes. The study material consisted of cytological and histopathological samples collected from dogs with the above-mentioned conditions, obtained during routine diagnostic and therapeutic procedures. Cytological samples from the nasal cavity were collected during endoscopic examination (swabs for cytology and biopsy for histopathology). In lymphoma cases, material was obtained by non-aspiration free-needle biopsy from enlarged lymph nodes and internal organs. Immunophenotype was determined using immunocytochemistry with anti-CD3 and anti-CD79 α antibodies. In mast cell tumors, material was collected by fine-needle aspiration biopsy from cutaneous masses. Cytological samples were stained with Giemsa, while histopathological samples were routinely stained with hematoxylin and eosin, with additional special stains (toluidine blue, PAS) applied when necessary. Microscopic analyses were performed using an Olympus BX41 light microscope equipped with a digital camera and cellSens Life Science v1.12 software. For cytomorphometric evaluation, only well-preserved cells with clearly visible nuclear

and cytoplasmic borders were selected. Depending on the disease entity, 50 to 100 cells were analyzed per patient. Statistical analyses were performed using TIBCO Statistica v13.3.0 software, applying appropriate parametric and non-parametric tests and ROC analysis, with significance set at $p < 0,05$.

In nasal cavity diseases, nuclei of epithelial cells from dogs with non-specific rhinitis were significantly larger than those from dogs with fungal rhinitis. Significant differences were found in nuclear width ($p = 0,017$), diameter ($p = 0,009$), and area ($p = 0,047$). No differences were observed between malignant epithelial tumors and inflammatory conditions. In centroblastic lymphoma and pleomorphic mixed T-cell lymphoma, no statistically significant correlations were identified between cytomorphometric parameters and survival time in dogs undergoing chemotherapy. In contrast, in low-grade mast cell tumor, significant differences were observed in mean nuclear area, diameter, and perimeter ($p < 0,05$), which were greater in dogs with regional lymph node metastases compared to those without metastases. Their parameters showed high diagnostic accuracy.

The present findings demonstrate that cytomorphometry of cell nuclei may support the differentiation of non-specific and fungal rhinitis in dogs, although its value in distinguishing inflammatory changes from malignant epithelial tumors is limited. No prognostic value was confirmed for cytomorphometry in lymphomas. In low-grade mast cell tumors, larger nuclear dimensions in dogs with metastases suggest the potential usefulness of this method in confirming their presence.

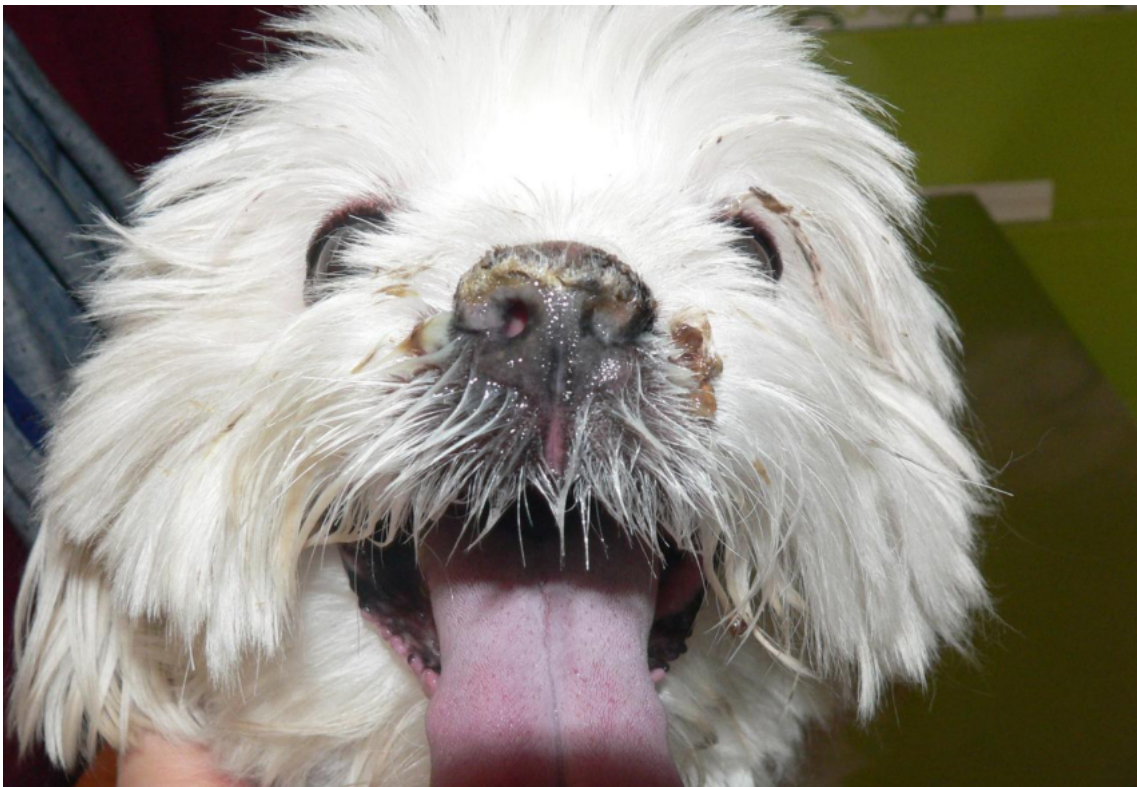
Keywords: cytomorphometry, dog, nasal cavity, lymphoma, mastocytoma

2. Wstęp

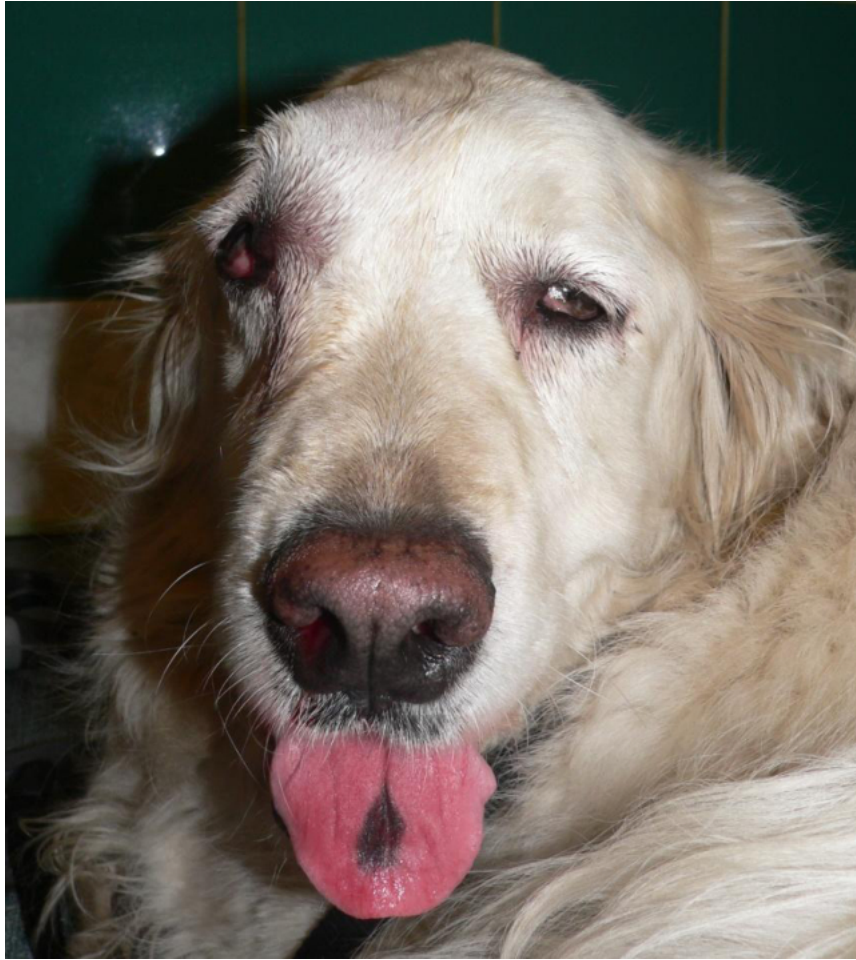
2.1. Rozpoznawanie i rokowanie w przebiegu procesów patologicznych analizowanych w pracy własnej

2.1.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej

Choroby jamy nosowej należą do częstych problemów zdrowotnych rozpoznawanych u psów. Pomimo zróżnicowanej etiologii, zwykle przejawiają się one podobnym obrazem klinicznym, obejmującym kichanie, kaszel, wypływ surowiczo-ropny (ryc. 1), a w przypadkach zaawansowanych lub przewlekłych często przebiegają z deformacją twarzoczaszki lub krwawieniem z nosa (ryc. 2) (Callan, 2004; Doust i Sullivan, 2004; Goddard i Rautenbach, 2025; Lobetti, 2009). Wśród przyczyn chorób jamy nosowej u psów najczęściej wymienia się procesy nowotworowe, zapalenia niespecyficzne (limfocytarne, plazmocytarne lub mieszane limfocyтарno-plazmocytarne) oraz zapalenia na tle zakaźnym (grzybiczym, wirusowym lub bakteryjnym) (Goddard i Rautenbach, 2025; Lobetti, 2009; Neittaanmäki i in., 2025; Pietra i in., 2010).



Ryc. 1. Pies rasy maltańczyk z przewlekłym zaostrzonym zapaleniem plazmocyтарnym – widoczny wypływ z nosa



Ryc. 2. Pies rasy golden retriever z rakiem jamy nosowej, widoczna jest deformacją twarzoczaszki i jednostronne krwawienie z nozdrza prawego

Do najczęściej rozpoznawanych nowotworów jamy nosowej u psów należą gruczolakoraki, raki niezróżnicowane oraz rak płaskonabłonkowy, które występują głównie u starszych osobników i wiążą się z niekorzystnym rokowaniem (Goddard i Rautenbach, 2025; Harris i in., 2014; Spuzak i in., 2014; Turkar i in., 2021). Przyczyna zapalenia niespecyficznego jamy nosowej pozostaje nie w pełni poznana, jednak wśród potencjalnych czynników wymienia się podłoże wirusowe i bakteryjne, alergiczne oraz zaburzenia mechanizmów odpowiedzi immunologicznej (Doust i Sullivan, 2004; Windsor i Johnson, 2006). W przypadku zapaleń grzybiczych głównym czynnikiem etiologicznym są zakażenia wywołane przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* sp., jednak w literaturze opisuje się również zapalenia spowodowane przez *Penicilium* sp. (Doust i Sullivan, 2004; Goddard i Rautenbach, 2025), czy *Cryptococcus* sp. (Goddard i Rautenbach, 2025). Rozpoznawanie chorób jamy nosowej często

wymaga zastosowania szeregu uzupełniających się metod (Caniatti i in., 2012; Furtado i Constantino-Casas, 2013; Meler i in., 2008; Ostrzeszewicz i Sapierzyński, 2015) a cały proces diagnostyczny bywa złożony i postawienie jednoznacznego rozpoznania może być trudne, a w części przypadków wręcz niemożliwe. Procedura diagnostyczna rozpoczyna się od zebrania dokładnego wywiadu, uwzględniającego czas trwania objawów, przebieg choroby oraz odpowiedź na dotychczasowe leczenie. Następnie wymaga ona scharakteryzowania objawów klinicznych i podstawowych parametrów laboratoryjnych (Doust i Sullivan, 2004; Turkar i in., 2021). Istotną rolę odgrywają tu także metody obrazowania, w tym badanie rentgenowskie (RTG) głowy, badanie za pomocą tomografii komputerowej (ang. computer tomography, CT), czy badanie rezonansem magnetycznym (Doust i Sullivan, 2004). Kolejnym krokiem jest endoskopowe badanie jamy nosowej (rynoskopia, wzniernikowanie), które umożliwia ocenę zmian morfologicznych w obrębie tej struktury oraz pobranie materiału biopsyjnego do badań dodatkowych (Doust i Sullivan, 2004; Ostrzeszewicz i Sapierzyński, 2015; Sapierzyński i Zmudzka, 2009; Spuzak i in., 2014). Choć badanie kliniczne wspomagane technikami obrazowania, często pozwala na zawężenie rozpoznania różnicowego, to badania laboratoryjne są kluczowe dla ustalenia rzeczywistej przyczyny choroby, co jest niezbędne do zastosowania stosownego leczenia i określenia rokowania.

W przypadku badania mykologicznego, przeprowadzonego na materiale pobranym w odpowiednich, aseptycznych warunkach, pozytywny wynik skorelowany z obrazem klinicznym powinien być uznany za prawdziwie dodatni (Doust i Sullivan, 2004). Czulość badania mykologicznego z materiału pobranego bezpośrednio ze zmiany waha się pomiędzy 40 a 77% (Peeters i Clercx, 2007). W badaniu Meler i in. (2008) na 5 z 7 przypadków zapalenia grzybiczego uzyskano hodowlę patogenu, a zbliżone wyniki odnotował również Lobetti (2009). Należy podkreślić, że dodatni wynik badania mykologicznego można uzyskać także w przypadkach zmian nowotworowych oraz zapalenia niespecyficznego gdzie grzyby są czynnikiem wnikającym (Cagnasso i in., 2021; Rani, 2021), dlatego fakt ten wskazuje na konieczność równoległego wykorzystania innych metod diagnostycznych.

Standardowym badaniem materiału uzyskanego podczas badania endoskopowego jest badanie histopatologiczne, które umożliwia szczegółową ocenę morfologii i układu komórek oraz ich cech (np. ocena stopnia złośliwości, inwazyjności). W zapaleniu niespecyficznym dominują komórki nacieku zapalnego,

przede wszystkim plazmocyty i limfocyty (Lobetti, 2014; Neittaanmäki i in., 2025), w części przypadków można zaobserwować również zmiany rozrostowe nabłonka oraz tkanki łącznej zrębu błony śluzowej, cechy dysplazji, czy metaplazji nabłonka, a także zmiany zanikowe oraz znacznego stopnia uszkodzenie małżowin nosowych (Neittaanmäki i in., 2025). Badanie histopatologiczne jest istotne również ze względu na możliwość wykrycia elementów grzybni, czy bakterii, choć często wymaga to zastosowania dodatkowych barwień histochemicznych (Furtado i Constantino-Casas, 2013). Obraz gruczolakoraka i raka charakteryzuje się obecnością zrazików zbudowanych z komórek nabłonkowych o kolumnowym kształcie, wykazujących pleomorfizm komórkowy i jądrowy, posiadających mniej lub bardziej obfitą cytoplazmę oraz okrągłe lub owalne jądro komórkowe z widocznymi jąderkami (Paaymans, 2017). Mimo niewątpliwej wartości diagnostycznej, badanie histopatologiczne ma również swoje ograniczenia, a w części przypadków postawienie rozpoznania nie jest możliwe (Furtado i Constantino-Casas, 2013; Meler i in., 2008; Windsor i in. 2006).

Chociaż badanie histopatologiczne pozostaje podstawowym badaniem w rozpoznawaniu zmian patologicznych w obrębie jamy nosowej, to istotne znaczenie ma tu także badanie cytologiczne materiału komórkowego pobranego z jamy nosowej. Rozmazy cytologiczne należy oceniać pod kątem obecności bakterii, strzępek grzybni, komórek nowotworowych oraz komórek nacieku zapalnego (Doust i Sullivan, 2004). Jakość i wartość diagnostyczna badania cytologicznego w dużym stopniu zależą od techniki pobrania materiału (Caniatti i in., 2012; De Lorenzi i in., 2006; Doust i Sullivan, 2004). Ocena cytologiczna bezpośrednich rozmazów wydzieliny z jamy nosowej charakteryzuje się bardzo niską czułością. Według De Lorenzi i in. (2006) potwierdzenie rozpoznania zakażenia grzybiczego z materiału pobranego tą metodą uzyskuje się tylko w 13% przypadków. Ponadto, technika ta prowadziła do błędnej diagnozy bakteryjnego zapalenia nosa aż w 86.6% przypadków. Nieznacznie lepsze wyniki uzyskuje się pobierając materiał za pomocą wymazówki bezpośrednio z jamy nosowej, chociaż efekty tej metody kolekcji materiału też nie są zadowalające – wykrycie grzybni w materiale pobranym tą metodą uzyskuje się u 20% pacjentów z grzybiczym zapaleniem nosa (De Lorenzi i in., 2006). Pomimo niskiej skuteczności diagnostycznej metoda bezpośredniego rozmazu z jamy nosowej w praktyce klinicznej wykonywana jest najczęściej. W przeciwieństwie do powyższych metod pobrania materiału, pobranie materiału za pomocą szczyteczki cytologicznej oraz tzw. metoda

squash preparation (ocenie cytologicznej poddaje się preparat, który uzyskano poprzez rozmiażdżenie na szkiełku podstawowym fragmentów tkanek pobranych z jamy nosowej) charakteryzuje się zdecydowanie lepszą skutecznością rozpoznania, osiągając wartości odpowiednio 93,3% i 100% (De Lorenzi i in., 2006). W badaniu Canatti i in. (2012) zgodność między rozpoznaniem cytologicznym w przypadku różnicowania zmian nowotworowych i nienowotworowych materiału pobranego za pomocą szczoteczki cytologicznej a wynikiem histopatologicznym wynosiła około 86%. Jedynie 3,6% próbek pobranych za pomocą szczoteczki uznano za nieprzydatne, a metoda okazała się dobrze tolerowana i wysoce bezpieczna dla pacjentów. Metoda szczoteczkowa wykazała wyjątkowo wysoką czułość w wykluczaniu nowotworu, potwierdzoną odsetkiem 98,7% przypadków prawdziwie ujemnych. Z kolei, czułość tej metody w wykrywaniu poszczególnych typów nowotworów wynosiła ponad 70% dla nowotworów pochodzenia nabłonkowego, 72,2% dla nowotworów mezenchymalnych i 66,6% dla nowotworów okrągłokomórkowych. Praca Canatti i in. (2012) potwierdziła, że badanie cytologiczne materiału pobranego za pomocą szczoteczki cytologicznej jest metodą czułą, a zarazem tanią, szybką i bezpieczną dla pacjentów.

Badanie cytologiczne jest obarczone błędami i ograniczeniami, a uzyskane wyniki nie muszą odzwierciedlać rzeczywistego obrazu. W przebiegu nasilonego stanu zapalnego pod wpływem cytokin uwalnianych przez komórki nacieku zapalnego komórki nabłonka mogą ulegać zmianom adaptacyjnym, takim jak hiperplazja i dysplazja, co nadaje im cechy morfologiczne zbliżone do tych obserwowanych w komórkach nowotworowych. Dysplazja, przejawiająca się, m.in. utratą prawidłowej architektoniki tkankowej i anizocytozą oraz hiperplazją (polegającą na zwiększeniu liczby komórek), stanowi mechanizm obronny nabłonka, w odpowiedzi na przewlekły stan zapalny. Im silniejsza odpowiedź adaptacyjna na zapalenie, tym bardziej nasilone stają się zmiany morfologiczne. W konsekwencji intensywna, szczególnie przewlekła reakcja zapalna generuje znaczną atypię komórkową, która bywa trudna, a wręcz niemożliwa do odróżnienia od atypii nowotworowej, co może tłumaczyć błędne rozpoznania cytologiczne (Doust i Sullivan, 2004; Dunn, 2014; Goddard i Rautenbach, 2025). Przykładowo, w badaniu Ostrzeszewicz i Sapieryński (2015), w którym wykonano badanie cytologiczne wymazów z nosa u ośmiu psów z zapaleniem grzybiczym, u połowy badanych psów stwierdzono atypię komórek

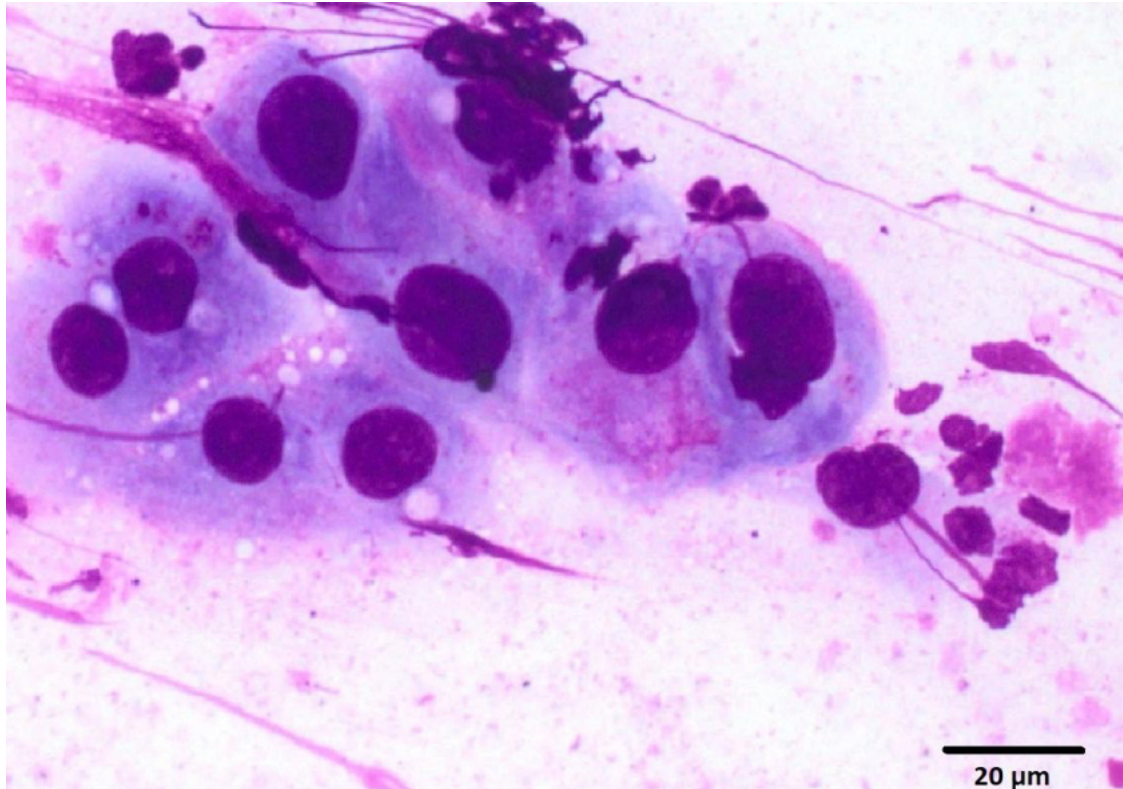
nabłonkowych, a w dwóch przypadkach była ona na tyle silnie wyrażona, że sugerowała obecność zmiany nowotworowej (gruczolakoraka lub raka).

Trudności i błędy w rozpoznawaniu nowotworów, a zwłaszcza raków jamy nosowej, wynikają często z rzadko obserwowanych cech typowych dla nowotworów, takich jak zwiększona liczba mitoz i zwiększony stosunek jądro-cytoplazmatyczny. Problemem jest również fakt, że rozpoznawanie opiera się głównie na ocenie liczby komórek nabłonka i ich cech morfologicznych. Raki jamy nosowej mają tendencję do naciekania, powodowania owrzodzeń, czemu towarzyszy obecność nasilonego stanu zapalnego. Im silniejsze owrzodzenie, tym więcej komórek zapalnych dominuje w obrazie cytologicznym, maskując obecność komórek nowotworowych (Meuten i in., 2005; Turkar i in., 2021).

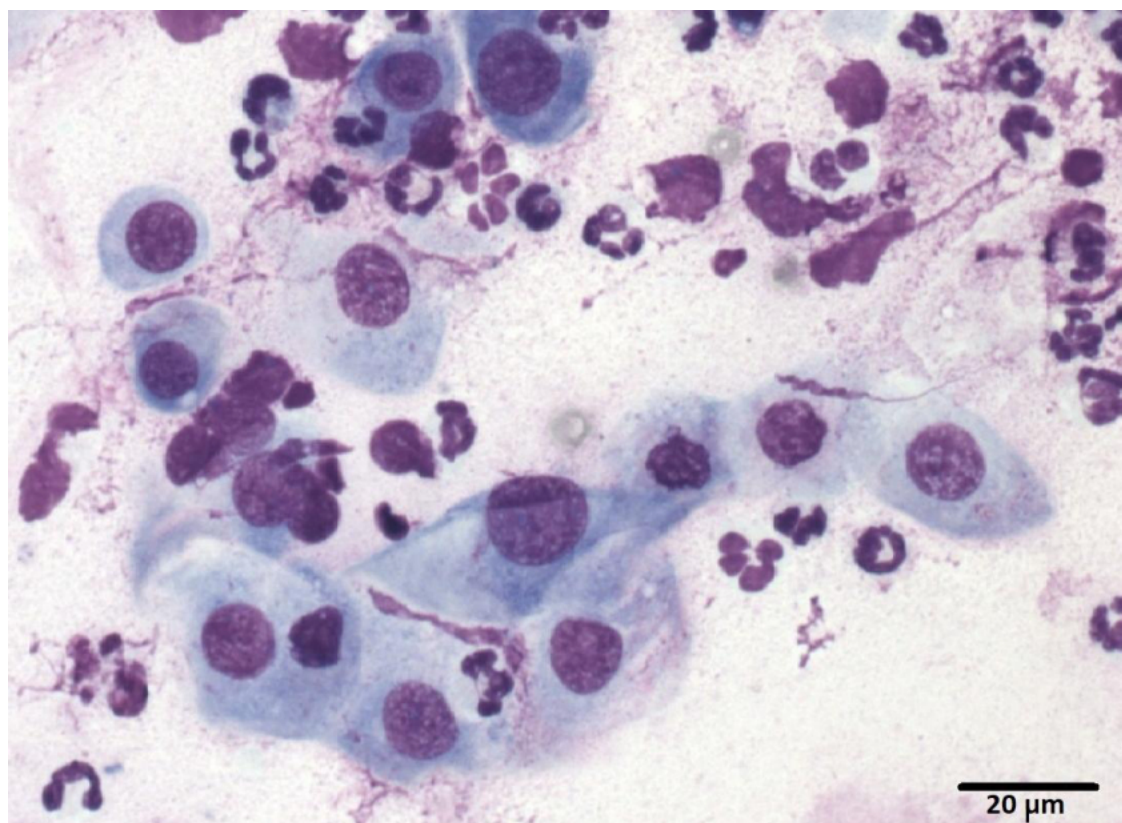
W badaniu Caniatti i in. (2012) odnotowano 18 przypadków fałszywie ujemnych, co stanowiło 19,4% preparatów cytologicznych ocenionych jako przypadki nienowotworowe, które w badaniu histopatologicznym okazały się nowotworami złośliwymi. Obraz cytologiczny wskazywał jedynie zmiany zapalne, takie jak nacieki neutrofilowy lub eozynofilowy oraz zmiany rozrostowe nabłonka. Podobne obserwacje opisano w badaniu Meler i in. (2008), gdzie w części przypadków obraz cytologiczny był całkowicie zdominowany przez nacieki zapalne i nie ujawnił obecności komórek nowotworowych, podczas gdy badanie histopatologiczne potwierdziło złośliwy nowotwór nabłonkowy.

Publikacje dotyczące nowych metod diagnostycznych rozpoznawania chorób jamy nosowej u psów lub udoskonałych technik już stosowanych pojawiają się stosunkowo rzadko w literaturze weterynaryjnej. Dostępne najnowsze doniesienia literaturowe koncentrują się m.in. na ocenie parametrów krwi, markerów surowiczych i nowotworowych (Rösch i in., 2024a, 2024b, 2025) oraz zastosowaniu metod w oparciu o techniki PCR (Biénès i in., 2022). Podejmowane są także próby optymalizacji metod obrazowych opartych na badaniu CT (Istrate i in., 2025). Bez względu na powyższe, badanie histopatologiczne wciąż pozostaje złotym standardem w ocenie zmian rozrostowych w jamie nosowej u psów (Ostrzeszewicz i Sapieryński, 2010). Metoda ta jest jednak inwazyjna, czasochłonna i wiąże się ze stosunkowo wysokimi kosztami dla opiekuna zwierzęcia. Istotnym zatem jest opracowanie i wdrażanie metod, które pozwolą na szybszą, tańszą i mniej inwazyjną diagnostykę lub będą stanowiły wsparcie dla procedur tradycyjnych. Do takich badań zaliczyć można, min. techniki oparte na komputerowej analizie cyfrowego obrazu,

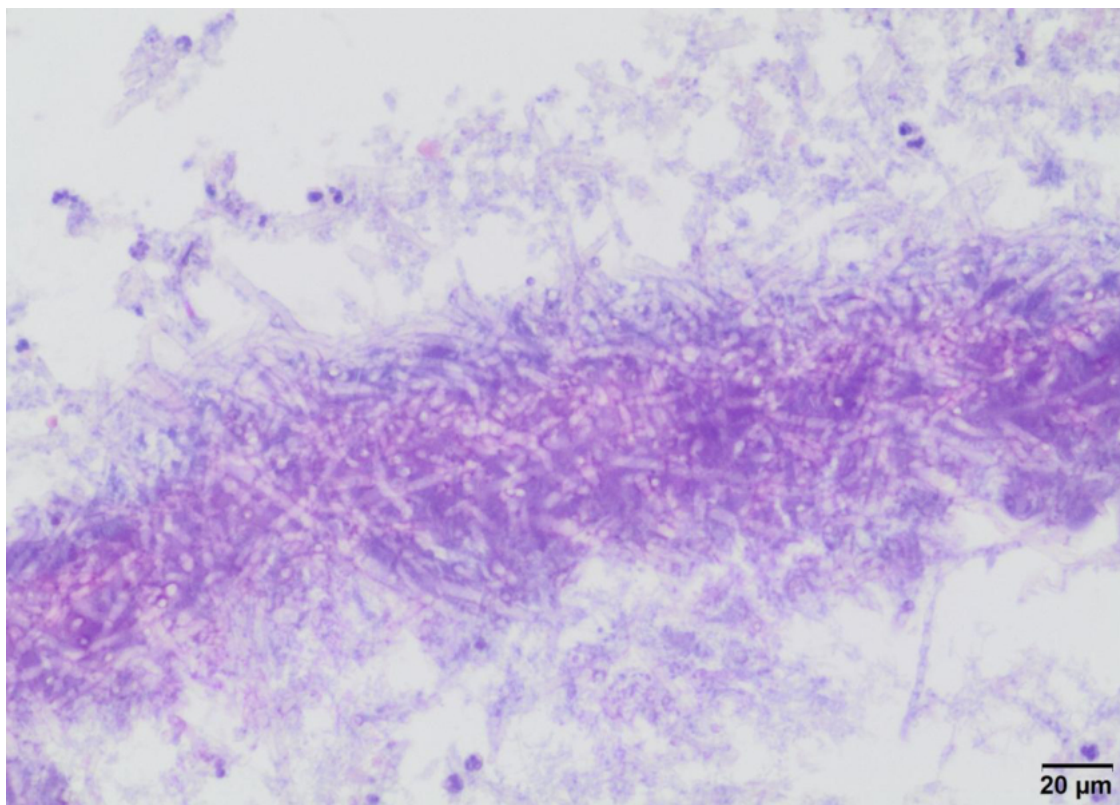
dostarczające obiektywnych i łatwych do uzyskania danych. Włączenie nowych narzędzi pozwoliłoby na uzupełnienie aktualnej diagnostyki o dodatkowe informacje umożliwiające trafne i szybkie rozpoznanie.



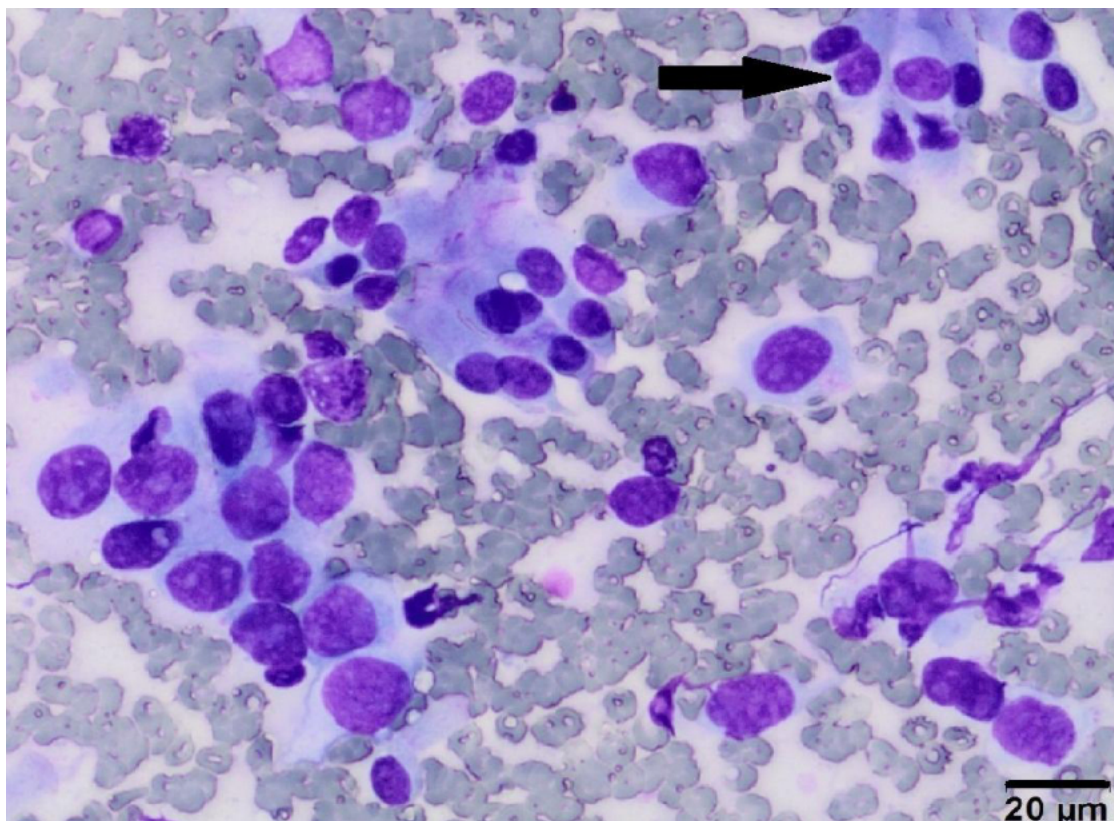
Ryc. 3. Obraz cytologiczny niespecyficznego zapalenia błony śluzowej nosa u psa - obecność skupiska nienowotworowych komórek nabłonkowych z anizokariozą umiarkowanego stopnia. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x



Ryc. 4. Obraz cytologiczny grzybiczego zapalenia błony śluzowej nosa u psa - obecność skupisk nienowotworowych komórek nabłonka z anizokariozą umiarkowanego stopnia, strzępki grzybów nie są widoczne w tym obrazie (ostateczne rozpoznanie postawiono na podstawie badania histopatologicznego). Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x



Ryc. 5. Obraz cytologiczny przedstawiający grzybnię na powierzchni błony śluzowej jamy nosowej u psa – widoczne liczne, cienkie, nitkowate strzępki grzybów. Barwienie metodą Pas. Powiększenie 400x



Ryc. 6. Obraz cytologiczny gruczolakoraka nosa u psa - obecność skupisk nowotworowych komórek nabłonkowych z anizokariozą łagodnego do umiarkowanego stopnia i widocznymi jąderkami. Małe skupisko prawidłowych walcowatych komórek nabłonka rzęskowego jest widoczne w prawym górnym rogu (czarna strzałka). Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x

2.1.2. Chłoniaki

Chłoniaki to grupa heterogennych nowotworów wywodzących się z limfocytów. Nowotwory te mogą rozwijać się w narządach limfatycznych, takich jak węzły chłonne, śledziona czy szpik kostny, ale również w narządach zawierających tkankę limfatyczną (np. przewód pokarmowy czy skóra) oraz w narządach tkanki limfatycznej teoretycznie pozbawionych (np. nerwy obwodowe) (Vail i in., 2019). Chłoniaki należą do jednych z najczęściej rozpoznawanych nowotworów u psów (7-24% wszystkich nowotworów) oraz najczęściej diagnozowanych nowotworów układu krwiotwórczego u tego gatunku (83%) (Vail i in., 2019; Valli i in., 2011; Zandvliet, 2016). Nowotwory te występują u psów w różnym wieku i u różnych ras (Valli i in., 2011). Mediana wieku w momencie rozpoznania choroby wynosi 6 do 9 lat, a do ras predysponowanych należą, m.in. bokser, basset hound, bernardyn, terier szkocki. Jak dotąd nie wykazano jednoznacznej predyspozycji związanej z płcią (Vail i in., 2019; Valli i in., 2011).

Typ chłoniaka, określany na podstawie linii komórkowej, z której nowotwór się wywodzi determinuje morfologię, przebieg kliniczny, odpowiedź na leczenie oraz rokowanie, przy czym istotne różnice mogą występować także pomiędzy poszczególnymi podtypami w obrębie tej samej linii komórkowej. Dostępne w literaturze badania wykazują, iż ryzyko rozwoju chłoniaków u psów jest wynikiem współdziałania czynników genetycznych oraz środowiskowych, w tym, m.in. ekspozycji psa na dym tytoniowy (Pinello i in., 2025; Vail i in., 2019). Klinicznie chłoniaki mogą występować między innymi w postaci skórnej, pokarmowej, śródpiersiowej, jednak najczęściej spotykaną postacią u psów jest chłoniak wielopostaciowy (Vail i in., 2019; Zandvliet, 2016). Chłoniaki wielopostaciowe charakteryzują się w głównym stopniu powiększeniem obwodowych węzłów chłonnych i stanowią ponad 80% wszystkich rozpoznawanych przypadków (Ryc. 7) (Ponce i in., 2010; Vail i in., 2019). Na podstawie zasięgu procesu nowotworowego, w tym zajęcia węzłów chłonnych, narządów wewnętrznych (śledziona, wątroby) lub krwi oraz szpiku, a także w oparciu o wyniki badań dodatkowych (m.in. morfologia i biochemia krwi, badania obrazowe), możliwe jest ustalenie klinicznego stopnia zaawansowania choroby zgodnie z klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) (Zandvliet, 2016), ma to istotne znaczenie dla dalszego postępowania terapeutycznego oraz rokowania.



Rys. 7. Obraz kliniczny psa boksera z chłoniakiem wieloogniskowym – widoczny powiększony węzeł chłonny podżuchwowy lewy (czarna strzałka), w badaniu cytologicznym rozpoznania chłoniaka centroblastycznego wielopostaciowego

W praktyce klinicznej rozpoznanie chłoniaka opiera się głównie na badaniu cytologicznym materiału pobranego za pomocą biopsji cienkoigłowej z powiększonych węzłów chłonnych (Childress i in., 2025; Sapieryński i in., 2010). Wynika to z łatwości pobrania materiału o wysokiej wartości diagnostycznej, bez konieczności znieczulenia pacjenta, czy wykonania zabiegu chirurgicznego. W konsekwencji badanie cytologiczne jest metodą tanią, szybką, mało inwazyjną i szeroko dostępną w praktyce lekarsko-weterynaryjnej (Seelig i in. 2016). Badania ankietowe potwierdzają, że aż 88% lekarzy weterynarii klinicystów jako metodę pierwszego wyboru rozpoznania chłoniaka wskazuje badanie cytologiczne, natomiast badanie histopatologiczne, jako metodę pierwszego rzutu wybiera jedynie 28% badanych lekarzy weterynarii. Z kolei 91% lekarzy weterynarii uważa ponadto, że biopsja cienkoigłowa jest wystarczająca do wstępnej oceny zaawansowania klinicznego chłoniaka (Regan i in. 2013). Na wysoką przydatność badania cytologicznego w rozpoznawaniu chłoniaków u psów wskazuje także najnowszy

konsensus onkologów weterynaryjnych, który podkreśla, że czułość i swoistość badania cytologicznego w diagnostyce chłoniaków wynosi 80-90%, a połączenie jej z immunofenotypowaniem znacznie zwiększa dokładność rozpoznania (Childress i in., 2025). Immunofenotypowanie można przeprowadzić zarówno w preparatach tkankowych (immunohistochemia - IHC), rozmazach cytologicznych (immunocytochemia - ICC), jak i w zawiesinie komórek (cystometria przepływowa) (Vail i in., 2019). Znaczenie IHC i ICC potwierdzają obserwacje Sapieryński (Sapieryński, 2010; Sapieryński i in., 2012), w których wyniki badania cytologicznego i ICC oraz histopatologicznego i IHC pokrywały się w 90%. Oznacza to, że już na etapie samego badania cytologicznego można uzyskać kluczowe informacje dla terapii i rokowania. Kolejnym ważnym aspektem jest możliwość klasyfikacji chłoniaków na podstawie kryteriów morfologicznych w preparatach cytologicznych, zgodnie ze zmodyfikowaną klasyfikacją kilońską. Jej podstawą jest ocena morfologii komórek z jednoczesnym oznaczeniem ich immunofenotypu (Childress i in., 2025; Lennert i Feller, 1992). System ten z powodzeniem zaadaptowano do oceny cytologicznej chłoniaków u psów (Fournel-Fleury i in., 1997a). Odpowiednie sklasyfikowanie typu chłoniaka przekłada się na znaczenie prognostyczne (Childress i in., 2025; Ponce i in., 2004; Valli i in., 2013).

Badanie histopatologiczne, wiąże się z koniecznością wykonania zabiegu chirurgicznego z pobraniem wycinka tkanki, dłuższym oczekiwaniem na wynik oraz wyższymi kosztami. Badani to, jest zalecane jest jednak w sytuacjach kiedy wcześniej wykonane metody diagnostyczne nie pozwalają na postawienie rozpoznania (obraz cytologiczny jest niejednoznaczny) wtedy klasyfikacja opiera się na zaktualizowanej klasyfikacji WHO – klasyfikacji histologicznej. Ponadto badanie histopatologiczne jest niezbędne w przypadkach rzadkich i nowych podtypów chłoniaka (Childress i in., 2025). U psów 60-89% wszystkich chłoniaków stanowią chłoniaki B-komórkowe, natomiast 10-38% to chłoniaki T-komórkowe (Vail i in., 2019). Spośród chłoniaków pochodzenia B-komórkowego, zgodnie z klasyfikacją kilońską, najczęściej rozpoznawany jest chłoniak centroblastyczny wielopostaciowy (Fournel-Fleury i in., 1997b; Ponce i in., 2004; Ponce i in., 2010; Sapieryński i in., 2010), natomiast w chłoniakach pochodzenia T-komórkowego, dominującym typem w klasyfikacji kilońskiej jest chłoniak wielopostaciowy mieszany z komórek małych i dużych (Childress i in., 2025; Fournel-Fleury i in., 2002; Jankowska i in., 2024; Ponce i in., 2010).

Różnorodność zachowania biologicznego chłoniaków odgrywa istotną rolę w podejmowaniu decyzji terapeutycznych przez lekarzy weterynarii i klinicystów. W przypadku chłoniaków już sama klasyfikacja do odpowiedniego typu/podtypu umożliwia wstępne określenie rokowania. Zarówno chłoniaki centroblastyczne wielopostaciowe, jak i chłoniaki T-komórkowe wielopostaciowe mieszane zaliczane są do nowotworów o wysokiej agresywności biologicznej (Childress i in., 2025; Ponce i in. 2010). Całkowity czas przeżycia psów z rozpoznanym chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym wynosi średnio od 4 do 21 miesięcy, z kolei w przypadku chłoniaków T-komórkowych wielopostaciowych mieszanych, mediana całkowitego czasu przeżycia wynosi około 5 miesięcy (Ponce i in., 2004; Valli i in., 2013). Większość dostępnych badań dotyczących rokowania w przypadkach chłoniaków u psów skupia się na ocenie takich parametrów kliniczno - patologicznych jak: typ morfologiczny chłoniaka, badanie parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi, stadium zaawansowania klinicznego choroby, reakcja na zastosowanie leczenia (Blaxill i Bennett, 2024; Gavazza i in., 2024; Jeong, 2023; Markström, 2024; Sutthigran i in., 2024). Znacznie rzadziej ocenia się cechy morfologiczne samych komórek nowotworowych. Przykładowo, praca Munasinghe i in. (2015) skupia się na ocenie znaczenia parametrów cytologicznych i cytomorfometrycznych w rokowaniu chłoniaków wielopostaciowych o wysokiej złośliwości u psów. Wykazano w niej, m.in., że obecność komórek dwujądrazstych lub wielojądrazstych w momencie rozpoznania wiązała się z krótszym czasem trwania remisji oraz całkowitego czasu przeżycia psów. Z kolei analiza cytomorfometryczna ujawniła kilka parametrów istotnie powiązanych z krótszym całkowitym czasem przeżycia (szczegółowo przedstawiono w dalszej części pracy).

2.1.3. Guz z komórek tucznych

Mastocytoma, czyli guz z komórek tucznych (ang. mast cell tumor, MCT), jest trzecim pod względem częstości występowania nowotworem skóry u psów i stanowi około 16-21% wszystkich rozpoznawanych guzów skórnych (London i Thamm, 2019). MCT może występować u psów w każdym wieku, a do ras predysponowanych należą, m.in. bokser, golden retriever, labrador retriever oraz american stafforshire terier (Engdahl i in., 2025; Romańska i in., 2024). Mastocytomy mogą rozwijać się powoli i przebiegać łagodnie, jednak część z nich charakteryzuje się szybkim i agresywnym wzrostem, co odzwierciedla zróżnicowane

zachowanie biologiczne tych nowotworów (Marouda i in., 2024). Klinicznie guzy z komórek tucznych mogą mieć postać niewielkich, pozbawionych sierści guzków o różnej wielkości lub przyjmować formę rozlanych, rumieniowatych mas, obrzęków, deformacji czy „owrzodzeń” (ryc. 8) (London i Thamm, 2019; Kiupel i Camus, 2019)



Ryc. 8. Mastocytoma niskiego stopnia złośliwości histologicznej u boksera – w okolicy pośladkowej prawej widoczny pozbawiony włosa guz o zrogowaciałej, zaschniętej powierzchni

Rozpoznanie mastocytomy opiera się na połączeniu badania klinicznego, cytologicznego, histopatologicznego oraz metod obrazowania (London i Thamm, 2019). Ze względu na wysoką częstość występowania oraz zróżnicowany charakter biologiczny, kluczowym jest nie tylko potwierdzenie samego rozpoznania, lecz także określenie zasięgu choroby oraz ocena jej potencjału złośliwości, co ma bezpośredni wpływ na przebieg choroby i rokowanie krótko- i długookresowe. Mastocytoma należy do nowotworów, które w większości przypadków (92-95%)

można rozpoznać na podstawie badania cytologicznego (Blackwood i in., 2012). W obrazie cytologicznym, komórki dobrze zróżnicowanego guza z komórek tucznych przypominają prawidłowe mastocyty, które są luźno ułożone obok siebie. Należy jednak uwzględnić, że w mastocytomach słabo zróżnicowanych komórki mogą wykazywać odmienny wygląd, m.in. brakiem ziarnistości cytoplazmatycznych, jednak nawet w takich przypadkach rozpoznanie na podstawie badania cytologicznego jest możliwe. W przypadku gdy rozpoznanie uzyskuje się za pomocą badania cytologicznego, to zmiana powinna być również oceniona w badaniu histopatologicznym. Przewagą badania histopatologicznego jest nie tylko postawienie ostatecznego rozpoznania nowotworu, ale także określenie stopnia złośliwości histologicznej guza, zbadanie zajęcia naczyń oraz ocena marginesów chirurgicznych. Dopełnieniem postępowania diagnostycznego jest określenie stopnia zaawansowania klinicznego mastocytomy (tzw. staging kliniczny), pozwalającego na pełną ocenę rozprzestrzenienia choroby nowotworowej. Ocena stopnia zaawansowania klinicznego guza z komórek tucznych u psów opiera się na podstawie badania cech morfologicznych/klinicznych guza pierwotnego, zajęcia regionalnych węzłów chłonnych, obecności przerzutów odległych oraz stopnia złośliwości histologicznej (Marconato i in., 2024).

Pomimo dużej liczby czynników o potencjale rokowniczym, najważniejszym z nich pozostaje opracowany wiele lat temu system stopniowania złośliwości histologicznej oceniany w badaniu mikroskopowym. Aktualnie w badaniu histopatologicznym wykorzystuje się dwa systemy klasyfikacji - trzystopniową klasyfikację według Patnaik i in. (1986) oraz dwustopniową klasyfikację według Kiupel i in. (2011). System Patnaik, będący starszym, dzieli mastocytomy na trzy stopie złośliwości histologicznej: guzy dobrze zróżnicowane (I stopnia), średnio zróżnicowane (II stopnia) oraz słabo zróżnicowane (III stopnia) (Berlato i in., 2021; Blackwood i in., 2012). Guzy I stopnia zazwyczaj wykazują łagodny charakter biologiczny i dają przerzuty jedynie w 10% przypadków, podczas gdy guzy III stopnia są nowotworami wysokiej agresywności, ze wskaźnikiem przerzutowania przekraczającym 80%. Rokowanie w przypadku guzów II stopnia w klasyfikacji trójstopniowej jest trudniejsze do przewidzenia, ich zachowanie biologiczne bywa różne, a przerzuty obserwuje się u 5-22% pacjentów (Berlato i in., 2021; Blackwood i in., 2012). Ze względu na trudności w interpretacji i rozbieżności w ocenie między patologiami mastocytomy II stopnia w klasyfikacji Patnaik, zaproponowano

uproszczoną dwustopniową klasyfikację, która dzieli MCT na guzy o niskim (low grade) i wysokim stopniu złośliwości histologicznej (high grade), ze znaczącymi różnicami odnośnie do całkowitych czasów przeżycia, ryzyka pojawienia się wznowy pooperacyjnej i ryzyka powstania przerzutów (Berlato i in., 2021; Kiupel i in., 2011).

W ostatnich latach podjęto próby adaptacji kryteriów klasycznej skali Kiupel do oceny guzów z komórek tucznych u psów w rozmazach cytologicznych (Camus i in., 2016; Hergt i in., 2016; Scarpa i in., 2016). Wyniki badań wskazują na wysoką zgodność między stopniowaniem cytologicznym i histopatologicznym, sięgającą nawet 94% (Berlato i in., 2021; Camus i in., 2016; Scarpa i in., 2016). W badaniu Marouda i in. (2024) zgodność rozpoznania cytologicznego z rozpoznaniem histopatologicznym wynosiła około 75%, jednak zastosowanie dodatkowych markerów oceny mikroskopowej, takich jak ocena ekspresji białka Ki67 oraz analiza wartości AgNOR, pozwalało lepiej określić charakter guza. Ponadto Berlato i in. (2021) zwracają uwagę na wysoką zgodność rozpoznań cytologicznych i histopatologicznych oraz korzyści płynące ze stosowania dodatkowych markerów oceny mikroskopowej komórek MCT, szczególnie wymienionych markerów proliferacyjnych (Ki67, AgNOR) oraz mutacji genu *c-kit* i ekspresji receptora c-KIT. Istotnym w badaniu cytologicznym mastocytomy u psów jest to, że już na etapie badania przedoperacyjnego możliwe jest uzyskanie informacji pomocnych w podejmowaniu decyzji klinicznych - rozpoznanie cytologiczne guza jako MCT low grade wiąże się z dobrym rokowaniem, wykrycie zaś cech typowych dla MCT high grade wiąże się z koniecznością wdrożenia złożonego, często radykalnego i kosztownego leczenia, przy jednoczesnym niepewnym rokowaniu.

Większość publikacji potwierdza, że ryzyko nawrotów i przerzutów rośnie wraz ze stopniem złośliwości guza (Berlato i in., 2021; Blackwood i in., 2012; Camus i in., 2016; Scarpa i in., 2016; Sabbatini i in., 2024; Stefanello i in., 2024). Mastocytomy o niskim stopniu złośliwości (Pantak I, Kiupel low grade) zazwyczaj wiążą się z korzystnym rokowaniem, jednak również w tej grupie opisywano obecność przerzutów. W badaniu Stefanello i in. (2015) stwierdzono je u około 6% psów z guzami Pantak I i u 15% psów z guzami low grade Kiupel, podobne obserwacje przedstawili Anderson i in. (2024), Krick i in. (2009) oraz Marconato i in. (2024). W badaniu Cino i in. (2023) odnotowano obecność przerzutów u psów z MCT o niskiej złośliwości histologicznej, mimo niskiego indeksu mitotycznego i niskiej ekspresji markerów proliferacyjnych. Wskazuje to na fakt, że system stopniowania w badaniu

histopatologicznym nie zawsze pozwala jednoznacznie przewidzieć przebiegu choroby, a dodatkowo wymusza to poszukiwanie dodatkowych metod przewidywania przebiegu choroby w MCT o niskiej złośliwości cytologicznej, które pozwolą na wytypowanie tych przypadków, które pomimo niskiej złośliwości cytologicznej mogą wiązać się z gorszym rokowaniem.

2.2. Cytomorfometria

Współcześnie w patologii weterynaryjnej coraz częściej wykorzystuje się metody diagnostyczne oparte na analizie cyfrowego obrazu przy użyciu dedykowanego oprogramowania komputerowego, określane jako - ang. digital veterinary pathology. Jedną z metod stosowanych w komputerowej analizie obrazów mikroskopowych jest morfometria. Morfometrię definiuje się jako zautomatyzowaną technikę badawczą, która umożliwia precyzyjną ocenę kształtu, rozmiaru, liczby lub rozmieszczenia struktur w preparatach mikroskopowych (Piotrowska, 2012; Roels i in., 1998). Badanie morfometryczne może być wykorzystane nie tylko do badania pojedynczych komórek i ich organelli komórkowych, ale również do oceny tkanek i całych narządów (Roels i in., 1998). Precyzyjna charakterystyka morfologii badanych struktur (np. obwód, średnica) zaliczana jest do analizy jakościowej, natomiast określenie wartości liczbowych, takich jak liczebność komórek, jąder komórkowych, mieści się w zakresie analizy ilościowej. W ramach morfometrii wyróżnia się dwie metody: planimetrię, która umożliwia wykonywanie pomiarów w dwuwymiarowej płaszczyźnie oraz stereologię, opartą na matematycznym przekształcaniu obrazu dwuwymiarowego w model trójwymiarowy (Pinto de Azevedo, 2022). W zależności od rodzaju analizowanego materiału, morfometria może być stosowana do oceny w preparatach histologicznych (histomorfometria), analizy komórek lub ich skupisk w rozmazach cytologicznych (cytomorfometria) (Haghofer i in., 2025; Kidney i Meachem, 2014).

Do przeprowadzenia analizy morfometrycznej niezbędny jest mikroskop połączony z cyfrową kamerą oraz komputer wyposażony w odpowiednie oprogramowanie (Kidney i Meachem, 2014). W zależności od zastosowanego oprogramowania istnieje możliwość wyboru parametrów, które są obliczane automatycznie dla każdego z nich (Roels i in., 1998). Za pomocą tego badania można uzyskać informacje dotyczące pola powierzchni, obwodu, długości, szerokości, średnicy, promienia, okrągłości badanych struktur, a przy zastosowaniu odpowiednich

przekształceń matematycznych możliwe jest również otrzymanie danych dotyczących objętości, współczynnika eliptyczności oraz wymiaru fraktalnego (Kidney i Meachem, 2014; Piotrowska, 2012). W medycynie weterynaryjnej badanie morfometryczne znajduje zastosowanie przede wszystkim w preparatach histologicznych, choć coraz częściej wykorzystywana jest również z użyciem rozmazów cytologicznych, szczególnie w rozpoznawaniu i ocenie rokowania w przypadku nowotworów. Klasyczna diagnostyka onkologiczna opiera się na subiektywnej ocenie obrazu mikroskopowego przez badającego, znajomości wzorców i charakterystycznych cech morfologicznych poszczególnych typów zmian, ale ocena ta często nie jest powtarzalna, zarówno w ocenie preparatu przez jednego patologa/obserwatora w różnym czasie (ang. intraobserver), jak i przez różnych patologów/obserwatorów (ang. interobserver). W związku z powyższym w patologii weterynaryjnej poszukuje się metod, które pozwolą na ulepszenie diagnostyki i wprowadzeniu ilościowych, powtarzalnych cech morfologicznych w obrębie badanych komórek i tkanek (De Vico i in., 2002). W badaniach morfometrycznych ze względu na sposób wykonywania badania, analizowany obraz musi zawierać komórki, które są ułożone płasko i oddzielone od siebie, aby móc je zaznaczyć lub obrysować. Z tego powodu zastosowanie tej metody w analizie rozmazów cytologicznych wydaje się łatwiejsze i bardziej praktyczne niż w preparatach histopatologicznych. Ze względu na charakterystyczny układ komórek w preparatach cytologicznych gdzie komórki są w rozłożone w jednej płaszczyźnie i wyraźnie odgraniczone od siebie możliwy jest nie tylko pomiar całych komórek i ich jąder, ale również ocenę takich struktur jak jąderka, organelle, wodniczki, czy ziarnistości cytoplazmatyczne (Kidney i Meachem, 2014). Dodatkowo, preparaty cytologiczne są łatwiejsze do uzyskania, szybsze w przygotowaniu, ich badanie wiąże się z mniejszymi kosztami, a sama procedura jest zazwyczaj mało inwazyjna. Należy pamiętać, że w przypadku niektórych parametrów istnieją różnice pomiędzy analizą preparatu histologicznego i cytologicznego, dlatego nie można przenosić wartości diagnostycznej i prognostycznej pomiędzy tymi dwoma badaniami (De Vico i in., 2002).

Analizy morfometryczne w preparatach cytologicznych, o ile są przeprowadzone zgodnie z zastosowaniem stosowanych protokołów dają obiektywne i powtarzalne wyniki, które mogą zostać zestawione z innymi badaniami oraz poddane analizie statystycznej (Barbosa i in., 2014; Buhmeida, 2006; Roels i in., 1998). Najważniejszą zaletą tego badania jest wykrycie subtelnych różnic, które w analizie klasycznej

nie są widoczne lub oczywiste dla badającego, co przekłada się na dokładniejszą diagnostykę i prognozykę chorób.

Ograniczeniem tej metody pozostaje dostępność odpowiedniego sprzętu oraz jakość preparatu, a co za tym idzie, jakość analizowanego obrazu. Jakość i przygotowanie preparatu mają kluczowe znaczenie, ponieważ uzyskane pomiary w dużym stopniu zależą właśnie od jakości rozmazu cytologicznego i obecnych w nim komórek. Artefakty powstałe podczas pobierania i utrwalania materiału mogą powodować zniekształcenie komórek i jąder komórkowych. Niewłaściwie wykonany rozmaz skutkuje nieprawidłowym ułożeniem komórek, które często nachodzą na siebie lub ulegają całkowitemu uszkodzeniu, co całkowicie uniemożliwia wykonanie wiarygodnych pomiarów. Dlatego podczas pomiarów konieczne jest staranne dobieranie pól widzenia, w których komórki są zachowane w całości i równomiernie rozłożone. Sama analiza wymaga odpowiedniego mikroskopu świetlnego i kamery cyfrowej, które zapewnią obrazy wysokiej jakości oraz dedykowanego oprogramowania umożliwiającego ich dalszą obróbkę i pomiary.

3. Zastosowanie cytomorfometrii w onkologii weterynaryjnej – przegląd literatury

Rosnąca częstość występowania nowotworów u psów stwarza potrzebę wdrażania metod diagnostycznych, które są szybkie, proste w wykonaniu, dostarczają wiarygodnych informacji o charakterze zmiany oraz możliwym przebiegu klinicznym i rokowaniu, a jednocześnie nie będą w znaczący sposób zwiększać kosztochłonności badania. Celem niniejszego rozdziału jest przegląd piśmiennictwa na dotychczasowych dotyczących zastosowania cytomorfometrii u psów z różnymi nowotworami z uwzględnieniem jej roli diagnostycznej i prognostycznej.

3.1. Przegląd literatury o innych typach nowotworów u psów

3.1.1. Nowotwory gruczołu sutkowego u suk

Jednymi z najczęstszych nowotworów u psów są zmiany wywodzące się z gruczołu sutkowego. W przypadku tego typu guzów istotne znaczenie diagnostyczne, jak i rokownicze ma określenie precyzyjnego charakteru zmiany. Znaczna heterogeniczność guzów gruczołu sutkowego utrudnia jednoznaczną ocenę ich charakteru na podstawie obrazu cytologicznego, konieczne jest zatem wykonanie badania histopatologicznego. Zastosowanie cytomorfometrii jako narzędzia diagnostycznego w przypadku guzów gruczołu sutkowego oceniono w badaniach Dolka i in. (2016, 2018) oraz Simeonov i Simeonova (2006a, 2006b, 2006c, 2007a). We wszystkich badaniach skupiono się na przydatności morfometrii jąder komórkowych jako narzędzia diagnostycznego umożliwiającego ocenę zmiany na podstawie analizy preparatów cytologicznych, do której materiał może zostać pobrany i oceniony znacznie szybciej niż materiał tkankowy. W badaniu przeprowadzonym przez Simeonov i Simeonova (2006a) oceniano dwa parametry morfometryczne jądra komórkowego dla grupy zmian niezłośliwych i złośliwych: średnią średnicę (MND) oraz współczynnik okrągłości (NR). Wykazano statystycznie istotne różnice w obu parametrach pomiędzy analizowanymi grupami, w których jądra komórek nowotworowych złośliwych charakteryzowały się większymi wymiarami i bardziej nieregularnym kształtem w porównaniu do komórek prawidłowych i komórek nowotworowych niezłośliwych. Wśród grup nowotworów złośliwych nie stwierdzono różnic w zakresie okrągłości jąder komórkowych. Z kolei w badaniu, obejmującym dodatkowo guzy pochodzenia mezenchymalnego (Simeonov i Simeonova, 2007a) analizowano następujące parametry jądra komórkowego: pole powierzchni (NA),

obwód (NP), średnica (ND) i otrzymano statystycznie istotne różnice pomiędzy nowotworami niezłośliwymi i złośliwymi. Wartości NA, NP, ND były większe wraz ze wzrostem stopnia złośliwości nowotworów, gdzie najniższe wartości odnotowano dla gruczolaków włóknistych, natomiast najwyższe dla raków anaplastycznych. W obu grupach (nabłonkowej i mezenchymalnej) obserwowano wzrost wartości wszystkich trzech parametrów proporcjonalny do złośliwości nowotworu. Podobne wnioski przedstawiono w doniesieniu Dolka i in. (2016), w którym ocenie poddano nie tylko parametry MND i NR, ale także średnią wartość pola powierzchni, obwodu oraz promienia jądra (kolejno: MNA, MNP, MNR). Uzyskane wyniki skorelowano z wynikami badania histopatologicznego, i na tej podstawie stwierdzono istotne różnice w wartości MNA pomiędzy nowotworami niezłośliwymi a złośliwymi. NR został również zbadany jako pojedynczy parametr morfometryczny umożliwiający różnicowanie nowotworów niezłośliwych od złośliwych gruczołu sutkowego (Simeonov i Simeonova, 2006c), i jak w przedstawionym wcześniej badaniu Simeonov i Simeonova (2006a) parametr NR pozwalał na odróżnienie zmian niezłośliwych od zmian złośliwych, ale nie różnił się między samymi nowotworami złośliwymi. Interesującym uzupełnieniem wcześniejszych prac Simeonov i Simeonova była analiza fraktalna jąder komórkowych (Simeonov i Simeonova, 2006b), w której wykazano, że wymiar fraktalny będący miarą nieregularności zarysu jądra, był istotnie wyższy w komórkach nowotworów złośliwych w porównaniu do komórek prawidłowych i nowotworów niezłośliwych. W badaniu Dolka i in. (2018) ponownie oceniono przydatność cytomorfometrii w różnicowaniu nowotworów niezłośliwych i złośliwych gruczołu sutkowego u psów, rozszerzając analizę o pomiary całych komórek i ich jąder. Poprzez uzyskanie parametrów takich jak: średnie pole powierzchni, średni obwód, średnia średnica komórek i jąder oraz wartości okrągłości jądra i stosunku jądra do cytoplazmy, możliwe było zestawienie ich z wynikiem badania histopatologicznego oraz cytologicznym stopniem złośliwości nowotworu (zgodnie ze zmodyfikowaną skalą Robinsona). Mimo, że w nowotworach złośliwych uzyskano znacznie wyższe wartości, różnice te nie były istotne statystycznie, co wskazuje na ograniczone zastosowanie cytomorfometrii jako narzędzia różnicującego nowotwory niezłośliwe i złośliwe w gruczole sutkowym u psów. Warto zauważyć jednak, że wyniki tego badania pozostają w sprzeczności z wynikami innych publikacji (Dolka i in., 2016; Simeonov i Simeonova, 2006a, 2006b, 2006c, 2007a). Rozbieżność wyników przytoczonych badań, pokazuje, że cytomorfometria

posiada ograniczoną wartość diagnostyczną i prognostyczną w przypadku zmian rozrostowych gruczołu sutkowego u psów i może to wynikać, przynajmniej częściowo ze znacznego zróżnicowania ich budowy histologicznej.

3.1.2. Nowotwory tkanek miękkich – mięsaki

Może okazać się to zaskakujące, ale ocena różnic morfologicznych pomiędzy zmianami nowotworowymi i nienowotworowymi zmianami rozrostowymi w tkance łącznej włóknistej w obrazie cytologicznym może stanowić wyzwanie diagnostyczne (fibroblasty ziarniny i komórki nowotworowe włókniakomięsaka są morfologicznie bardzo podobne, a często nieodróżnialne). Z tego względu morfometria jąder komórkowych znalazła również zastosowanie w odróżnianiu zmian rozrostowych zlokalizowanych w obrębie tkanek miękkich i została oceniona w dwóch niezależnych badaniach Meachem i in. (2012) oraz Simeonov i in. (2015). W pierwszym z nich autorzy zastosowali analizę morfometryczną do odróżniania komórek nowotworowych w mięsakach od komórek odczynowych tkanki łącznej włóknistej (fibroblastów odczynowych), opierając się na ośmiu parametrach jądrowych: powierzchni jądra NA, minimalnej, maksymalnej i średniej średnicy (D_{min} , D_{max} , D_{mean}), maksymalnym i minimalnym promieniu (R_{max} , R_{min}), obwodzie (NP) oraz wskaźniku okrągłości jądra (NR). Choć wszystkie parametry jądrowe były wyższe dla komórek odczynowych niż dla komórek nowotworowych mięsaków, istotność statystyczną wykazano tylko dla D_{max} , R_{max} oraz NP. Podobne wyniki uzyskano dla odchyłeń standardowych, szczególnie w zakresie D_{max} , R_{max} i R_{min} oraz NR. Porównanie parametrów jądrowych pomiędzy komórkami w grupach mięsaków o różnych stopniach złośliwości nie wykazało istotnych statystycznie różnic. Z kolei w badaniu Simeonov i in. (2015) analizie poddano wyłącznie parametr okrągłości jądra (NR) i zaobserwowano większe wartości NR w mięsakach i istotną różnicę w porównaniu do jąder komórek zmian odczynowych. Tak jak w przypadku pierwszego badania (Meachem i in., 2012), nie wykazano istotnych różnic w obrębie grup o różnym stopniu złośliwości histologicznej. Obie publikacje wskazują na potencjał zastosowania morfometrii jądrowej jako narzędzia wspomagającego różnicowanie zmian odczynowych tkanki łącznej od mięsaków tkanek miękkich, jednak wymaga ona dalszych badań i dopracowania.

3.1.3. Nowotwory skóry i przydatków

Poza guzami tkanek miękkich, których materiał cytologiczny bywa ubogi (zmiany mają często dużą spoistość) lub trudniejszy do interpretacji, a zastosowanie analizy cytomorfometrycznej ogranicza się głównie do różnicowania zmian nowotworowych od odczynowych, to w przypadku zmian zlokalizowanych w obrębie skóry i jej przydatków metoda ta znajduje szersze zastosowanie. Ze względu na łatwą dostępność materiału oraz dużą różnorodność histologiczną zmian, w literaturze opisano liczne badania oceniające wartość morfometrii jądrowej nie tylko jako narzędzia wspierającego diagnostykę, lecz także pomocnego w określaniu stopnia złośliwości nowotworu, ryzyka pojawienia się przerzutów i nawrotów po resekcji chirurgicznej.

3.1.3.1. Nowotwory skóry

Pierwszą grupę stanowią nowotwory wywodzące się bezpośrednio ze skóry, takie jak rak płaskonabłonkowy (ang. squamous cell carcinoma, SCC) i rak podstawnokomórkowy (ang. basal cell carcinoma, BCC). Zastosowanie morfometrii jądrowej w ocenie raka płaskonabłonkowego skóry opisano w badaniach Simenov (2009, 2010). W obu pracach analizowano parametry jądrowe komórek nowotworowych, w tym: średnią powierzchnię jądra (MNA), średni obwód jądra (MNP) oraz średnią, minimalną i maksymalną średnicę jądra (Dmean, Dmin, Dmax). W pierwszym badaniu oceniono ich zależność względem stopnia histologicznej złośliwości, wykazując, że wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej statystycznie istotnie wzrastały wartości dla MNA, MNP oraz Dmean. W drugim badaniu wykorzystano ten sam zestaw parametrów, jednak analizowano ich związek z potencjałem przerzutowym raka płaskonabłonkowego do regionalnych węzłów chłonnych. Również w tym przypadku stwierdzono, że średnie wartości MNA, MNP, Dmean były istotnie wyższe u psów, u których stwierdzono przerzuty w porównaniu z psami bez zajęcia węzłów chłonnych. Wyniki obu publikacji sugerują, że morfometria jądrowa może być użytecznym narzędziem wspomagającym zarówno diagnostykę, jak i ocenę rokowniczą raka płaskonabłonkowego skóry. Podobnie wnioski płyną z badania dotyczącego raka podstawnokomórkowego przeprowadzonego przez Simeonov i Simeonova (2010a). Przy pomocy pomiarów jądrowych: MNA, MNP, MND, oceniono przydatność morfometrii w ocenie występowania miejscowej wznovy

po jego chirurgicznym usunięciu. Zaobserwowano, iż guzy, które w późniejszym czasie uległy wznowie, charakteryzowały się istotnie wyższymi wartościami parametrów jądrowymi niż guzy, u których nawrotu nie odnotowano.

3.1.3.2. Nowotwory okolicy odbytu

W obrębie przydatków skóry duże znaczenie kliniczne przypisuje się nowotworom wywodzącym się z gruczołów zlokalizowanych w okolicy okołodbytowej. Do tej grupy zalicza się nowotwory gruczołów apokrynowych zatok przyodbytowych oraz nowotwory gruczołów okołodbytowych. Pomimo zbliżonej lokalizacji anatomicznej, oba typy gruczołów różnią się pod względem pochodzenia histologicznego oraz obrazu cytologicznego, a co szczególnie istotne, zachowaniem biologicznym, w szczególności tendencją do rozsiewu. W przypadku obu grup zmian morfometria jądrowa znajduje zastosowanie zarówno w diagnostyce różnicowej, jak i w rokowaniu. W badaniu Simeonov i Simeonova (2008b) dotyczącym nowotworów gruczołów apokrynowych zatok przyodbytowych przeanalizowano materiał cytologiczny obejmujący gruczolaki i raki. Morfometria jądrowa objęła ocenę takich parametrów jak: średnia powierzchnia jądra (MNA), średni obwód jądra (MNP), średnia średnica jądra (MND) oraz współczynnik kulistości jądra (NR). Wykazano, że wszystkie analizowane parametry, z wyjątkiem NR, osiągnęły istotnie wyższe wartości w nowotworach złośliwych w porównaniu do zmian niezłośliwych. W kolejnym badaniu Simeonov (2014), podjęto próbę klasyfikacji raków gruczołów apokrynowych zatok przyodbytowych (ang. apocrine gland anal sac adenocarcinoma, AGASACA) na podstawie cech morfometrycznych jąder komórkowych. Raki zostały sklasyfikowane na trzy podtypy: tabularny, rozetowy i lity, a następnie zestawione z tym samym zestawem parametrów jądrowych, jak w badaniu Simeonov i Simeonova (2008b). Wykazano, że morfometria jądrowa tych parametrów może być pomocna nie tylko w ocenie stopnia złośliwości, lecz także w klasyfikacji histologicznej AGASACA, co może mieć istotne znaczenie dla prognozowania ich zachowania biologicznego. W obrębie okolicy odbytowej, obok guzów zatok przyodbytowych, zbadano również nowotwory wywodzące się z gruczołów okołodbytowych (hepatoidalnych). W badaniu Simeonov (2019) porównano parametry jądrowe pomiędzy gruczolakami i rakami tych gruczołów. Wartości MNA, MNP, oraz Dmax, Dmin i Dmean, były istotnie wyższe w guzach złośliwych, co potwierdza przydatność morfometrii w różnicowaniu

charakteru zmian. Dodatkowo badanie Simeonov i Simeonova (2008a), dotyczącym wyłącznie gruczolakoraków gruczołów okołoodbytowych, oceniono wartość prognostyczną parametrów jądrowych. Analizując przypadki, w których odnotowano lub nie przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych, wzięto pod uwagę te same parametry jądrowe, które wspomniano w badaniu opisanym wcześniej. Wszystkie analizowane parametry były istotnie wyższe w gruczolakorakach u psów, u których pojawiły się również przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych, przy czym największe różnice dotyczyły MNA, MNP i Dmean. Co istotne, stwierdzono ujemną korelację pomiędzy MNA, MNP, Dmean, Dmax a czasem przeżycia psów, pozwala to na stwierdzenie, że parametry te, dodatkowo mogą pełnić rolę wskaźników prognostycznych.

3.1.3.3. Inne nowotwory przydatków skóry

Nowotwory gruczołów apokrynowych, gruczołów łojowych oraz gruczołów włoskowych stanowią istotną grupę zmian wywodzących się z przydatków skóry. W badaniu Simeonov i Simeonova (2007b) obejmującym gruczolaki i raki gruczołów apokrynowych skóry, wykazano, że parametry jądrowe: MNA, MNP, MND, NR osiągnęły istotnie wyższe wartości w nowotworach złośliwych niż w nowotworach niezłośliwych. Ponadto odnotowano różnice dla raków, których komórki stwierdzono w regionalnych węzłach chłonnych, w tych przypadkach wartości wspomnianych parametrów były szczególnie wysokie. Podobne zależności zaobserwowano w badaniu dotyczącym nowotworów gruczołów włoskowych (gruczolakach i rakach) zlokalizowanych w przewodzie słuchowym zewnętrznym (Simeonov, 2012), w którym wykorzystano takie parametry jak: średnia pola powierzchni jądra (MNA), średni obwód jądra (MNP), najmniejsza, największa i średnia średnica jądra (Dmin, Dmax, Dmean). Wyniki potwierdziły, że nowotwory złośliwe cechowały się istotnie wyższymi wartościami dla MNA, MNP, Dmean i Dmax. Ponadto, podobnie jak w przypadku raków gruczołów apokrynowych, wyższe wartości badanych parametrów charakteryzowały komórki raków, które dały przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych. Podobną zależność potwierdzono również w odniesieniu do raków gruczołów łojowych skóry w badaniu Simenov i Simeonova (2010b), gdzie w połowie przypadków odnotowano obecność przerzutów do węzłów chłonnych już w chwili rozpoznania. Zakres analizowanych parametrów odpowiadał temu, które zastosowano

w badaniu Simeonov (2012). Wartości MNA, MNP, Dmean oraz Dmin okazały się istotnie wyższe w grupie raków, które dały przerzuty do węzłów chłonnych w porównaniu z rakami bez stwierdzonych przerzutów.

3.1.4. Inne zmiany nowotworowe u psów

Uzupełnieniem badań z zakresu cytomorfometrii nowotworów jest praca Setthawongsin i in. (2018), w której porównano cechy cytomorfometryczne komórek guza wenerycznego (ang. canine transmissible venereal tumor, CTVT) pomiędzy jego trzema typami histologicznymi (plazmacytoidalnym, limfocytarnym, mieszanym) z innymi nowotworami o morfologii komórek okrągłych (chłoniak, mastocytoma, guzy histiocytarne). Przeanalizowano zarówno parametry jądrowe, jak i komórkowe: promień, średnicę, obwód i pole powierzchni. Komórki CTVT okazały się największe spośród komórek wszystkich analizowanych nowotworów okrągłokomórkowych, a różnice były istotne statystycznie.

Z kolei, w badaniu Przeździecki i in. (2015b) przeprowadzono analizę parametrów jądrowych i cytoplazmatycznych komórek obecnych w płynach gromadzących się w jamach surowiczych. Oceniono cztery grupy komórek: prawidłowe komórki międzybłonka, komórki odczynowego rozrostu międzybłonka oraz komórki nowotworowe (międzybłoniaka i raki rozsiane do jam surowiczych). Porównano średnie wartości jądra komórkowego i komórki dla następujących parametrów: obwód, pole powierzchni, średnica, okrągłość, a także obliczono stosunek jądra do cytoplazmy. Wyniki wykazały istotne różnice pomiędzy komórkami prawidłowymi a komórkami odczynowymi i nowotworowymi, gdzie komórki prawidłowe były mniejsze, ale cechowały się większym stosunkiem jądra do cytoplazmy (N/C). Natomiast pomiędzy komórkami odczynowymi, a nowotworowymi stwierdzono istotne różnice, w których komórki odczynowe miały wyższe wartości MNA i MND oraz większy stosunek N/C. Również w badaniu dotyczącym nisko zróżnicowanych mięsaków oraz czerniaków amelanotycznych jamy ustnej (Przeździecki i in., 2015a) zbadano opisane wcześniej parametry jądrowe oraz komórkowe. Uzyskane wyniki nie pozwoliły na rozróżnienie typów nowotworów, co sugeruje, że morfometria nie znalazła zastosowania diagnostycznego w tym przypadku.

3.2. Zastosowanie cytomorfometrii w nowotworach uwzględnionych w badaniach własnych

3.2.1. Zastosowanie cytomorfometrii w chłoniakach u psów

3.2.1.1. Ocena wartości diagnostycznej i prognostycznej

W dostępnej literaturze odnaleźć można ograniczoną ilość badań dotyczących zastosowania morfometrii w rozpoznawaniu i klasyfikowaniu przypadku chłoniaków u psów. W badaniu Papakonstantinou i O'Brien (2014) wykorzystano metodę obrazowania wysokiej jakości (ang. high content imaging, HCI) do ilościowej oceny morfometrycznej komórek chłoniaka u psów w porównaniu z komórkami limfoidalnymi węzłów chłonnych psów zdrowych. Analizie poddano cztery przypadki chłoniaka typu B oraz jeden chłoniaka T-komórkowego. Za pomocą oprogramowania HCI zebrano dane dotyczące parametrów morfometrycznych: pola powierzchni komórki, cytoplazmy i jądra, stosunku powierzchni jądra do całej komórki (N/Cell) oraz do cytoplazmy (N/Cyt), przemieszczenia jądra (czyli odległość jądra od środka komórki, wyrażonej jako proporcja promienia jądra) oraz współczynnik okrągłości komórki. Wykazano, że wszystkie parametry różniły się istotnie pomiędzy komórkami nowotworowymi a komórkami prawidłowymi. Komórki nowotworowe wykazywały większe wartości parametrów powierzchni całkowitej i cytoplazmatycznej oraz jądrowej. Stosunki N/Cell oraz N/Cyt były niższe w komórkach chłoniaka. Ponadto komórki chłoniaków charakteryzowały się wyższym wskaźnikiem przemieszczenia jądra, co oznacza, że ich jądra były ułożone bardziej obwodowo. Współczynnik okrągłości był niższy w komórkach chłoniaka, co wskazuje na ich mniej regularny kształt. Z kolei w badaniu Nikousefat i in. (2018) analizowano przydatność cytomorfometrii jądrowej w diagnostyce procesów proliferacyjnych w obrębie węzłów chłonnych, z uwzględnieniem różnic pomiędzy komórkami tkanki limfatycznej nieaktywowanej, tkanki limfatycznej odczynowej i komórkami chłoniaków u psów. Do analizy włączono aspiraty z węzłów chłonnych psów zdrowych, pacjentów z rozpoznanym rozrostem odczynowym węzła chłonnego oraz chłoniakiem, a ostateczne rozpoznanie zostało potwierdzone badaniem histopatologicznym. W ramach morfometrii jądrowej dla każdego przypadku wykonano po 30 pomiarów pola powierzchni jądra, obwodu, średnicy oraz okrągłości jądra. Uzyskane wyniki wykazały istotne statystycznie różnice w parametrach cytomorfometrycznych pomiędzy

analizowanymi grupami. Średnia powierzchnia jądra była istotnie większa w komórkach chłoniaków i komórkach odczynowych niż w komórkach prawidłowych. Obwód i średnica również różniły się istotnie pomiędzy wszystkimi grupami, przy czym największe różnice w średnicy jądra odnotowano pomiędzy komórkami chłoniaków a komórkami limfocytów odczynowych. Wskaźnik okrągłości jąder był najniższy w grupie chłoniaków, co oznacza, że miały bardziej nieregularny kształt, podobnie jak w badaniu Papakonstantinou i O'Brien (2014) i był istotnie różny dla wszystkich grup. Na podstawie wyników obu badań można wywnioskować, że wszystkie oceniane parametry morfometryczne różnicowały zarówno komórki prawidłowe i nowotworowe, jak i nowotworowe i odczynowe. Tym samym badanie cytometryczne może stanowić przydatne narzędzie wspomagające cytologiczną diagnostykę limfadenopatii u psów.

Jedynym dostępnym badaniem opisującym ocenę rokowniczą analizy cytometrycznej w chłoniakach u psów jest praca Munasinghe i in. (2015), przeprowadzona na psach z chłoniakami o wysokim stopniu złośliwości. Analizie poddano rozmazy cytologiczne barwione metodą Wright-Giemsa uzyskane od 20 pacjentów, wykonane w momencie rozpoznania choroby i jej remisji, całkowity czas przeżycia obliczony był jako suma dni od rozpoznania do remisji oraz remisji do nawrotu i nawrotu do śmierci. W analizie morfometrycznej oceniono po 100 jąder komórkowych i zbadano następujące parametry: powierzchnia jądra, średnica jądra (maksymalna, średnia i minimalna), obwód, obwód z wypukłościami, obwód eliptyczny, stosunek obu obwodów, promień (maksymalny, minimalny i ich stosunek) oraz współczynnik okrągłości. Wyniki wykazały, że zwiększona minimalna średnica oraz promień jądra w momencie rozpoznania były istotnie związane z krótszym czasem od nawrotu do śmierci. Natomiast w czasie nawrotu, wartości parametrów średniej powierzchni jądra, maksymalnej i średniej średnica, maksymalnego promienia, obwodu, obwodu z wypukłościami i obwodu eliptycznego korelowały z krótszym czasem od rozpoznania do remisji. Nie wykazano istotnego wpływu żadnego z analizowanych parametrów morfometrycznych na czas od remisji do nawrotu ani na całkowity czas przeżycia psów.

3.2.2. Zastosowanie cytomorfometrii w guzach z komórek tłuszczowych u psów

3.2.2.1. Ocena przydatności diagnostycznej

Jednym z najczęściej podejmowanych zagadnień dotyczącym zastosowania cytomorfometrii w guzach z komórek tłuszczowych było analiza jej przydatności diagnostycznej w kontekście oceny stopnia złośliwości histologicznej. Pierwsze prace z 2003 roku (Strefezzi i in., 2003) potwierdziły przydatność morfometrii w różnicowaniu stopnia złośliwości histologicznej mastocytozy u psów. Celem badania było określenie różnic w parametrach morfometrycznych jąder komórek guzów komórek tłuszczowych w zależności od ich stopnia zróżnicowania histopatologicznego z zastosowaniem dwóch technik barwienia cytologicznego. Histopatologicznie sklasyfikowano 24 przypadki guzów zgodnie z klasyfikacją Patnaik a następnie wykonano barwienia cytologiczne metodą panoptyczną (Hematocor) oraz hematoksyliną i eozyną (HE). W każdym przypadku analizowano po 100 jąder dla każdego barwienia, uzyskując pomiary dla pola powierzchni, obwodu, średniej średnicy, współczynnika eliptyczności oraz współczynnika regularności. Otrzymane dane morfometryczne porównano z określonym w badaniu histopatologicznym stopniem złośliwości. Wyniki okazały się obiecujące dla parametrów pola powierzchni, średnicy i obwodu, dla których wykazano wzrost wartości wraz ze wzrostem złośliwości nowotworu. W przypadku barwienia HE zaobserwowano istotne statystycznie różnice pomiędzy stopniami I a III oraz II a III według Patnaik, natomiast dla barwienia Hematocorem istotność statystyczną wykazano wyłącznie pomiędzy stopniami I a III. Pozostałe analizowane parametry (eliptyczność i regularność) nie wykazały istotnych różnic między badanymi stopniami MCT. Zwrócono również uwagę na różnice pomiędzy wartościami morfometrycznymi w obu metodach barwienia – wyniki pomiarów wykonanych na preparatach barwionych panoptycznie miały wyższe wartości, co tłumaczono różnicami w technice przygotowania rozmazu (utrwalanie na powietrzu vs. utrwalanie w alkoholu). Autorzy podkreślili, że nie udało się ocenić wartości stosunku wielkości jądra do cytoplazmy, ani morfometrii całych komórek, ze względu na trudności w precyzyjnym określeniu granic komórkowych.

W badaniach cytologicznych MCT szczególne znaczenie mają guzy sklasyfikowane histopatologicznie jako II i III stopień złośliwości, guzy te cytologicznie mogą wyglądać podobnie, ale mogą znacznie różnić się potencjałem dawania

przerzutów i reakcją na zastosowane leczenie. Praca Neto i in. (2010) uwzględniła właśnie te dwa stopnie, analizując czy różnią się one pod względem morfologii jąder i cytoplazmy. Dla każdego pacjenta (28 psów) przeanalizowano po 100 komórek, oceniając zarówno jądra, jak i cytoplazmę. Mierzone parametry obejmowały: pole powierzchni i obwód jądra, pole powierzchni i obwód całej komórki, pole powierzchni cytoplazmy (obliczone jako różnica pomiędzy powierzchnią cytoplazmy i jądra) i współczynnik okrągłości dla jądra i cytoplazmy (w celu oznaczenia regularności kształtu), a także stosunek powierzchni jądra do cytoplazmy (N/C). Uzyskane wyniki zestawiono ze stopniem złośliwości histologicznej. Parametry dotyczące całej komórki nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy stopniami złośliwości histologicznej, co tłumaczono obecnością ziarnistości cytoplazmatycznych, które mogą zwiększać objętość komórki (ziarnistości są często liczne w komórkach mastocytozy II stopnia złośliwości i nieliczne w guzach III stopnia). Istotne różnice odnotowano natomiast dla powierzchni cytoplazmy, gdzie guzy stopnia II cechowały się większą średnią powierzchnią cytoplazmy komórek niż guzy III stopnia. Guzy zakwalifikowane jako MCT III stopnia różniły się istotnie wyłącznie w zakresie pola powierzchni i obwodu jądra komórkowego. Również stosunek N/C był istotnie wyższy w MCT III stopnia. Współczynnik okrągłości nie wykazywał istotnych różnic w zależności od stopnia złośliwości.

Oprócz klasycznej analizy morfometrycznej w literaturze możemy znaleźć badania obejmujące bardziej zaawansowane techniki analiz, takie jak stereologia. Marcos i in. (2022) porównali skuteczność metody stereologicznej jako rozwinięcie klasycznej morfometrii oceniając obie metody w kontekście oceny stopnia złośliwości mastocytozy. U 51 pacjentów wykonano co najmniej 100 pomiarów powierzchni jądra (NA) dla każdej z metod: ręcznego obrysu jądra komórkowego (klasyczna morfometria) oraz stereologii 2D, polegającej na zaznaczeniu środka jądra, a następnie tworzeniu dwóch linii, które zaznaczano w miejscu przecięcia z granicą jądra. W 32 przypadkach dostępne było również badanie histopatologiczne co pozwoliło na odniesienie pomiarów do klasyfikacji stopnia złośliwości według dwustopniowej klasyfikacji Kiupel oraz trzystopniowej klasyfikacji Patnaik. W pozostałych przypadkach porównywano wyłącznie efektywność obu metod między sobą. Wykazano wysoki stopień korelacji pomiędzy stereologią a klasyczną morfometrią, przy czym mniej czasochłonna okazała się być stereologia. W odniesieniu do klasyfikacji według Kiupel, średnia NA była wyraźnie większa w mastocytomach high grade niż low grade

niezależnie od metody pomiarowej. W klasyfikacji według Patnaik wykazano istotne różnice NA pomiędzy stopniem III a II i I, jednak nie stwierdzono różnic pomiędzy stopniami I i II.

Należy wspomnieć o istotnym badaniu, które ma znaczenie nie tylko dla samej diagnostyki mastocytozy, lecz także dla oceny przydatności i standaryzacji metod morfometrycznych. W pracy Barbosa i in. (2014) oceniono wartość analizy morfometrycznej pod kątem obiektywności oraz powtarzalności wyników, co ma ogromne znaczenie dla innych prac z zakresu morfometrii, gdzie zazwyczaj pomiary wykonywane były tylko przez jednego obserwatora. W badaniu oceniono 21 preparatów cytologicznych, z czego 11 wybarwiono metodą Diff-Quick, a pozostałe 10 metodą HE. Dla każdego preparatu wykonano 100 pomiarów pola powierzchni i obwodu jąder komórkowych a pomiary zostały wykonane i zebrane przez dwóch niezależnych obserwatorów, w dwóch różnych odstępach czasowych. Analiza statystyczna wykazała brak istotnych różnic zarówno między obserwatorami, jak i czasem wykonywanych pomiarów, niezależnie od zastosowanej metody barwienia. Nie wykazano także interakcji pomiędzy czasem a osobą wykonującą badanie (ang. interaction), oznacza to, że różni obserwatorzy uzyskiwali podobne wyniki niezależnie od momentu ich pomiaru. Na tej podstawie można uznać, że w przypadku MCT morfometria jest metodą powtarzalną i obiektywną. Zwrócono również uwagę na same wartości obu parametrów jąder komórkowych, które różniły się między sobą w zależności od zastosowanego barwienia. Wymiary jąder w preparatach barwionych metodą Diff-Quick cechowały się wyższymi wartościami, tłumaczono to wpływem wybranej techniki przygotowywania materiału, podobnie jak w badaniu Strefezzi i in. (2003).

3.2.2.2. Ocena wartości prognostycznej

Innym istotnym kierunkiem badań nad zastosowaniem morfometrii jest przydatność w ocenie prognostycznej guzów z komórek tłuszczowych u psów. Analizowano to, m.in. w kontekście oceny ryzyka pojawienia się przerzutów do węzłów chłonnych (Marconato i in., 2008) oraz całkowitego czasu przeżycia psów z rozpoznaniem guza z komórek tłuszczowych (Pinto de Azevedo, 2022; Strefezzi i in., 2009). Każde z tych badań uwzględniło konieczność opracowania metody umożliwiającej ocenę biologicznego zachowania guza jeszcze na etapie badania

cytologicznego. W badaniu Marconato i in. (2008), jednym z głównych celów było określenie czy wartości morfometryczne jąder komórkowych różnią się pomiędzy poszczególnymi jednostkami chorobowymi, w których obecne są komórki tuczne, a także, czy obecność pojedynczych lub nielicznych komórek tucznych w węźle chłonnym może wskazywać na ich nowotworowy charakter i stanowić tzw. „mikroprzerzuty”. Do badania morfometrycznego włączono psy z procesem o charakterze zapalnym lub zakaźnym (m.in. zapaleniem skóry, leiszmaniozą i toksoplazmozą) oraz psy z pojedynczym guzem z komórek tucznych skóry. Grupa z mastocytomą została dodatkowo podzielona na trzy podgrupy: 1) przypadki bez obecności komórek tucznych w węźle chłonnym, 2) przypadki z obecnością pojedynczych/nielicznych mastocytów w węźle chłonnym oraz 3) przypadki z oczywistym przerzutem MCT do węzła chłonnego. Dla każdego z 14 przypadków oceniono średnią powierzchnię jądra (MNA), średni obwód jądra (MNP), stosunek największej do najmniejszej średnicy (LS), średni współczynnik jądra (FF) oraz współczynnik zmienności powierzchni jądra (NACV). Uzyskano istotne statystycznie różnice dla parametrów MNA i MNP, które były wyższe w grupie mastocytom z przerzutami w porównaniu do grupy psów z chorobą o charakterze zapalnym lub zakaźnym. Istotną obserwacją było to, że wartości MNA i MNP były podobne w przypadkach dla mastocytom z pojedynczymi/nielicznymi komórkami w węźle chłonnym oraz oczywistymi przerzutami w węźle chłonnym. Autorzy zasugerowali, że może to wskazywać na charakter nowotworowy tych komórek i może stanowić podstawę do określenia, że są to komórki o charakterze „mikroprzerzutów”. Dodatkowo, współczynniki LS i FF w grupie z obecnością pojedynczych/nielicznych mastocytów, wykazywały bardziej eliptyczny kształt jąder, co również podkreślono, może być cechą potwierdzającą ich nowotwory charakter.

W odniesieniu do wartości prognostycznej przeżycia psów z rozpoznany guzem z komórek tucznych w badaniu Strefezzi i in. (2009) oceniono morfometrię jądra komórkowego jako wskaźnik prognostyczny, niezależny od histopatologicznego stopnia złośliwości MCT. U 29 pacjentów z histopatologicznie potwierdzonym MCT skóry wykonano po 100 pomiarów średniej powierzchni jądra (MNA) na każdy preparat w dwóch barwieniach cytologicznych: Romanowskiego oraz HE. Obserwacja kliniczna pacjentów leczonych wyłącznie chirurgicznie trwała co najmniej 60 dni. W obu metodach barwienia stwierdzono, że im wyższa wartość MNA, tym krótszy całkowity czas przeżycia psów. Dla barwienia HE ustalono wartość graniczną MNA

(cut-off), powyżej której guzy klasyfikowano jako mastocytozy wysokiego stopnia złośliwości, a poniżej jako niskiego stopnia złośliwości. Psy z guzami o niższej wartości MNA wykazywały dłuższy całkowity czas przeżycia niż psy z mastocytomami o większej powierzchni jądra. Analogiczne zależności zaobserwowano dla preparatów barwionych metodą Romanowskiego. Ponadto, wartości MNA pozwalały na różnicowanie guzów histopatologicznie zakwalifikowanych do stopnia III od guzów stopnia I i II. Co istotne, również w obrębie stopnia II według klasyfikacji Patnaik, analiza rozmazów wykazała istotne statystycznie różnice w długości przeżycia między guzami zaklasyfikowanymi morfometrycznie jako niskiego i wysokiego stopnia złośliwości, ale wyłącznie dla preparatów barwionych metodą Romanowskiego. Tym samym MNA okazało się istotnym wskaźnikiem rokowniczym także w obrębie jednej klasy histologicznej. W odróżnieniu od pracy Strefezzi i in. (2009), w doniesieniu Pinto de Azevedo (2022) zastosowano metodę stereologiczną do pomiaru średniej powierzchni jądra (MNA) w około 100 komórkach, zestawiając wyniki z czasem przeżycia psów. Stwierdzono, że wyższe wartości MNA były istotnie związane z krótszym całkowitym czasem przeżycia.

3.2.3. Zastosowanie cytomorfometrii w zmianach rozrostowych jamy nosowej u psów

Jak dotąd nie opublikowano wyników badań wykorzystujących pomiary cytomorfometryczne do różnicowania mikroskopowego zmian rozrostowych zlokalizowanych w obrębie jamy nosowej i zatok przynosowych u psów.

3.3. Podsumowanie

Cytomorfometria całych komórek i jąder komórkowych znajduje coraz szersze zastosowanie w diagnostyce i ocenie rokowania nowotworów u psów, m.in. guzów gruczołu sutkowego, skóry i jej przydatków, nowotworów jamy ustnej czy płynów wysiękowych. Najczęściej ocenianymi parametrami w takich przypadkach są: średnia powierzchnia jądra (MNA), średni obwód jądra (MNP), średnia średnica jądra (Dmean) i współczynnik okrągłości jądra (NR), z których większość wykazywała wyższe wartości w nowotworach złośliwych i przerzutujących. W chłoniakach morfometria pozwalała różnicować zmiany nowotworowe od odczynowych, natomiast pole powierzchni, średnica, promień i obwód jądra komórkowego były związane z czasem przeżycia od rozpoznania do remisji. W przypadku mastocytozy parametr MNA

korelował ze stopniem złośliwości i czasem przeżycia, zwłaszcza w guzach stopnia II według Patnaik, a wartości graniczne MNA pozwalały przewidzieć rokowanie. Pomimo różnorodności metod barwienia i ograniczonej liczby przypadków w większości badań cytomorfometria może wspierać rozpoznanie typu i stopnia złośliwości nowotworu. W patologii kluczowym staje się znalezienie małoinwazyjnej metody, która pozwoli na szybsze postawienie diagnozy, jak i określi potencjał rokowniczy danej zmiany, jeszcze przed wykonaniem zabiegu chirurgicznego i pobraniem tkanek do badania histopatologicznego.

4. Cele, zakres pracy oraz hipotezy badawcze

4.1. Cele pracy

1. Ocena przydatności analizy cytomorfometrycznej jako narzędzia wspomagającego różnicowanie pomiędzy nienowotworowymi zmianami rozrostowymi a nowotworami złośliwymi nabłonka w jamie nosowej u psów.
2. Ocena przydatności analizy cytomorfometrycznej w prognozowaniu całkowitego czasu przeżycia u psów z chłoniakiem centroblastycznym poddanych chemioterapii.
3. Ocena przydatności analizy cytomorfometrycznej w prognozowaniu całkowitego czasu przeżycia u psów z chłoniakiem T- komórkowym wielopostaciowym mieszanym.
4. Ocena zastosowania parametrów cytomorfometrycznych jako czynnika wspomagającego analizę występowania przerzutów guza komórek tucznych o niskim stopniu złośliwości histologicznej (I stopień Kiupel, low grade) do regionalnych węzłów chłonnych u psów.

4.2. Zakres pracy

Praca obejmuje ocenę przydatności analizy cytomorfometrycznej w diagnostyce i prognozowaniu przebiegu wybranych nowotworów u psów. Materiał badany stanowiły próbki uzyskane od pacjentów z nienowotworowymi rozrostami i nowotworami nabłonka jamy nosowej, z chłoniakiem centroblastycznym, z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym oraz z mastocytomą o niskim stopniu złośliwości histologicznej. Główną metodą była analiza cytomorfometryczna, natomiast metody pomocnicze (immunocytochemia, histopatologia, barwienia dodatkowe) wykorzystano wyłącznie do diagnostycznej klasyfikacji materiału. Praca nie obejmowała innych typów nowotworów ani innych metod diagnostycznych.

4.3. Hipotezy badawcze

1. Analiza cytomorfometryczna umożliwia różnicowanie pomiędzy trzema głównymi typami zmian w obrębie jamy nosowej u psów: zapaleniem nieswoistym, zapaleniem grzybiczym i nowotworami złośliwymi nabłonka.
2. Parametry cytomorfometryczne komórek chłoniaka centroblastycznego istotnie korelują z całkowitym czasem przeżycia psów z tym nowotworem poddanych chemioterapii.
3. Parametry cytomorfometryczne komórek chłoniaka T-komórkowego wielopostaciowego mieszanego istotnie korelują z całkowitym czasem przeżycia psów z tym nowotworem.
4. Parametry cytomorfometryczne komórek mastocytozy niskiego stopnia złośliwości histologicznej (low grade) mogą być wykorzystywane do szacowania ryzyka występowania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych u psów.

5. Materiały i metodyka badań

5. 1. Pacjenci w grupach badanych

Materiał biologiczny wykorzystany w badaniach własnych został pobrany od pacjentów w ramach standardowych procedur medycznych, gdzie wszelkie badania, w tym badanie kliniczne, badania laboratoryjne i inne dodatkowe testy diagnostyczne (biopsja, badanie rentgenowskie, tomografia komputerowa, badanie endoskopowe) były integralną częścią procesu rozpoznania i leczenia pacjentów. Informacje na temat pacjentów wykorzystane do badań własnych zostały pobrane z baz danych Przychodni Weterynaryjnej Białobrzeska oraz Kliniki Małych Zwierząt Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie. Czynności dotyczące diagnostyki mikroskopowej, w tym barwień cytologicznych, histopatologicznych i barwienia immunocytochemicznego oraz obserwacje mikroskopowe cytologiczne, histopatologiczne i morfometryczne zostały przeprowadzone w Zakładzie Patologii Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie. Zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi oraz wytycznymi prawa Rzeczypospolitej Polskiej dotyczącej aspektów etycznych prowadzeń badań naukowych z udziałem zwierząt; ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz.U. 2015, poz. 266), pobranie materiału w takich przypadkach nie wymagało uzyskania zgody lokalnej Komisji Etycznej, ponieważ materiał ten został pozyskany w celu diagnostycznym i terapeutycznym, a nie wyłącznie na potrzeby badań naukowych. Dodatkowo, w czasie zbierania informacji klinicznych nie były notowane ani utrwalane żadne dane wrażliwe.

5.2. Materiał badany i procedura pobrania materiału

Materiał do badań stanowiły próbki uzyskane od psów, pacjentów Przychodni Weterynaryjnej Białobrzeska w Warszawie dla chłoniaków centroblastycznych, chłoniaków T-komórkowych wielopostaciowych mieszanych oraz w guzów z komórek tucznych. Dodatkowo, próbki obejmujące zmiany patologiczne z jamy nosowej pochodziły od psów z przewlekłe utrzymującymi się objawami wskazującymi na proces patologiczny w obszarze jamy nosowej pochodziły od pacjentów Kliniki Małych Zwierząt Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie.

5.2.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej

Materiał z jam nosowych został pobrany od pacjentów skierowanych do Kliniki Małych Zwierząt IMW przez lekarzy weterynarii z innych zakładów leczniczych celem przeprowadzenia dodatkowych badań diagnostycznych dla zbadania przyczyny przewlekłej choroby jamy nosowej (objawy kliniczne utrzymujące się od co najmniej jednego miesiąca, w tym kichanie, duszność, patologiczny szmer podczas oddychania, obecność wysięku z jamy nosowej kichaniem). Przed wykonaniem badania endoskopowego jamy nosowej (badanie rynoskopowe) u każdego pacjenta wykonano podstawowe badanie biochemiczne i morfologiczne krwi, badanie RTG i/lub tomografię komputerową jamy nosowej. Do zabiegu endoskopii każdy pies został poddany znieczuleniu ogólnemu opartemu na kombinacji midazolamu (I.M. 0,005mg/kg, Polfa Warszawa), medetomidyny (I.M. 0,005-0,03 mg/kg Orion Pharma), butorfanolu (I.M. 0,1 mg/kg, Richter Pharma AG) i propofolu (I.V. 2-4 mg/kg, B. Braun). Badanie zostało przeprowadzone przy użyciu sztywnego endoskopu do rynoskopii (XP 700/33 Nopa C, Nopa Instruments, Niemcy) i cienkiego, giętkiego endoskopu (Olympus XP20, Olympus Corporation, Japonia) do rynoskopii wstecznej. Obie jamy nosowe zostały dokładnie zbadane makroskopowo, w trakcie badania pobrano co najmniej trzy próbki błony śluzowej nosa i/lub patologicznych mas tkankowych do badania histopatologicznego. Podczas tej samej procedury pobierano próbki do rutynowego badania cytologicznego, wykonując wymazy przy użyciu jałowej wymazówki, z której materiał przenoszono na szkiełko mikroskopowe metodą rolowania. Preparaty cytologiczne utrwalano wstępnie poprzez suszenie na wolnym powietrzu, następnie rozmazy były barwione lub przechowywane do momentu barwienia, a następnie poddane barwieniu.

5.2.2. Chłoniaki centroblastyczne

Materiał do badań cytologicznych pobierano od pacjentów podczas rutynowych wizyt w lecznicy weterynaryjnej przy użyciu biopsji cienkoigłowej nieaspiracyjnej z węzłów chłonnych oraz biopsji cienkoigłowej aspiracyjnej z innych lokalizacji. W przypadku uogólnionego powiększenia węzłów chłonnych obwodowych materiał pobierano z co najmniej dwóch węzłów chłonnych, łącznie pobrano co najmniej 6 rozmazów. Od niektórych pacjentów próbki pobierano także z wątroby, śledziony, guzów skórny, guzów śródpiersia oraz mas w jamie brzusznej, a także ze szpiku

kostnego. Rozmazy cytologiczne utrwalano poprzez suszenie na wolnym powietrzu, następnie rozmazy były barwione lub przechowywane do momentu barwienia, a następnie poddane barwieniu. Przeglądając karty pacjentów uzyskano również informacje dotyczące całkowitego czasu przeżycia, definiowanego jako okres od postawienia rozpoznania do śmierci lub eutanazji wynikających z postępu choroby nowotworowej.

5.2.3. Chłoniaki T-komórkowe wielopostaciowe mieszane

Materiał do badań cytologicznych pobierano od pacjentów podczas rutynowych wizyt w lecznicy weterynaryjnej przy użyciu biopsji cienkoigłowej nieaspiracyjnej z węzłów chłonnych oraz biopsji cienkoigłowej aspiracyjnej z innych lokalizacji. W przypadku uogólnionego powiększenia węzłów chłonnych obwodowych materiał pobierano z co najmniej dwóch węzłów chłonnych, łącznie pobrano co najmniej 6 rozmazów. Od niektórych pacjentów próbki pobierano także z wątroby, śledziony, guzów skórnych, guzów śródpiersia oraz mas w jamie brzusznej a także ze szpiku kostnego. Rozmazy cytologiczne utrwalano poprzez suszenie na wolnym powietrzu, następnie rozmazy były barwione lub przechowywane do momentu barwienia, a następnie poddane barwieniu. Przeglądając karty pacjentów uzyskano również informacje dotyczące całkowitego czasu przeżycia, definiowanego jako okres od postawienia rozpoznania do śmierci lub eutanazji wynikających z postępu choroby nowotworowej.

5.2.4. Guzy z komórek tłuszczowych

Materiał do badań pobierano od pacjentów podczas rutynowej wizyty w lecznicy weterynaryjnej z rozpoznanymi guzami skóry metodą biopsji cienkoigłowej aspiracyjnej, a z węzłów chłonnych wartowniczych w stosunku do miejscach, gdzie występowała zmiana – metodą biopsji cienkoigłowej nieaspiracyjnej. Z każdego guza oraz węzła chłonnego pobierano co najmniej 3-5 rozmazów. Rozmazy cytologiczne utrwalano poprzez suszenie na wolnym powietrzu, następnie rozmazy były barwione lub przechowywane do momentu barwienia, a następnie poddane barwieniu. Przeglądając karty pacjentów uzyskano również informacje dotyczące występowania lub nie przerzutów do regionalnych lub odległych węzłów chłonnych. Po wstępnym rozpoznaniu cytologicznym, zmiany skórne oraz węzły chłonne były poddawane

resekcji podczas zabiegu chirurgicznego. Materiał tkankowy był utrwalany w 10% roztworze formaliny z przeznaczeniem do badania histopatologicznego.

5.3. Barwienia preparatów cytologicznych

5.3.1. Barwienie metodą Giemsy

Preparaty cytologiczne utrwalone wstępnie poprzez suszenie na wolnym powietrzu, poddano właściwemu utrwaleniu w 70% alkoholu metylenowym przez 5-15 minut. Barwienie przeprowadzano przez 15 minut, stosując świeżo przygotowany barwnik Giemsy (Analab®) zgodnie z zaleceniami producenta w proporcji 1:10, poprzez zmieszanie 1 ml barwnika Giemsy z 9 ml wody destylowanej. Po tym czasie barwnik był usuwany, a preparat przepłukany wodą bieżącą i pozostawiony do wysuszenia.

5.3.2. Barwienie błękitem toluidyny

Preparaty cytologiczne wcześniej barwione metodą Giemsy, poddano procesowi odbarwienia i ponownego barwienia. W pierwszej kolejności umieszczono je w alkoholu etylowym absolutnym (99,8%) I i II, po 3-5 minut każdy, a następnie w etanolu 96% przez kolejne 3-5 minut. Po odłuszczeniu preparaty różnicowano w czystym roztworze alkoholu kwaśnego i płukano w wodzie destylowanej przez 3-5 minut, po tym czasie przeprowadzono barwienie w 1% roztworze błękitu toluidyny (Analab®) przez 5-15 minut, po czym ponownie opłukiwano je w wodzie destylowanej. Na koniec preparaty różnicowano w etanolu 96%, odwadniano przez 5 minut w alkoholu etylowym absolutnym (99,8%) i zanurzono w ksylenie również na 5 minut. Na koniec preparaty zamykano w balsamie kanadyjskim, przykrywając szkiełkiem nakrywkowym.

5.3.3. Barwienie immunocytochemiczne

Do barwienia immunocytochemicznego wykorzystano rozmazy, które początkowo utrwalono przez suszenie na wolnym powietrzu, a następnie przez zanurzenie ich na 10 minut w zimnym acetonie (4°C) i przechowywano je w temperaturze -20°C do czasu rozpoczęcia barwienia. Do określenia immunofenotypu komórek chłoniaka zastosowano gotowe do użycia komercyjne przeciwciała: monoklonalne anti-CD79α (FLEX, Monoclonal Mouse Anti-Human,

Dako, klon JCB117) oraz poliklonalne anty-CD3 (FLEX, Polyclonal Rabbit Anti-Human, Dako), a sam proces immunofenotypowania został przeprowadzony zgodnie z metodami opisanymi przez Caniatti i in. (1996) oraz Sapierzyński (2010). Do barwienia wykorzystano po dwa rozmazy z każdego przypadku – jeden rozmaz inkubowano z przeciwciałem anty-CD79 α , a drugi z przeciwciałem anty-CD3. Rozmazy najpierw inkubowano przez 5 minut w roztworze Tris (Tris Buffered Saline, pH 8.0, Sigma-Aldrich), a następnie w 3% roztworze nadtlenu wodoru przez 15 minut. Po trzykrotnym przepłukaniu wodą destylowaną, ponownie dodawano roztwór Tris, a następnie aplikowano pierwszorzędne przeciwciała (monoklonalne anty-CD79 α , poliklonalne anty-CD3) zgodnie z zaleceniami producenta. Z kolei preparaty pozostawiono na 60 minut w temperaturze pokojowej w warunkach zapobiegających wyschnięciu. Preparaty po trzykrotnym płukaniu wodą destylowaną ponownie zalewano roztworem Tris na 5 minut i наносzono przeciwciała drugorzędowe- kozie przeciwciała skierowane przeciwko przeciwciałom króliczym i mysim (EnVision FLEX/HRP, Dako). Inkubację prowadzono w komorze przez 30 minut. Po ponownym trzykrotnym płukaniu wodą destylowaną, zaaplikowano roztwór tetra chlorowodoru diaminobenzyny (EnVision FLEX DAB+ Chromogen, Dako) zmieszany z nadtlakiem wodoru (EnVision FLEX SubstrateBuffer, Dako) zgodnie z zaleceniami producenta, pozostawiając roztwór na 1 minutę. Ostatecznie preparaty zostały wybarwione hematoksyliną (EnVision FLEX Hematoxylin, Dako) przez 10 minut i na krótko zanurzone w jednoprocetowym stężonym kwasie solnym (kwaśnym alkoholu). Po dokładnym spłukaniu wodą przez 15 minut próbki odwadniano i zamykano w DPX.

Kontrola pozytywna i negatywna. Jako kontrolę pozytywną dla przeciwciał anty-CD3 i anty-CD79 α wykorzystano rozmazy komórek pobranych z węzłów chłonnych, które wykazywały odczynowy rozrost tkanki limfoidalnej, kontrolę negatywną wykonano z użyciem roztworu Tris zamiast przeciwciała pierwotnego, a sam proces barwienia był taki sam jak dla barwienia właściwego.

5.4. Barwienia histopatologiczne

5.4.1. Przygotowanie preparatów parafinowych

Tkanki pobrane podczas zabiegu rynoskopii lub zabiegu chirurgicznego resekcji zmian umieszczano w 10% zbuforowanym roztworze formaliny. Ilość użytego

utrwalacza była co najmniej dziesięciokrotnie większa niż objętość pobranej tkanki. Utrwalanie prowadzono w temperaturze pokojowej (18 do 22°C) przez okres od 12 do 24 godzin. Po procesie utrwalania tkanki zostały odpowiednio przycięte i umieszczone w kasetkach histologicznych, a następnie zostały dokładnie wypłukano pod strumieniem zimnej, bieżącej wody. Płukanie trwało od 6 do 12 godzin. Następnie przeprowadzono proces odwadniania, materiał stopniowo przenoszono przez roztwory alkoholu etylowego o narastającym stężeniu: 70%, 80%, 90%, 96% oraz alkoholu etylowym absolutnym I i II (99,8%), w każdym z alkoholi materiał pozostawiono na 2 godziny. Po zakończeniu odwadniania tkanki prześwietlono w czystym ksylenie I oraz ksylenie II przez 2 godziny w każdym, w temperaturze pokojowej. Zatapianie materiału wykonano etapowo, najpierw tkanki umieszczano w mieszaninie parafiny i ksylenu w stosunku 1:1 i inkubowano w temperaturze 37°C przez 2 do 3 godzin. Kolejno tkanki przeniesiono do czystej parafiny niskotopliwej (o temperaturze topnienia poniżej 50°C) na 2 godziny, a następnie do czystej parafiny wysokotopliwej (56-56°C) również na 2 godziny. Cały proces przeprowadzono w łaźni grzewczej. Po zatapianiu bloczki schłodzono w zimnej wodzie i po zestaleniu parafiny skrawano na mikrotomie uzyskując skrawki o grubości 4 mikrometrów. Gotowe skrawki przenoszono pędzelkiem namoczonym wodą destylowaną do naczynia z ciepłą wodą destylowaną i po wyprostowaniu nanoszono je na odtłuszczone szkiełka podstawowe pokryte politlenkiem lizyny. Na koniec preparaty suszono na stoliku grzewczym w temperaturze 37°C przez około 30 minut.

5.4.2. Barwienie hematoksyliną i eozyną

Preparaty umieszczono w dwóch roztworach ksylenu, każdy przez 10 minut. Następnie zanurzano je w alkoholu etylowym absolutnym I i II (99,8%) przez 5 minut każdy, po czym kontynuowano proces w alkoholu 96% przez 5 minut oraz w alkoholu 70% przez kolejne 5 minut. Po tym etapie szkiełka opłukiwano wodą destylowaną. Proces barwienia przeprowadzono z użyciem hematoksyliny Ehrlicha (Analab®) przez 10 minut, następnie preparaty przepłukiwano pod bieżącą wodą i różnicowano w kwaśnym alkoholu. Następnie preparaty ponownie płukano pod bieżącą wodą przez 10 minut i barwiono eozyną Y (Sigma-Aldrich®) przez 5 minut. Po zakończeniu barwienia, preparaty opłukiwano wodą destylowaną i odwadniano w roztworach alkoholi o rosnących stężeniach: 70%, 80%, 90%, 96%, zanurzając je w każdym przez 5 minut. Kolejno preparaty zanurzano w alkoholu etylowym absolutnym I i II

(99,8%) przez 5 minut każdy. Po procesie odwadniania preparaty umieszczano w ksylenie na 10 minut i zamykano w balsamie kanadyjskim, przykrywając szkiełkiem nakrywkowym.

5.4.3. Barwienie błękitem toluidyny

Preparaty guza z komórek tucznych przed barwieniem odparafinowano do wody destylowanej i barwiono w 1% roztworze błękitu toluidyny (Analab®), w którym preparaty były umieszczane na 5 do 15 minut, następnie przepłukiwane w wodzie destylowanej i różnicowane w alkoholu 96% przez kilka minut. Kolejno zanurzano je w alkoholu etylowym absolutnym (99,8%) na 5 minut, a następnie w ksylenie przez kolejne 5 minut. Preparaty zamykano w balsamie kanadyjskim przykrywając szkiełkiem nakrywkowym.

5.4.4. Barwienie metodą PAS

Do oceny obecności plechy grzybiczej wycinki tkankowe pobrane z jamy nosowej barwiono metodą PAS. Skrawki parafinowe zanurzano w roztworze kwasu nadjodowego 0,5% (Chempur®) na 5 minut, następnie przepłukiwano je wodą destylowaną przez kolejne 5 minut, następnie preparat umieszczano w odczynniku Schiff (Avantor®) na 15 minut. Po upływie 15 minut szkiełka opłukiwano pod bieżącą wodą przez 10 minut, a następnie barwiono zielenią świetlną (Avantor®) przez 6 minut. Po zakończeniu barwienia szkiełka ponownie płukano pod bieżącą wodą i odwadniano w alkoholu 96% i zamykano w balsamie kanadyjskim szkiełkiem nakrywkowym.

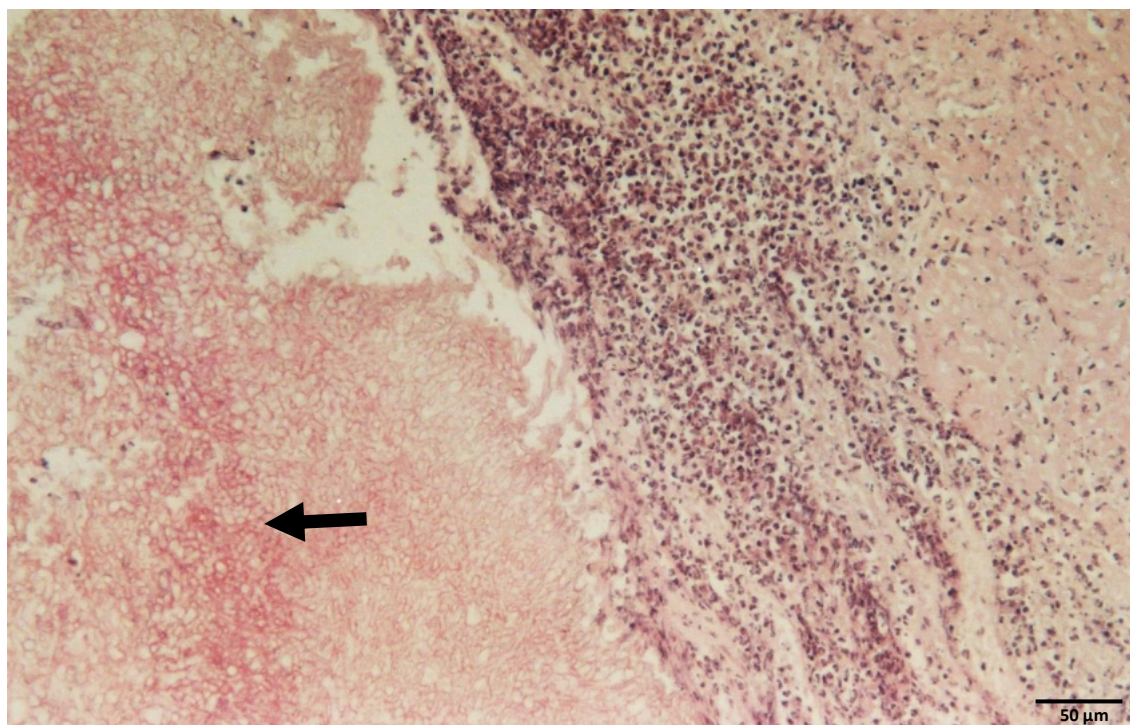
5.5. Ocena mikroskopowa i kryteria rozpoznania

Do oceny preparatów mikroskopowych używano mikroskopu świetlnego Olympus BX41 o okularze 10x/22mm (Olympus Corporation, Japonia) w całkowitym powiększeniu 1000x.

5.5.1 Zmiany rozrostowe w jamie nosowej

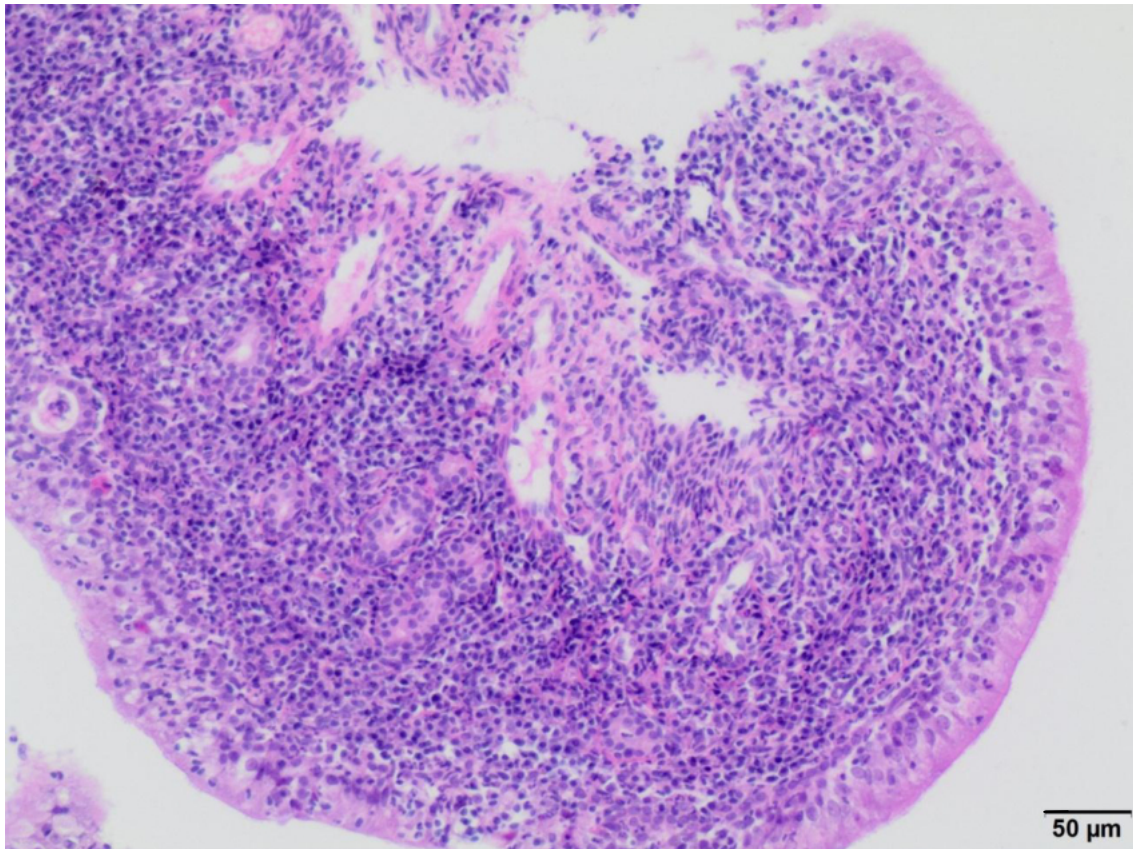
Ocenę zmian przeprowadzono na podstawie badania histopatologicznego, w połączeniu z wynikami badania klinicznego, wynikami badań obrazowych, przebiegu choroby i ewentualnej reakcji na zastosowane leczenie. Wygląd jam nosowych stwierdzono podczas badania endoskopowego w przypadku grzybiczego zapalenia błony śluzowej nosa charakteryzował się obecnością ropnego wysięku zapalnego,

owrzodzeniem i martwicą błony śluzowej, niekiedy z obecnością szarych lub szarozółtych, przypominających plechę nalotów na powierzchni błony śluzowej. W przypadku nowotworów jamy nosowej było to najczęściej obecność patologicznych mas tkankowych, niedrożność jamy nosowej, deformacja i zniszczenie małżowin nosowych, często z obecnością krwawienia z powierzchni zmian. W nieswoistym zapaleniu jamy nosowej obserwowano najczęściej wysięk na powierzchni błony śluzowej jamy nosowej oraz obrzęk błony śluzowej małżowin nosowych. Precyzyjny charakter obserwowanych zmian był oceniany w badaniu histopatologicznym wycinków pobranych w czasie badania rynoskopowego. Grzybicze zapalenie nosa było potwierdzone w przypadku stwierdzenia mieszanego stanu zapalnego błony śluzowej z dominacją wysięku ropno-włóknikowego, z obecnością obszarów martwicy oraz strzępkami grzybni (w badaniu dodatkowym metodą PAS grzybnia wybarwiała się na intensywny czerwony kolor) wrastającej w głąb błony śluzowej, przy jednoczesnym braku utkania o charakterze nowotworowym i braku cech zapalenia nieswoistego (ryc. 9)



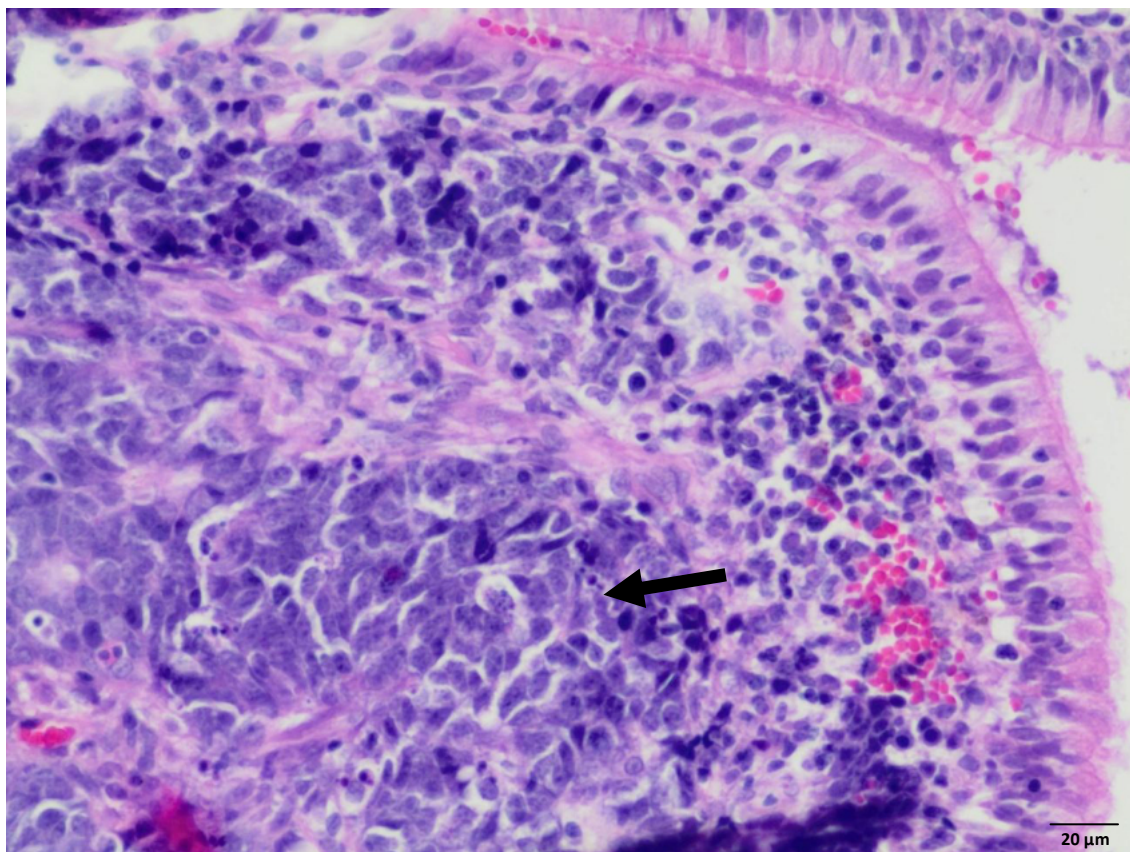
Ryc. 9. Obraz histopatologiczny wycinka błony śluzowej jamy nosowej psa z zapaleniem grzybiczym – widoczny naciek komórkowy, głównie neutrofilowy oraz grzybnia wybarwiona na czerwony kolor (czarna strzałka). Barwienie hematoksylina i eozyna. Powiększenie 100x

Nieswoiste limfocytno-plazmocytno zapalenie nosa było rozpoznawane w przypadku wieloogniskowego, często zlewającego się nacieku zapalnego utworzonego głównie z małych limfocytów i plazmocytów (ryc. 10) niezależnie od jego nasilenia, bez widocznych bakterii, elementów grzybni oraz bez mikroskopowych cech nowotworzenia.



Ryc. 10. Obraz histopatologiczny błony śluzowej jamy nosowej psa z nieswoistym zapaleniem limfocytno-plazmocytnym – widoczny masywny naciek utworzony z limfocytów oraz plazmocytów. Barwienie hematoksylina i eozyna. Powiększenie 100x

Gruczołakoraka/raka diagnozowano na podstawie obecności atypowych komórek o morfologii nabłonkowej z obfitą cytoplazmą, dużymi owalnymi jądrami, widocznymi jąderkami, widoczny lub nie naciek zapalny, niezależnie od jego charakteru i brak elementów plechy grzybiczej (ryc. 11).

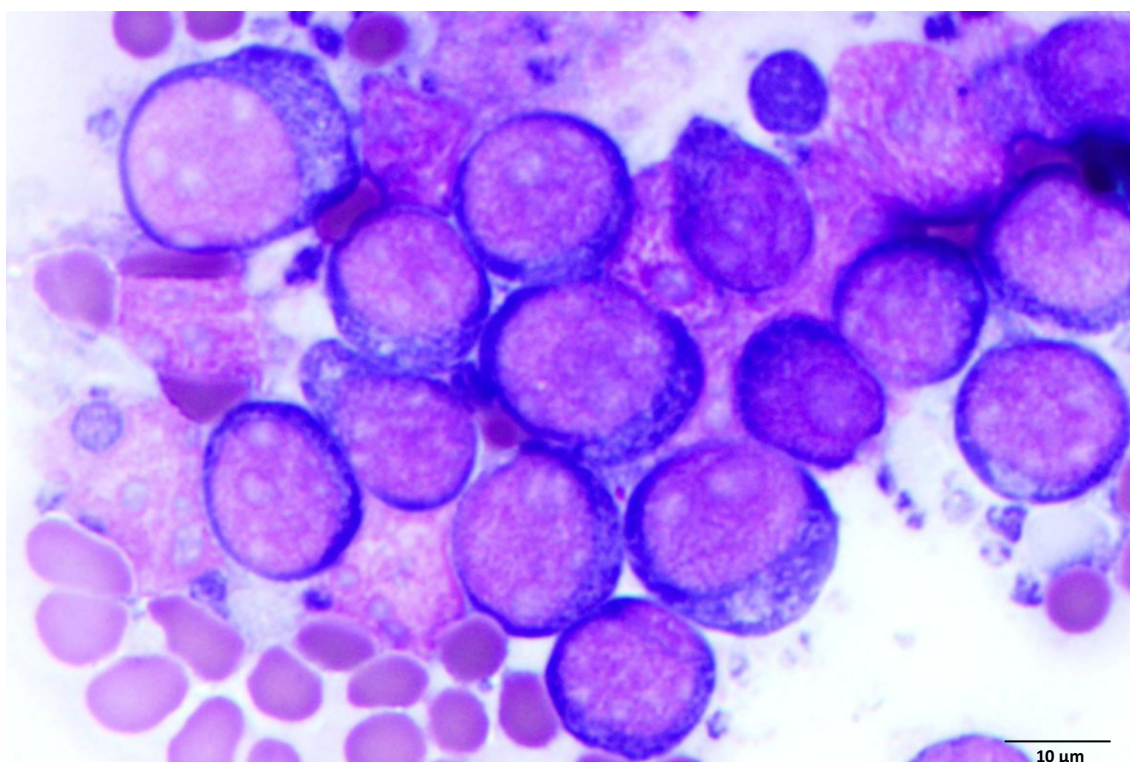


Ryc. 11. Obraz histopatologiczny wycinka zmiany guzowatej małżowin nosowych pobranego w czasie rynoskopii od psa, w badaniu mikroskopowym rozpoznano gruczolakoraka – widoczna proliferacja komórek nisko zróżnicowanego nowotworu (czarna strzałka). Barwienie hematoksylina i eozyna. Powiększenie 200x

5.5.2. Chłoniaki

Wstępne rozpoznanie chłoniaków określano w preparatach cytologicznych barwionych odczynnikiem Giemsy, stosując kryteria opisane przez innych autorów (Fournel-Fleury i in. 1997a, Fournel-Fleury i in. 2002, Ponce i in. 2010). W ramach tej oceny uwzględniono istotne cechy morfologiczne komórek nowotworowych, takich jak odsetek komórek o morfologii blastów, ich wielkość i kształt. Dodatkowo, zwrócono uwagę na kształt i rozmieszczenie jądra komórkowego, jego wygląd, a także strukturę chromatyny jądrowej. Elementem analizy była także liczba, wielkość i rozmieszczenie jąder w jądrze komórkowym. Na podstawie powyższych cech postawiono wstępne rozpoznanie chłoniaka i następnie do dalszych analiz wybrano jedynie te przypadki, których cechy morfologiczne komórek nowotworowych umożliwiały określenie rozpoznania cytologicznego chłoniaka centroblastycznego

lub chłoniaka T-komórkowego wielopostaciowego mieszanego z komórek małych i dużych. Morfologia komórek chłoniaka centroblastycznego charakteryzowała się mieszaną populacją komórek, w tym małych i średniej wielkości blastów z nieregularnie zagęszczoną chromatyną i często z dużym centralnie zlokalizowanym jądrem, centroblastów (20-50% komórek), czyli dużych komórek z wyraźnymi jądrami oraz immunoblastów (<20% komórek), będącymi dużymi komórkami z dużym centralnie zlokalizowanym jądrem (tzw. makrojądrem) – (ryc. 12).

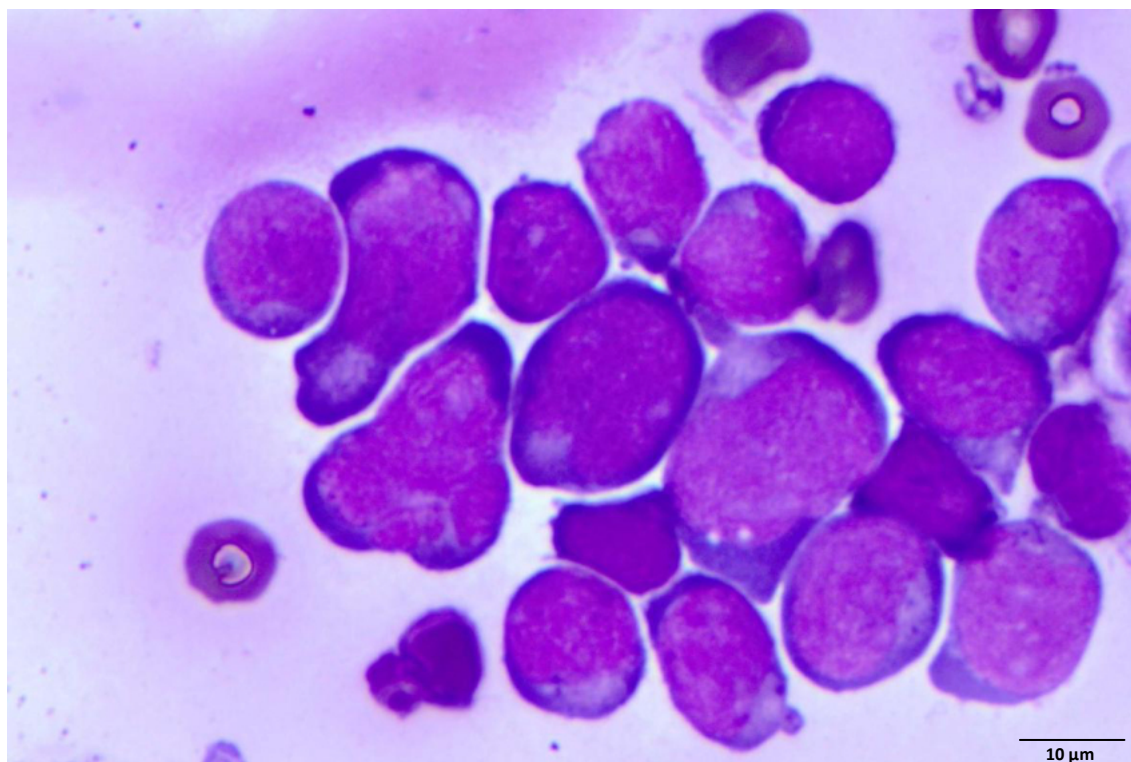


Ryc. 12. Obraz cytologiczny chłoniaka centroblastycznego wielopostaciowego u psa, materiał pobrano z powiększonego węzła chłonnego – widoczne duże blastyczne komórki limfoidalne z dużymi okrągłymi jądrami komórkowymi i licznymi, wyraźnymi jądrami. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x

Chłoniaki T-komórkowe wielopostaciowe mieszane cechowały się zmiennością morfologiczną komórek, komórki były małe, średnie lub duże, często wykazywały nieregularnego kształtu, wcięte lub płątowate jądra komórkowe, cytoplazma komórek była jasna, słabo zasadochłonna, jąderka słabo widoczne (ryc. 13).

W dalszej kolejności oceniono immunofenotyp komórek chłoniaka, tym samym potwierdzając wstępne rozpoznanie podtypu chłoniaka. Oceny dokonywano w oparciu

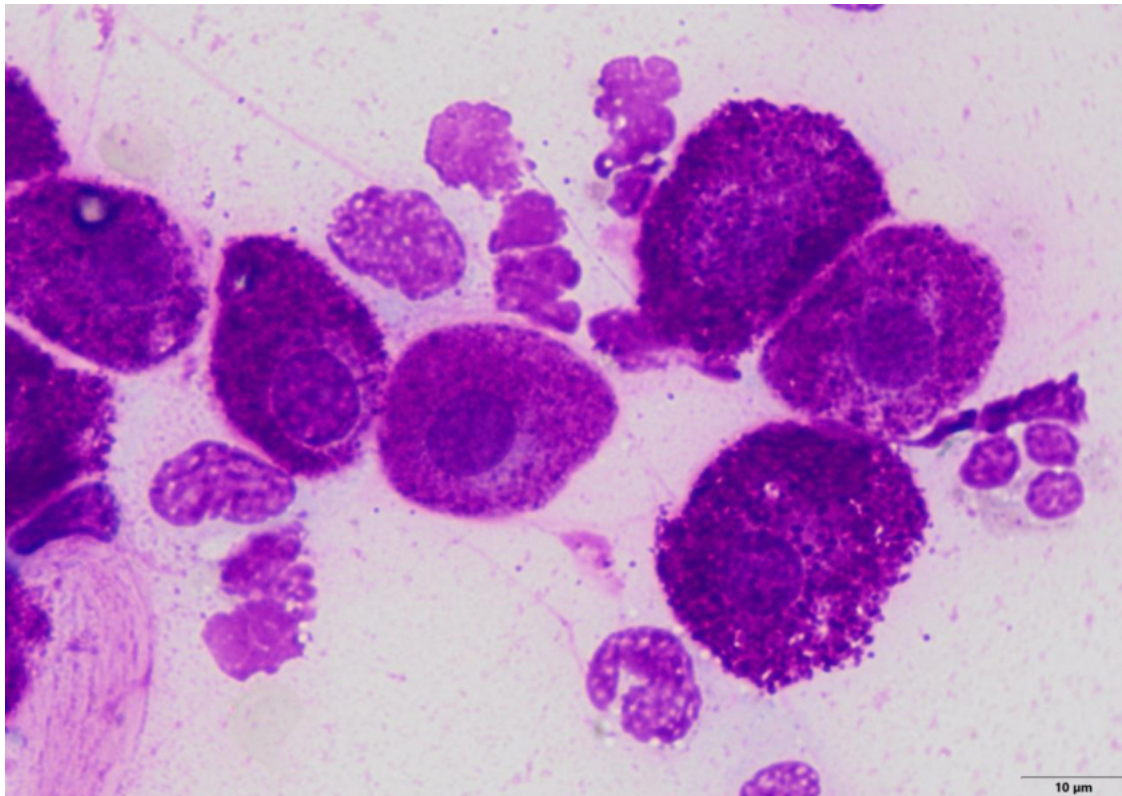
o analizę rozmazów barwionych metodą immunocytochemiczną pod kątem występowania i nasilenia ekspresji antygenu CD3 i antygenu CD79 α . W czasie obserwacji z użyciem mikroskopu świetlnego określono odsetek komórek wykazujących dodatnią reakcję błonową i cytoplazmatyczną anty-CD3 i anty-CD79 α . Chłoniaka z immunofenotypem B rozpoznawano, gdy co najmniej 80% komórek wykazywało ekspresję CD79 α , a mniej niż 20% - ekspresję CD3, natomiast chłoniaka z immunofenotypem T rozpoznawano, gdy co najmniej 80% komórek wykazywało ekspresję CD3, a mniej niż 20% - CD79 α . Ostatecznie, rozpoznanie chłoniaka centroblastycznego (chłoniak z komórek B) lub chłoniaka T-komórkowego o morfologii wielopostaciowej mieszanej rozpoznawano na podstawie łącznej interpretacji wyników badania morfologicznego i wyników barwienia immunocytochemicznego.



Ryc. 13. Obraz cytologiczny chłoniaka T-komórkowego wielopostaciowego mieszanego u psa, materiał pobrano z powiększonego węzła chłonnego – widoczne komórki o różnej wielkości, z dużym lub małym jądrem komórkowym o nieregularnym zarysie i niewielką ilością cytoplazmy. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x

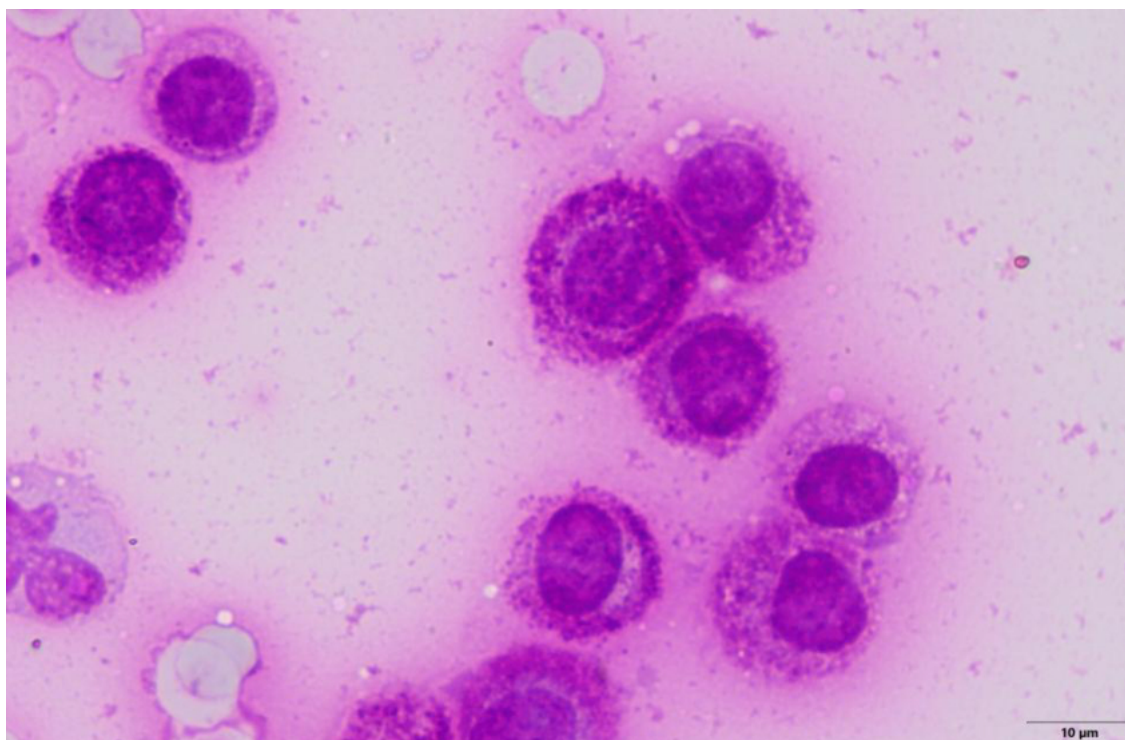
5.5.3. Guz z komórek tucznych

Rozpoznanie cytologiczne oraz szacunkową ocenę stopnia złośliwości cytologicznej guza z komórek tucznych określano w oparciu o kryteria opisane przez Camus i in. (2016) oceniając preparaty barwione odczynnikami Giemsy, a w uzasadnionych przypadkach także barwionych błękitem toluidyny. W ocenie uwzględniono wygląd cytoplazmy i jądra komórkowego, obecność i rozmieszczenie ziarnistości cytoplazmatycznych, obecność figur mitotycznych, a także ocenę stopnia anizokariozy i anizocytozy oraz liczbę jąder komórkowych w komórce. Stopień I złośliwości cytologicznej guza z komórek tucznych nadawano w tych przypadkach, w których komórki wykazywały morfologię zbliżoną do morfologii prawidłowych mastocytów, mających liczne, równomiernie rozmieszczone ziarnistości cytoplazmatyczne, z minimalnie wyrażoną anizocytozą lub/i anizokariozą (ryc. 14).



Ryc. 14. Obraz cytologiczny guza z komórek tucznych I stopnia złośliwości cytologicznej u psa –obecność komórek o wyglądzie komórek tucznych, z widocznymi okrągłymi jądrami komórkowymi o jednakowej wielkości i obfitą cytoplazmą z równomiernie rozmieszczonymi zasadochłonnymi ziarnistościami cytoplazmatycznymi. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x

Przypadki, w których w badaniu cytologicznym stwierdzono dodatkowo co najmniej jedną cechę złośliwości cytologicznej: obecność figur mitotycznych, pleomorfizm jądrowy, komórki dwu- lub wielojądrowe oraz anizokarioza u ponad 50% mastocytów - klasyfikowano jako guzy z komórek tucznych o nieokreślonym stopniu złośliwości I/II (ryc. 15).

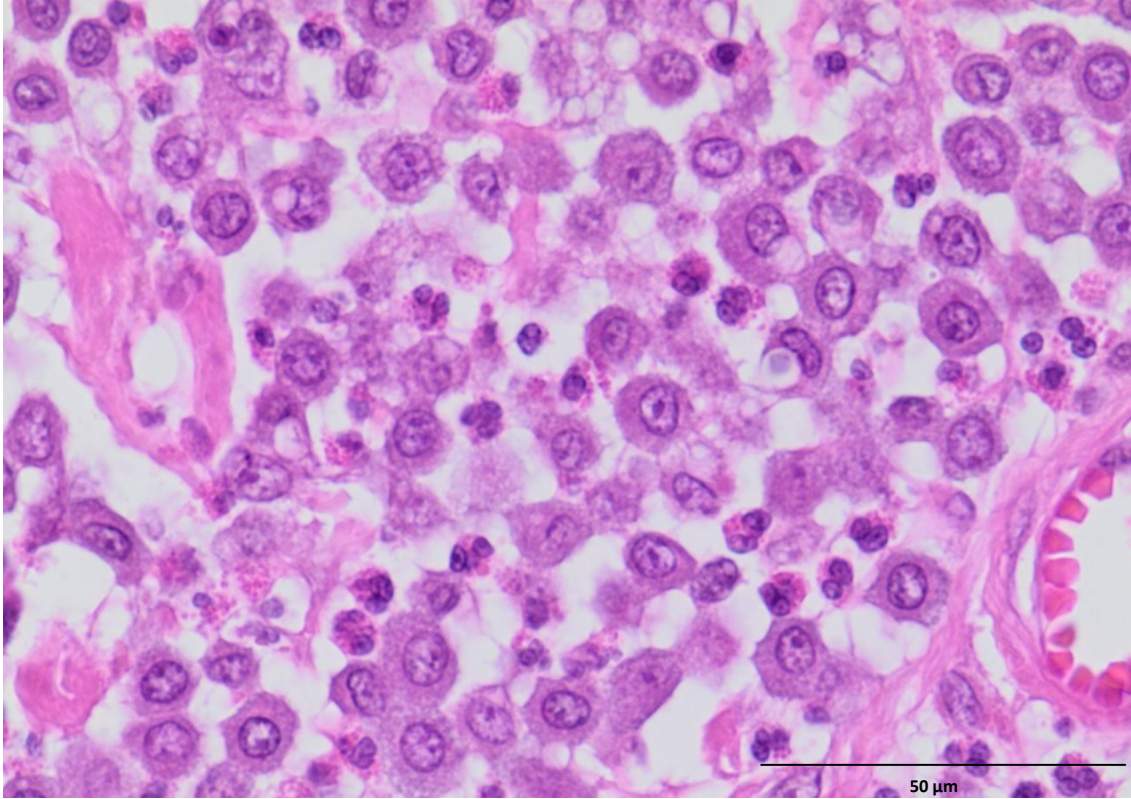


Ryc. 15. Obraz cytologiczny guza z komórek tucznych I/II stopnia złośliwości cytologicznej u psa – widoczne komórki o morfologii mastocytów z okrągłymi jądrami komórkowymi z widoczną anizokariozą o łagodnym nasileniu, w cytoplazmie mniej liczne ziarnistości cytoplazmatyczne. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 1000x

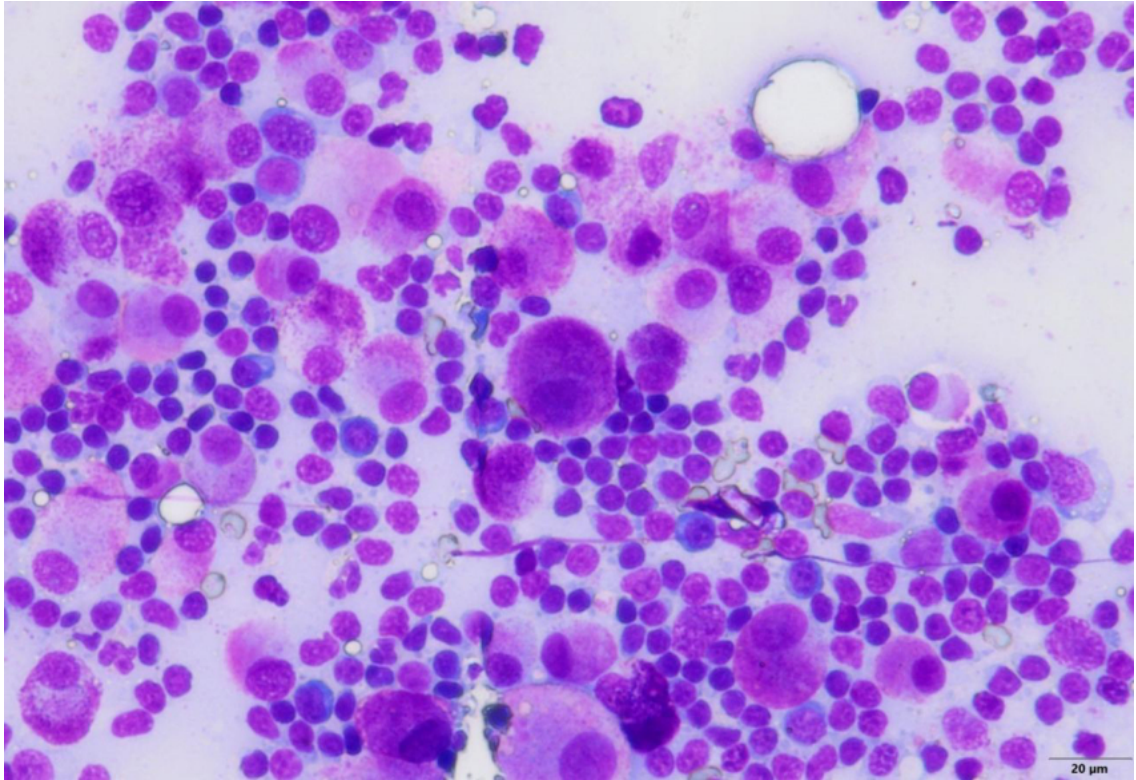
Końcowe rozpoznanie oraz ustalenie stopnia złośliwości histologicznej dokonywano na podstawie badania histopatologicznego guza usuniętego chirurgicznie z dodatkowym barwieniem błękitem toluidyny, klasyfikację przeprowadzano na podstawie kryteriów opisanych przez Kiupel i in. (2011). Do dalszych analiz przeznaczono tylko te przypadki, które w badaniu histopatologicznym określano jako guzy z komórek tucznych o niskim stopniu złośliwości histologicznej (low grade) według skali Kiupel (ryc. 16).

Za przypadki negatywne pod względem przerzutu do węzła chłonnego regionalnego uznawano węzły, w których nie stwierdzono cech mastocytozy w badaniu

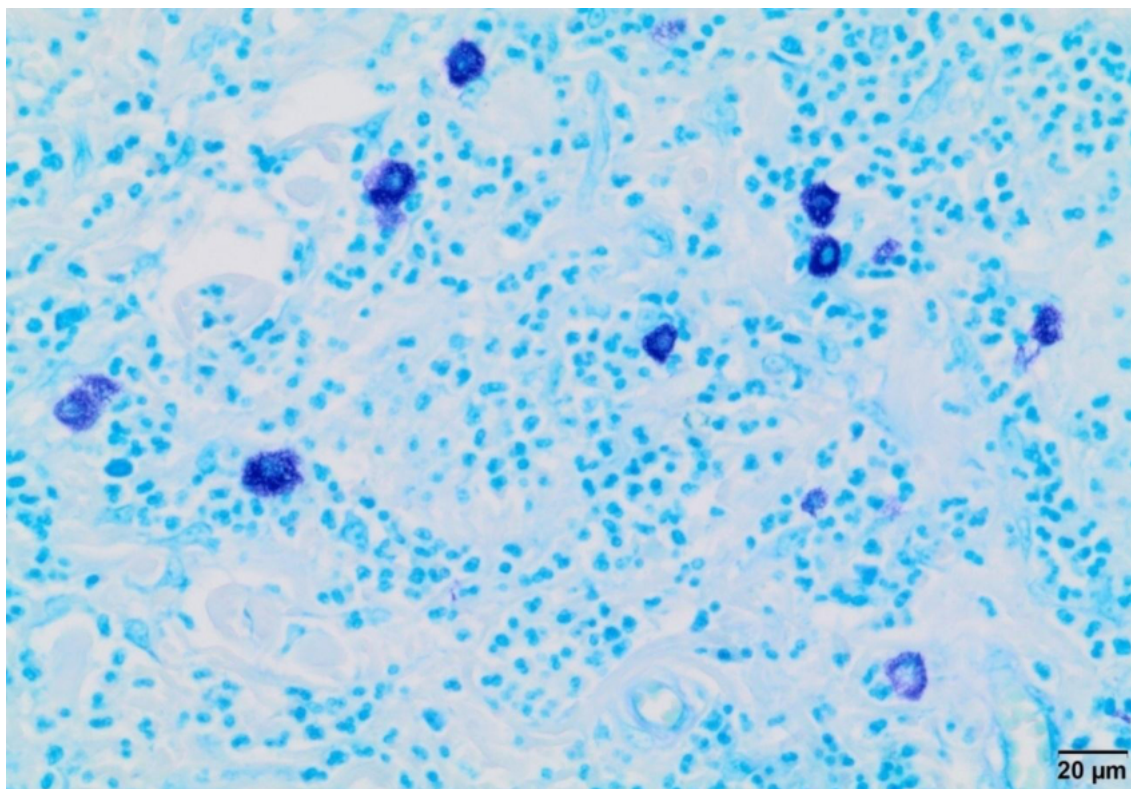
klinicznym, cytologicznym lub histopatologicznym, natomiast za przypadki pozytywne – węzły chłonne powiększone, w których w preparatach cytologicznych lub histopatologicznych wykazano liczne komórki tuczne (ryc. 17-18).



Ryc. 16. Obraz histopatologiczny guza z komórek tucznych o niskim stopniu złośliwości histologicznej według skali Kiupel (low grade) u psa – widoczne skupiska okrągłych do owalnych komórek z zasadochłonnymi, okrągłymi i centralnie położonymi jądrami komórkowymi oraz obfitą i kwasochłonną cytoplazmą. Barwienie hematoksylina i eozyna. Powiększenie 400x



Ryc. 17. Obraz cytologiczny węzła chłonnego z przerzutem guza z komórek tucznych I stopnia złośliwości cytologicznej do regionalnego węzła chłonnego u psa – widoczne liczne nowotworowe komórki tuczne rozproszone pośród komórek limfoidalnych węzła chłonnego. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 400x



Ryc. 18. Obraz histopatologiczny węzła chłonnego z przerzutem guza z komórek tucznych I stopnia złośliwości cytologicznej do regionalnego węzła chłonnego u psa – widoczne komórki z silnie wybarwionymi na kolor granatowy ziarnistościami cytoplazmatycznymi. Barwienie błękitem toluidyny. Powiększenie 200x

5.6. Podział pacjentów na grupy badane

Do grup badanych zakwalifikowano pacjentów, u których ostateczne rozpoznanie cytologiczne/histopatologiczne było jednoznaczne i zostało postawione dwukrotnie przez tego samego patologa w odstępie od 1 do 2 miesięcy (podczas drugiej oceny patolog nie miał informacji o rozpoznaniu postawionym przez siebie podczas pierwszego badania).

5.6.1. Psy ze zmianami rozrostowymi w jamie nosowej

Pacjenci do tej grupy byli kwalifikowani na podstawie wyników badania histopatologicznego i zostali podzieleni na trzy grupy na podstawie ostatecznego rozpoznania, popartego wynikami badania klinicznego, badań obrazowych, przebiegu choroby i reakcji na stosowane leczenie:

- Grupa I – 11 pacjentów z rozpoznaniem gruczolakorakiem/rakiem jamy nosowej
- Grupa II – 25 pacjentów z rozpoznaniem zapaleniem niespecyficznym (limfocytarnym/plazmocytnym/limfoplazmocytnym) jamy nosowej
- Grupa III – 10 pacjentów z rozpoznaniem zapaleniem grzybiczym jamy nosowej

5.6.2. Psy z chłoniakiem centroblastycznym

Pacjenci do tej grupy byli kwalifikowani na podstawie wyników badania cytologicznego popartego badaniem immunocytochemicznym, w powiązaniu z obrazem klinicznym i przebiegiem choroby. Wszystkie psy były leczone chemioterapią w oparciu o schemat CHOP. Pacjenci zostali podzieleni na trzy grupy badane na podstawie długości całkowitego czasu przeżycia od momentu ostatecznego rozpoznania:

- Grupa I – 16 pacjentów, którzy przeżyli do 6 miesięcy
- Grupa II – 9 pacjentów, którzy przeżyli od 6 miesięcy do 12 miesięcy
- Grupa III – 10 pacjentów, którzy przeżyli powyżej 12 miesięcy

5.6.3. Psy z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym

Pacjenci do tej grupy byli kwalifikowani na podstawie wyników badania cytologicznego popartego badaniem immunocytochemicznym, w powiązaniu z obrazem

klinicznym i przebiegiem choroby. Pacjenci zostali podzieleni na grupy badane na podstawie typu podjętego leczenia lub jego braku:

- Grupa I – 5 pacjentów bez zastosowanego leczenia
- Grupa II - 4 pacjentów leczonych glikokortykosteroidami
- Grupa III - 15 pacjentów poddanych chemioterapii

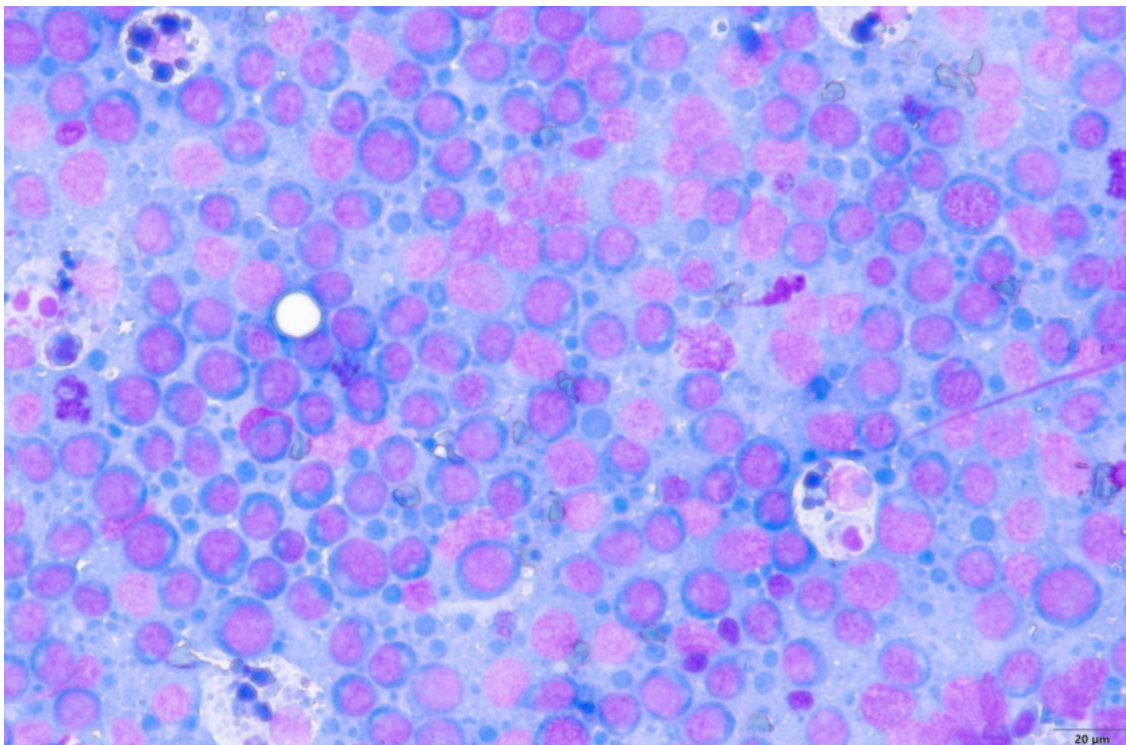
5.6.4. Psy z guzem z komórek tucznych

Pacjenci do tej grupy byli kwalifikowani na podstawie wyników badania cytologicznego popartego barwieniem błękitem toluidyny i potwierdzonych badaniem histopatologicznym, jako MCT low grade (według klasyfikacji Kiupel), w powiązaniu z obrazem klinicznym i przebiegiem choroby. U wszystkich pacjentów dokonano resekcji chirurgicznej guza, jako jedynej metody terapeutycznej, następnie pacjenci byli poddani obserwacji klinicznej pod kątem występowania lub nie przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Po czasie obserwacji klinicznej trwającej 6 miesięcy od dnia zabiegu chirurgicznego, pacjenci zostali podzieleni na grupy badane na podstawie faktu pojawiania się lub nie przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych:

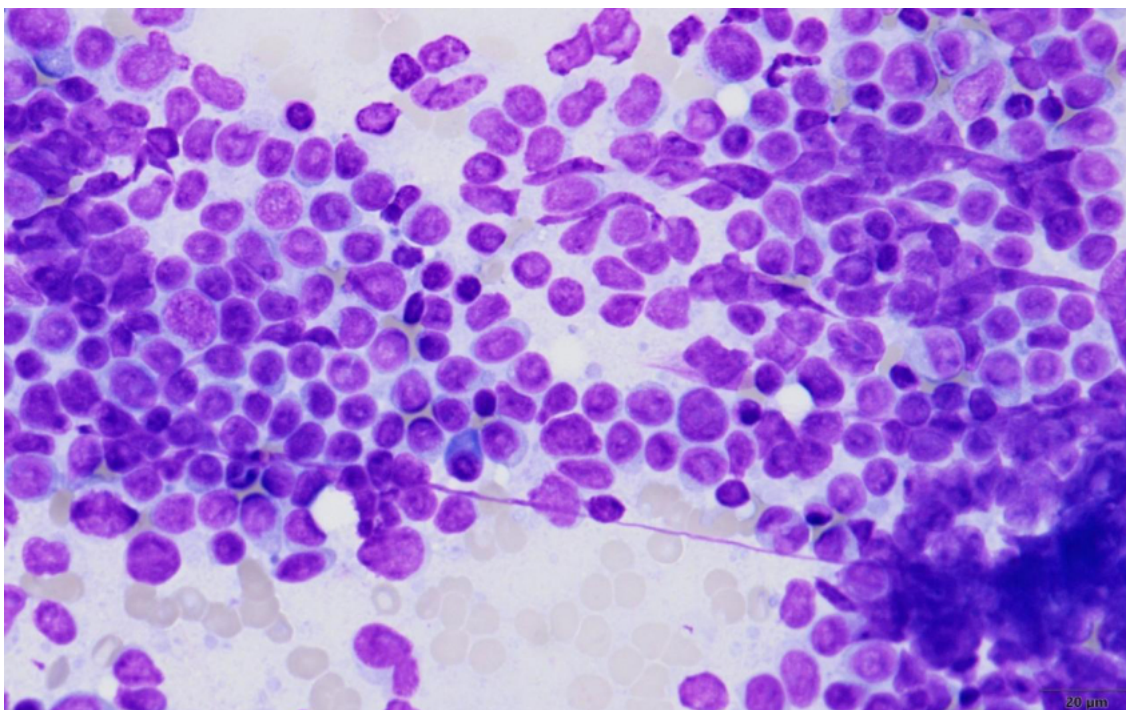
- Grupa I - 15 pacjentów z przerzutami guza komórek tucznych o niskiej złośliwości histologicznej do regionalnych węzłów chłonnych
- Grupa II - 12 pacjentów bez przerzutów guza komórek tucznych o niskiej złośliwości histologicznej do regionalnych węzłów chłonnych.

5.7. Badania cytomorfometryczne

Pomiary cytomorfometryczne wykonano na rozmazach cytologicznych barwionych odczynnikiem Giemsy przy powiększeniu 400x. Do oceny z każdej grupy badanej wybrano jeden z rozmazów, których cechował się najlepszą jakością – w preparatach były obecne liczne komórki o czytelnej morfologii, z wyraźnie widocznymi granicami cytoplazmy i jąder komórkowych, widocznymi jąderkami przy jednoczesnym braku lub niewielkiej ilości artefaktów (ryc. 19). Analizie nie poddawano komórek, które nakładały się na siebie, miały pęknięte jądra lub błonę komórkową, a także jądra lub komórki o niewyraźnych granicach (ryc. 20).

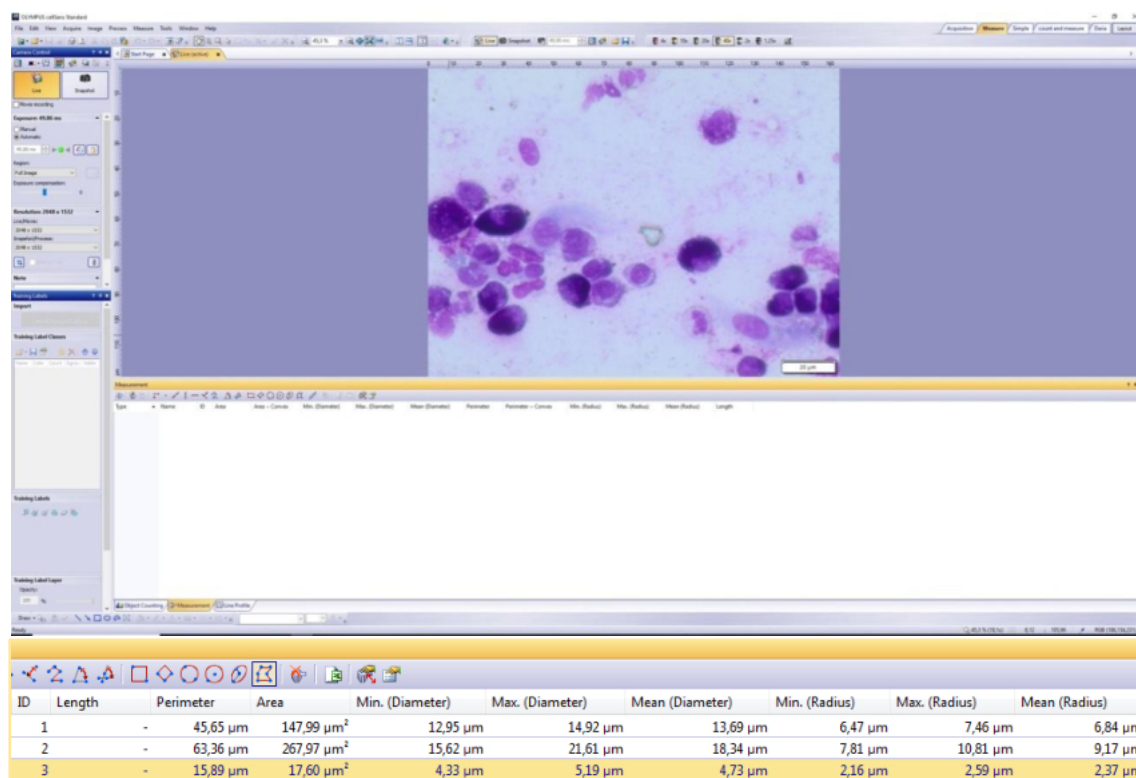


Ryc. 19. Rozmaz cytologiczny chłoniaka centroblastycznego wielopostaciowego z dobrze widocznymi komórkami. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 400x



Ryc. 20. Obraz cytologiczny chłoniaka T-komórkowego wielopostaciowego mieszanego z dużą ilością artefaktów – komórki ułożone gęsto, nachodzące na siebie. Barwienie metodą Giemsy. Powiększenie 400x

Obrazy utrwalano za pomocą kamery cyfrowej i zapisywane w formacie .TIFF. Badane obszary były zaznaczane ręcznie przez obserwatora przy użyciu kursora myszy, w oparciu o granice widoczne w zapisanym obrazie komputerowym. Do badań wykorzystano mikroskop Olympus BX41 (Olympus Corporation, Japonia) oraz cyfrową kamerę mikroskopową Olympus SC30 (Olympus Corporation, Japonia) połączone z komputerem wyposażonym w oprogramowanie do obrazowania cellSens Life Science w wersji 1.12 (Olympus Corporation, Japonia) (ryc. 21)



Ryc. 21. Zrzut ekranu programu cellSens Life Science do analizy cytomorfometrycznej

5.7.1. Analizowane parametry cytomorfometryczne

5.7.1.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej

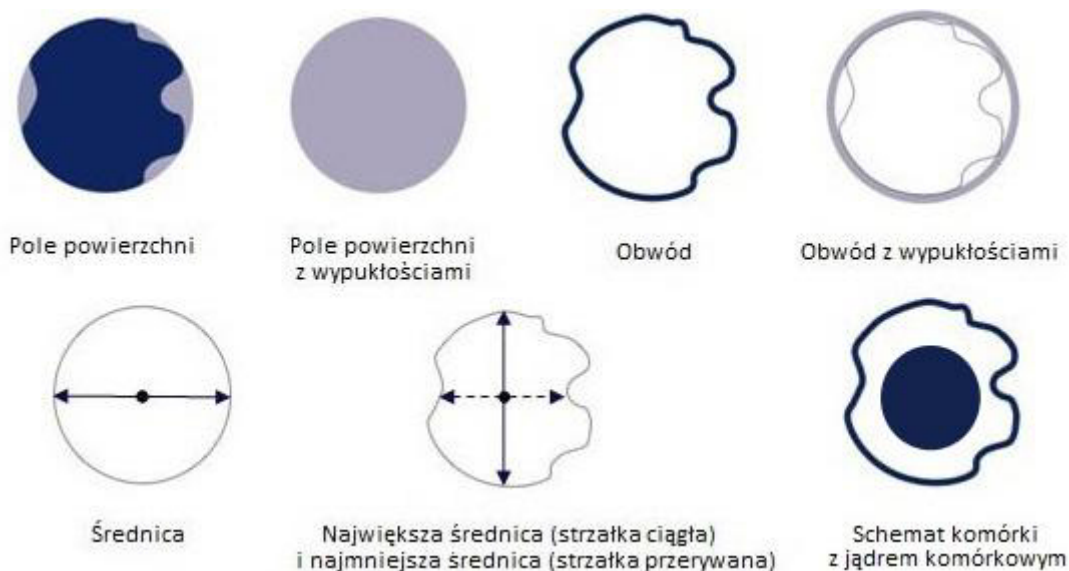
W przypadku badania zmian w jamie nosowej ocenie cytomorfometrycznej poddano komórki nabłonka błony śluzowej jamy nosowej. Dla każdego przypadku oceniono parametry dotyczące jądra komórkowego, które zostały zmierzone poprzez obrysowanie jego konturów. Wymiary jądra komórkowego zmierzono w 50 komórkach u każdego pacjenta. Oceniane parametry obejmowały:

- Długość i średnią długość jądra (największa średnica; μm)
- Szerokość i średnią szerokość jądra (najmniejsza średnica; μm)
- Średnica i średnia średnica jądra (średnia arytmetyczna długości i szerokości danego jądra komórkowego; μm)
- Obwód i średni obwód jądra (μm)
- Pole powierzchni i średnie pole powierzchni jądra (μm^2)

5.7.1.2. Chłoniak centroblastyczny

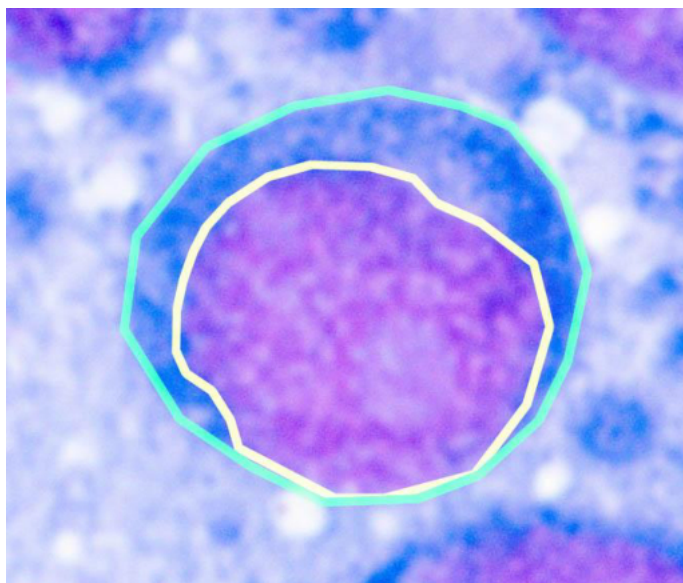
Dla każdego pacjenta z chłoniakiem centroblastycznym pomiary objęły 60 komórek nowotworowych. Dodatkowo, w przypadku 18 pacjentów, uzyskano szczegółowe parametry dotyczące wymiarów jąder komórkowych. Wszystkie pomiary morfometryczne wykonano poprzez obrysowanie konturów całej komórki, jądra komórkowego oraz jąder. Oceniane parametry obejmowały:

- Minimalny, maksymalny promień i średni promień (μm)
- Minimalną, maksymalną i średnią średnicę (μm)
- Obwód i obwód z wypukłościami¹ (μm)
- Pole powierzchni i pole powierzchni z wypukłościami (μm^2)



Ryc. 22. Schemat wykonywanych pomiarów cytomorfometrycznych

¹ Parametry z wypukłościami (ang. convex) – obliczane na podstawie otoczki wypukłej, czyli najmniejszego możliwego kształtu wypukłego obejmującego cały obiekt



Ryc. 23. Schemat wykonywanych zaznaczeń na przykładzie komórki chłoniaka centroblastycznego wielopostaciowego. Ręczne obrysowanie konturów komórki (kolor zielony) oraz jądra komórkowego (kolor żółty) pozwoliło na automatyczny pomiar wybranych parametrów

Ponadto określono indeksy:

- Stosunek pola powierzchni jądra do pola powierzchni cytoplazmy (stosunek N/C) i stosunek pola powierzchni jądra do pola powierzchni cytoplazmy z wypukłościami.
- Kulistość (ang. elongation factor) – obliczonej ze stosunku najkrótszej średnicy do najdłuższej średnicy dla komórki i jądra komórkowego. Wartości bliskie 1 oznaczają kształt zbliżony do koła.
- Wypukłość (ang. convexity) – obliczonej ze stosunku pola powierzchni do pola powierzchni z wypukłościami dla komórki i jądra komórkowego. Wartości zbliżone do 1 wskazują na kształt gładki i regularny.

Dla każdego psa określono:

- Średnią wartość każdego parametru, w celu wykazania typowej wielkości komórek i ich jąder u danego psa.
- Stopień zróżnicowania wyrażony jako względne odchylenie standardowe (ang. relative standard deviation, RSD) inaczej określane mianem współczynnika zmienności (ang. coefficient of variation, CV%), w celu wykazania stopnia niejednorodności wielkości komórek i ich jąder u danego psa.

5.7.1.3. Chłoniak T-komórkowy wielopostaciowy mieszany

Dla psów z chłoniakiem T komórkowym pomiary objęły 100 komórek nowotworowych. Wszystkie pomiary morfometryczne wykonano poprzez obrysowanie konturów całej komórki i jądra komórkowego. Oceniane parametry obejmowały:

- Minimalny, maksymalny promień i średni promień (μm)
- Minimalną, maksymalną i średnią średnicę (μm)
- Obwód i obwód z wypukłościami (μm)
- Pole powierzchni i pole powierzchni z wypukłościami (μm^2)

Ponadto określono indeksy:

- Stosunek pola powierzchni jądra do pola powierzchni cytoplazmy (stosunek N/C) i stosunek pola powierzchni jądra do pola powierzchni cytoplazmy z wypukłościami.
- Kulistość (ang. elongation factor) – obliczonej ze stosunku najkrótszej średnicy do najdłuższej średnicy dla komórki i jądra komórkowego. Wartości bliskie 1 oznaczają kształt zbliżony do koła.
- Wypukłość (ang. convexity) – obliczonej ze stosunku pola powierzchni do pola powierzchni z wypukłościami dla komórki i jądra komórkowego. Wartości zbliżone do 1 wskazują na kształt gładki i regularny.

Dla każdego psa określono:

- Średnią wartość każdego parametru, w celu wykazania typowej wielkości komórek i ich jąder u danego psa.
- stopień zróżnicowania wyrażony jako względne odchylenie standardowe (ang. relative standard deviation, RSD) inaczej określane mianem współczynnika zmienności (ang. coefficient of variation, CV%), w celu wykazania stopnia niejednorodności wielkości komórek i ich jąder u danego psa.

5.7.1.4. Guz z komórek tucznych

Dla psów z guzem z komórek tucznych pomiary objęły 100 komórek nowotworowych. Wszystkie pomiary morfometryczne wykonano poprzez obrysowanie konturów całej komórki i jądra komórkowego. Oceniane parametry obejmowały:

- Minimalny, maksymalny promień i średni promień (μm)
- Minimalną, maksymalną i średnią średnicę (μm)

- Obwód i obwód z wypukłościami (μm)
- Pole powierzchni i pole powierzchni z wypukłościami (μm^2)

Ponadto określono indeksy:

- Stosunek pola powierzchni jądra do pola powierzchni cytoplazmy (stosunek N/C) i stosunek pola powierzchni jądra do pola powierzchni cytoplazmy z wypukłościami.
- Kulistość (ang. elongation factor) – obliczonej ze stosunku najkrótszej średnicy do najdłuższej średnicy dla komórki i jądra komórkowego. Wartości bliskie 1 oznaczają kształt zbliżony do koła.
- Wypukłość (ang. convexity) – obliczonej ze stosunku pola powierzchni do pola powierzchni z wypukłościami dla komórki i jądra komórkowego. Wartości zbliżone do 1 wskazują na kształt gładki i regularny.

Dla każdego psa określono:

- Średnią wartość każdego parametru, w celu wykazania typowej wielkości komórek i ich jąder u danego psa.
- stopień zróżnicowania wyrażony jako względne odchylenie standardowe (ang. relative standard deviation, RSD) inaczej określane mianem współczynnika zmienności (ang. coefficient of variation, CV%), w celu wykazania stopnia niejednorodności wielkości komórek i ich jąder u danego psa.

5.8. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono w programie TIBCO Statistica 13.3.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

5.8.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej

Zmienne ilościowe opisano za pomocą średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego (ang. standard deviation, SD) oraz zakresu wartości jaki przyjmowała dana zmienna. Na rycinach przedstawiono średnią arytmetyczną oraz 95% przedział ufności (ang. 95% confidence interval, CI 95%) dla każdej grupy chorób. Rozmiary jądra komórkowego porównano między trzema grupami chorób z wykorzystaniem zagnieżdżonej analizy wariancji (ang. nested analysis of variance, nested ANOVA), w której diagnoza (czyli grupa chorób) stanowiła efekt stały (ang. fixe effect), a osobnik od którego pochodziły komórki stanowił efekt losowy (ang. random effect).

Kształt rozkładu danej zmiennej ilościowej oceniano wizualnie na podstawie histogramów przedstawiających rozkład liczebności i częstości tej zmiennej oraz wykresów normalności kwantyl-kwantyl (ang. normal distribution Q-Q plots), a spełnienie założenia normalności rozkładu zbadano z zastosowaniem testu W Shapiro-Wilka. Założenie o jednorodności wariancji w porównywanych grupach weryfikowano z wykorzystaniem testu Browna-Forsythe'a. Jeżeli wynik analizy wariancji był statystycznie istotny, wykonano porównania międzygrupowe (tzw. analizę post-hoc) w celu identyfikacji par grup istotnie od siebie różnych. W analizie tej wykorzystano test rzeczywiście znaczącej różnicy Tukeya (ang. Tukey's honestly significant difference, HSD) w wersji dla grup o różnej liczebności. Zmienne jakościowe opisano za pomocą liczby (n) oraz odsetka (%) osobników, w przypadku których dana zmienna przyjmowała określoną wartość w grupie lub w całej badanej populacji. Do porównania odsetków osobników dla których dana zmienna przyjmowała określoną wartość użyto testu chi-kwadrat (χ^2) Pearsona. We wszystkich analizach przyjęto poziom istotności (α) równy 0,05 co oznaczało, że wartość p testu statystycznego niższa od 0,05 wskazywała na istnienie statystycznie istotnej różnicy między grupami.

5.8.2. Chłoniaki i guz z komórek tucznych

Zmienne jakościowe opisano za pomocą liczby (n) oraz odsetka (%) osobników, dla których dana zmienna przyjmowała określoną wartość w grupie. Przedział ufności dla 95% poziomu ufności (95% PU; ang. 95% confidence interval) dla odsetków wyliczono metodą Wilsona (Altman i in, 2000). Do porównania odsetków osobników dla których dana zmienna przyjmowała określoną wartość wykorzystywano test G najwyższej wiarygodności. W przypadku zmiennych ilościowych, spełnienie założenia normalności rozkładu oceniano wizualnie na podstawie wykresów kwantyl-kwantyli weryfikowano z zastosowaniem testu W Shapiro-Wilka. Pomiary cytomorfometryczne u poszczególnych psów miały rozkład normalny i dlatego opisywane zostały za pomocą średniej arytmetycznej i względnego odchylenia standardowego (ang. relative standard deviation, RSD). Pozostałe zmienne ilościowe (wiek, czasy przeżycia, średnie pomiary cytomorfometryczne i zmienność pomiarów cytomorfometrycznych) nie miały w większości przypadków rozkładu normalnego i dlatego opisane zostały z wykorzystaniem mediany, zakresu międzykwartylowego (ang. interquartile range, IQR) i zakresu. Zmienne ilościowe porównywano między grupami z zastosowaniem nieparametrycznych testów istotności: testu U Manna-

Whitneya w przypadku porównywania 2 grup i testu H Kruskala-Wallisa z testem post-hoc Dunn w przypadku porównywania więcej niż 2 grup. Zależności między dwiema zmiennymi ilościowymi analizowano z zastosowaniem współczynnika korelacji rang Spearmana (R_s), a siłę korelacji klasyfikowano jako bardzo słabą (R_s od 0,00 do 0,19), słabą (0,20 do 0,39), umiarkowaną (0,40 do 0,59), silną (0,60 do 0,79) i bardzo silną (0,80 to 1,00). Trafność diagnostyczną parametrów cytomorfometrycznych określono z zastosowaniem analizy pola pod krzywą ROC (ang. area under receiver operating characteristic curve, AUROC) i klasyfikowano następująco: $\geq 90\%$ – bardzo wysoka trafność, 80%–89% – wysoka trafność, 70%–79% – umiarkowana trafność, $< 70\%$ – niska trafność (Carter i in., 2016). Optymalny punkt odcięcia wyznaczono przez maksymalizację współczynnika Youdena (Thrusfield, 2018). Czułość i swoistość diagnostyczną obliczano z tabel kontyngencji a wartości predykcyjne obliczano dla ustalonej prevalencji diagnozowanego stanu z wykorzystaniem odpowiednich wzorów (Thrusfield, 2018). We wszystkich analizach przyjęto poziom istotności (α) równy 0,05, co oznaczało, że wartość p testu statystycznego niższa od 0,05 wskazywała na istnienie statystycznie istotnej różnicy lub zależności. W przypadku porównywania parametrów cytomorfometrycznych między grupami zastosowano poprawkę Holma-Bonferroniego dla porównań wielokrotnych.

6. Wyniki

6.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej

6.1.1. Charakterystyka badanych grup psów z rozrostem w jamie nosowej

Do badania zakwalifikowano łącznie 46 psów, które na podstawie badania histopatologicznego, obrazu klinicznego, wynikach badań obrazowych i reakcji na leczenie zostały przydzielone do jednej z trzech grup: psy z zapaleniem niespecyficznym, psy z zapaleniem grzybiczym oraz psy z gruczolakorakiem/rakiem jamy nosowej. Większość badanych psów stanowiły samce, w analizie statystycznej nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie płci pomiędzy poszczególnymi grupami ($p=0,128$). Średni wiek w całej populacji wynosił $9,0\pm 3,1$ roku. Psy z rozpoznany nowotworem (gruczolakorak lub rak) były najstarsze ($10,1\pm 2,7$ roku), a najmłodsze były psy z zapaleniem jamy nosowej na tle grzybiczym ($7,7\pm 3,1$ roku), różnice nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej ($p=0,212$). Pod względem rasy, większość psów stanowiły psy ras dużych, natomiast nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami. Rozkład płci, wieku oraz ras w poszczególnych grupach przedstawiono w tabeli (tab. 1).

Tabela 1. Charakterystyka demograficzna badanych psów z rozrostem w jamie nosowej

Charakterystyka psów	Gruczolakorak/rak (n=11)	Zapalenie niespecyficzne (n=25)	Zapalenie grzybicze (n=10)	Wartość p
Wiek [lata]	$10,1\pm 2,7$ (6-13)	$9,0\pm 3,2$ (2-14)	$7,7\pm 3,1$ (4-13)	$0,212^2$
Płeć [n (%)] samiec samica	8 (73) 3 (27)	17 (68) 8 (32)	10 (100) 0	$0,128^3$
Rasa [n (%)] mieszaniec rasowy	5 (45) 6 (55)	7 (28) 18 (72)	4 (40) 6 (60)	$0,555^3$

6.1.2. Analiza cytomorfometryczna

Wyniki pomiarów cytomorfometrycznych dla 50 jąder komórkowych komórek nabłonka błony śluzowej jamy nosowej, dla każdego pacjenta/preparatu, w zależności

² one-way ANOV

³ Pearson's chi-square test

od rozpoznania patologicznego, zostały podane jako średnia arytmetyczna $\pm$ odchylenie standardowe oraz zakres, i przedstawione w tabeli (tab. 2). Szczegółowe pomiary dla każdego psa zamieszczono w aneksie (aneks 1).

Tabela 2. Ilość badanych psów z rozrostem w jamie nosowej oraz uzyskanych pomiarów cytomorfometrycznych wraz z wynikami

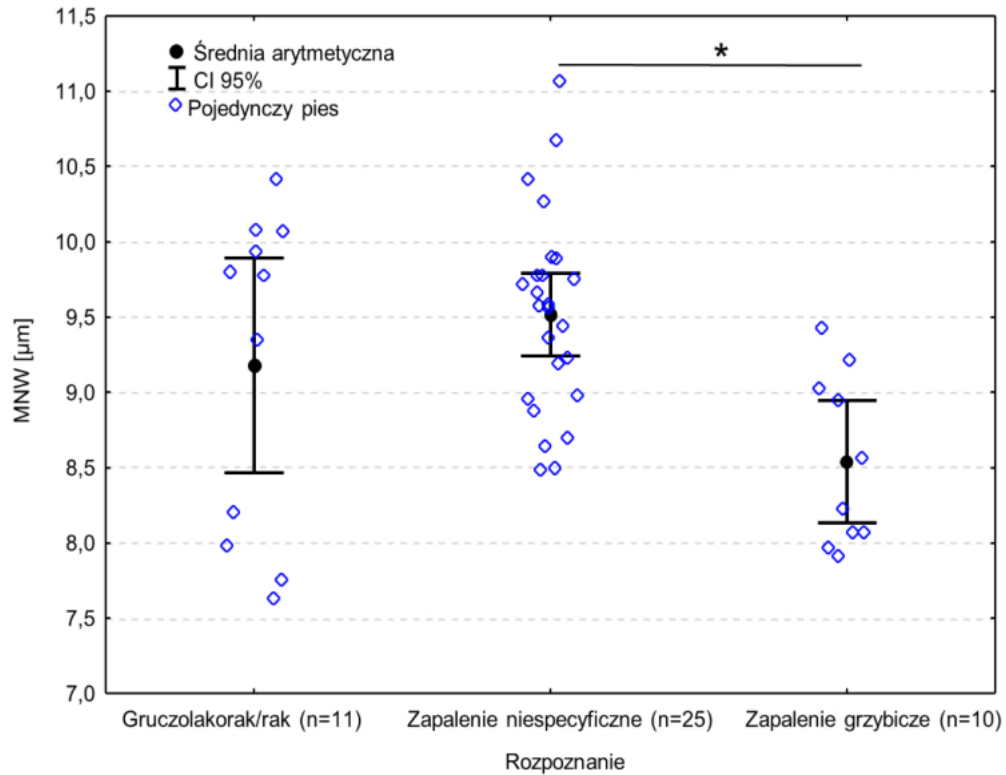
Rozpoznanie	Liczba pacjentów	Liczba pomiarów	Długość [μm]	Szerokość [μm]	Średnica [μm]	Pole powierzchni [μm^2]	Obwód [μm]
Guczolakorak/ rak	11	550	11,56 $\pm$ 2,13 (6,34-19,21)	9,18 $\pm$ 1,76 (3,72-14,68)	10,37 $\pm$ 1,78 (5,73-16,04)	84,33 $\pm$ 27,32 (25,47-211,98)	35,42 $\pm$ 5,77 (19,42-56,16)
Zapalenie niespecyficzne	25	1250	11,87 $\pm$ 1,77 (7,13-20,42)	9,52 $\pm$ 1,47 (5,42-15,37)	10,69 $\pm$ 1,40 (6,48-16,92)	88,23 $\pm$ 23,60 (32,59-221,49)	36,39 $\pm$ 4,72 (21,63-57,53)
Zapalenie grzybicze	10	500	10,94 $\pm$ 1,95 (5,25-19,95)	8,54 $\pm$ 1,56 (3,65-14,56)	9,74 $\pm$ 1,55 (4,73-16,73)	75,18 $\pm$ 23,78 (18,64-220,94)	34,12 $\pm$ 5,38 (17,08-58,4)

- Długość jądra komórkowego

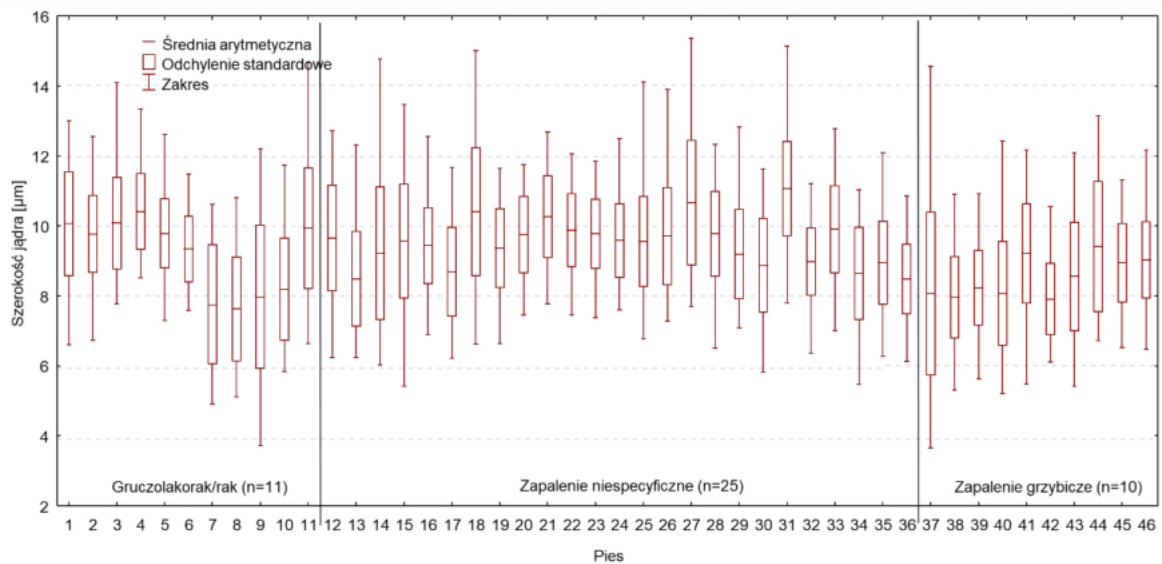
Średnia długość jąder komórkowych (MNL) istotnie różniła się pomiędzy psami w obrębie poszczególnych grup diagnostycznych ($F_{43,2254}=15,70$; $p<0,001$). W analizie porównawczej pomiędzy trzema grupami średnia długości jądra różniła się na poziomie granicznej istotności statystycznej ($F_{2,43}=3,51$; $p=0,039$). W analizie porównań parami nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami.

- Szerokość jądra komórkowego

Średnia szerokość jąder komórkowych (MNW) istotnie różniła się pomiędzy psami w obrębie poszczególnych grup diagnostycznych ($F_{43,2254}=14,66$; $p<0,001$), a także pomiędzy trzema badanymi grupami ($F_{2,43}=5,98$; $p=0,005$). W analizie porównań parami istotną różnicę stwierdzono pomiędzy zapaleniem nieswoistym, a zapaleniem grzybiczym ($p=0,017$), natomiast różnice pomiędzy grupą nowotworową, a zapaleniem nieswoistym ($p=0,550$) oraz grupą nowotworową, a zapaleniem grzybiczym ($p=0,155$) nie osiągnęły poziomu istotności. Średnie wartości MNW były najwyższe w zapaleniu nieswoistym, najniższe w zapaleniu grzybiczym, a w grupie nowotworowej przyjmowały wartości pośrednie (ryc. 24). Analiza indywidualnych wyników wykazała szerokie nakładanie się zakresów między grupami, jak i pomiędzy poszczególnymi psami w obrębie tych samych grup (ryc. 25).



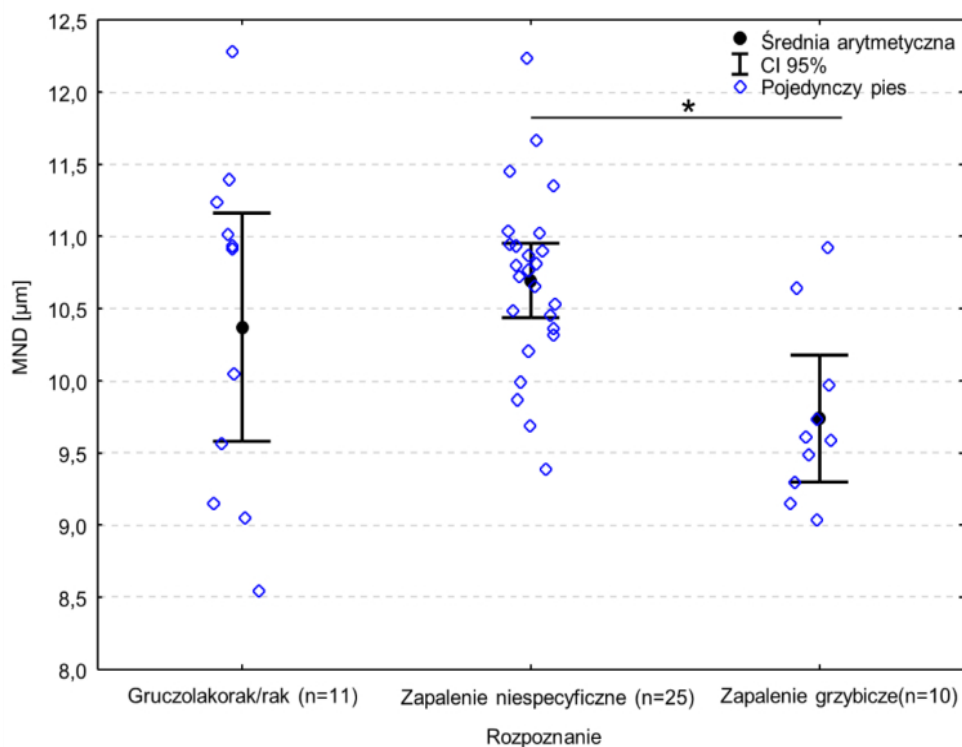
Ryc. 24. Średnia szerokość jądra komórkowego (MNW) w trzech grupach diagnostycznych. Przedstawiono średnią arytmetyczną, 95% przedział ufności (CI 95%). Gwiazdka (*) oznacza istotną różnicę w porównaniach parami



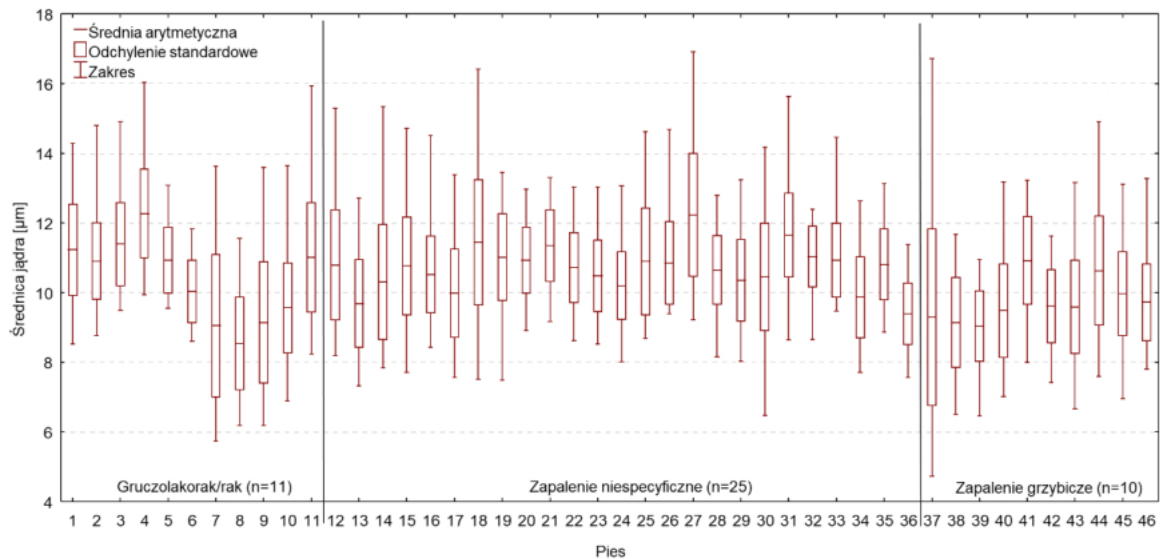
Ryc. 25. Rozkład szerokości jąder komórkowych na podstawie 50 pomiarów wykonanych u każdego psa. Przedstawiono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe i zakres

- Średnica jądra komórkowego

Średnia średnica jąder komórkowych (MND) obliczona jako średnia arytmetyczna długości i szerokości danego jądra komórkowego, różniła się istotnie pomiędzy psami w obrębie poszczególnych grup diagnostycznych ($F_{43,2254}=17,09$; $p<0,001$), a także pomiędzy trzema badanymi grupami ($F_{2,43}=5,30$; $p=0,009$). W analizie porównań parami istotną różnicę stwierdzono między zapaleniem nieswoistym a zapaleniem grzybiczym ($p=0,025$), natomiast różnice pomiędzy grupą nowotworową a zapaleniem nieswoistym ($p=0,603$) oraz grupą nowotworową a zapaleniem grzybiczym ($p=0,182$) nie osiągnęły istotności. Średnie wartości MND były najwyższe w zapaleniu nieswoistym, najniższe w zapaleniu grzybiczym, a w grupie nowotworowej przyjmowały wartości pośrednie (ryc. 26). Analiza indywidualnych wyników wykazała szerokie nakładanie się zakresów między grupami, jak i pomiędzy poszczególnymi psami w obrębie tych samych grup (ryc. 27).



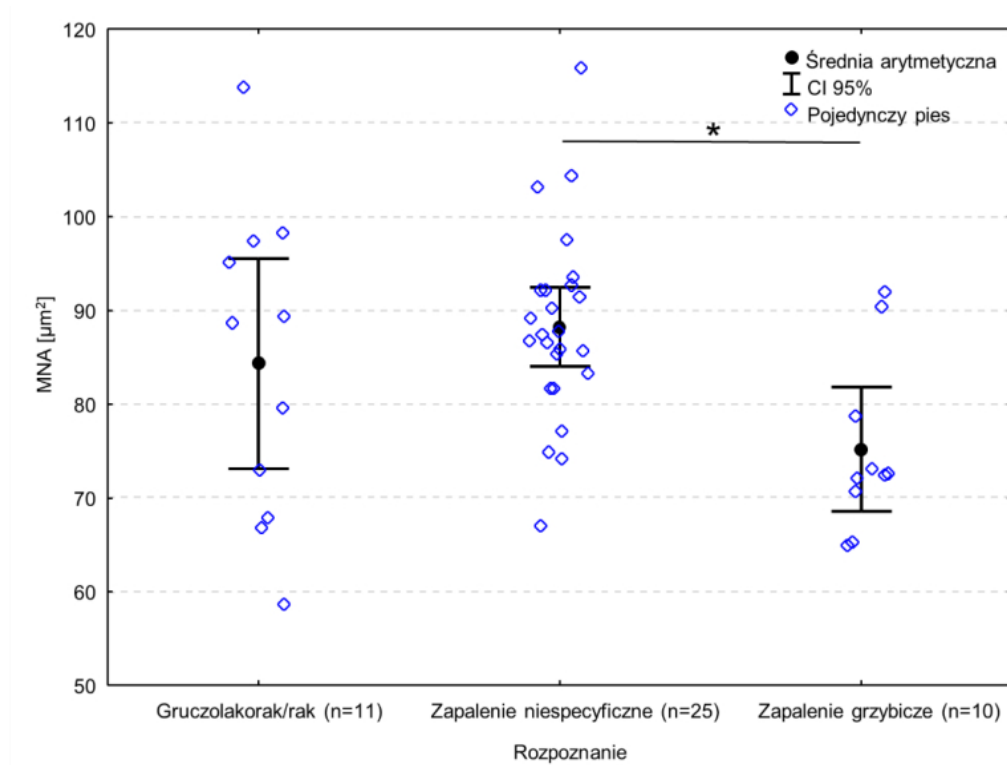
Ryc. 26. Średnia średnica jądra komórkowego (MND) w trzech grupach diagnostycznych. Przedstawiono średnią arytmetyczną, 95% przedział ufności (CI 95%). Gwiazdka (*) oznacza istotną różnicę w porównaniach parami



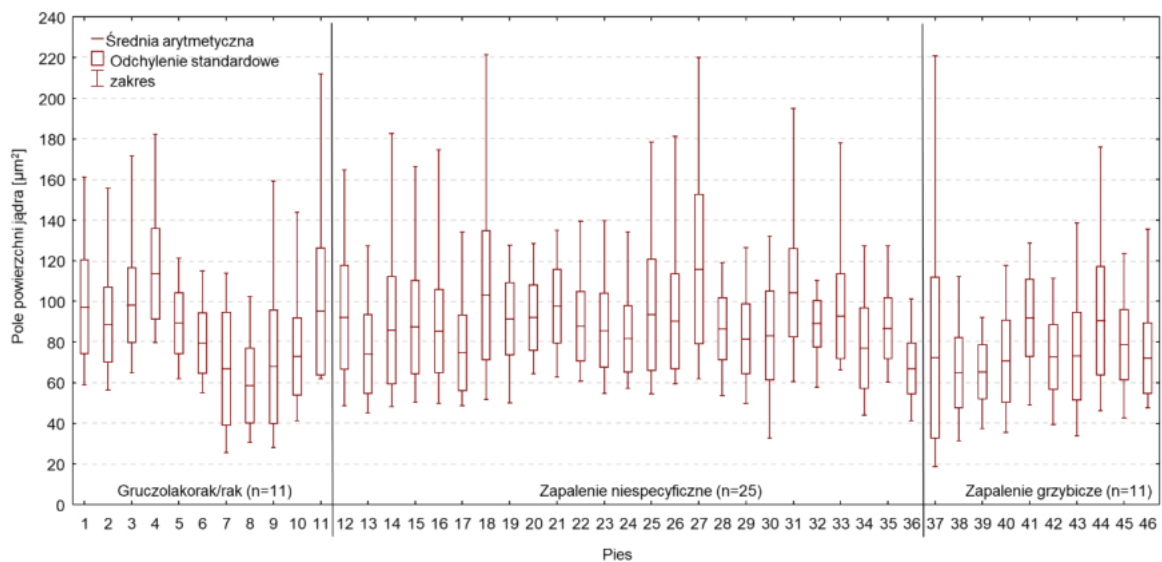
Ryc. 27. Rozkład średnicy jąder komórkowych na podstawie 50 pomiarów wykonanych u każdego psa. Przedstawiono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe i zakres

- Pole powierzchni jądra komórkowego

Pole powierzchni jądra komórkowego (MNA) wykazywało istotne różnice w obrębie poszczególnych grup diagnostycznych ($F_{43,2254}=14,70$; $p<0,001$). Średnia powierzchnia jądra komórkowego różniła się istotnie między trzema badanymi grupami pacjentów ($F_{2,43}=4,30$; $p=0,020$). W analizie porównań parami istotną różnicę stwierdzono między zapaleniem nieswoistym a zapaleniem grzybiczym ($p=0,047$), natomiast różnice pomiędzy grupą nowotworową a zapaleniem nieswoistym ($p=0,724$) oraz grupą nowotworową a zapaleniem grzybiczym ($p=0,209$) nie osiągnęły istotności. Średnie wartości MNA były najwyższe w zapaleniu nieswoistym, najniższe w zapaleniu grzybiczym, a w grupie nowotworowej przyjmowały wartości pośrednie (ryc. 28). Analiza indywidualnych wyników wykazała szerokie nakładanie się zakresów między grupami, jak i pomiędzy poszczególnymi psami w obrębie tych samych grup (ryc. 29).



Ryc. 28. Średnia pola powierzchni jądra komórkowego (MNA) w trzech grupach diagnostycznych. Przedstawiono średnią arytmetyczną, 95% przedział ufności (CI 95%). Gwiazdka (*) oznacza istotną różnicę w porównaniach parami



Ryc. 29. Rozkład pola powierzchni jąder komórkowych na podstawie 50 pomiarów wykonanych u każdego psa. Przedstawiono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe i zakres

- Obwód jądra komórkowego

Średni obwód jąder komórkowych (MNP) istotnie różnił się w obrębie poszczególnych grup diagnostycznych ($F_{43,2254}=15,40$; $p<0,001$). Nie stwierdzono istotnej różnicy w średnim obwodzie jądra komórkowego pomiędzy trzema badanymi grupami psów ($F_{2,43}=2,94$; $p=0,064$).

6.2. Chłoniak centroblastyczny

6.2.1. Charakterystyka badanych psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym

W badaniu uwzględniono dane dotyczące 35 psów z rozpoznaniem chłoniakiem centroblastycznym, które poddano chemioterapii z użyciem schematu CHOP. Całą grupę badaną stanowiło 13 samców i 22 samic, a wiek psów mieścił się w przedziale od 1 do 15 lat. Wiek nie różnił się istotnie między płciami ($p=0,501$). Pod względem rasy 20% stanowiły mieszance, a pozostałe 80% psy rasowe.

Tabela 3. Charakterystyka demograficzna badanych psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym

Charakterystyka psów	n=35
Wiek [lata]	1 do 15 lat (mediana: 7 lat, IQR: 5 – 10 lat)
Płeć [n (%)]	
samiec	13 (37)
samica	22 (63)
Rasa [n (%)]	
mieszaniec	7 (20)
rasowy	28 (80)

6.2.2. Analiza związku parametrów cytomorfometrycznych z całkowitym czasem przeżycia psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym

Dla każdego pacjenta z chłoniakiem centroblastycznym dokonano pomiaru 60 komórek oraz odpowiadającym im jąder komórkowych. W przypadku 18 pacjentów, u których jąderka były najlepiej widoczne, przeprowadzono również dodatkowe pomiary jąderek komórkowych. Całkowity czas przeżycia psów wynosił od 19 do 1622 dni od rozpoznania (mediana 220 dni; IQR: 78 – 418 dni). Wyniki pomiarów

cytomorfometrycznych zestawiono w tabeli (tab. 4). Analiza wykazała istotną korelację ujemną współczynnika zmienności wypukłości jądra komórkowego z całkowitym czasem przeżycia ($R_s = -0,34$; $p = 0,043$), wynik był na granicy istotności i o uwzględnieniu poprawki na powtórzenia wielokrotne nie wykazano istotności statystycznej. Na przedstawionej rycinie (ryc. 30) nie zaobserwowano jednoznacznego trendu pomiędzy całkowitym czasem przeżycia a zmiennością wypukłości jądra komórkowego. Pozostałe analizowane cechy morfologiczne, zarówno cytoplazmatyczne, jak i jądrowe, wykazywały współczynniki korelacji bliskie zeru (tab. 4). Dla większości parametrów wartość p była wyższa niż 0.05.

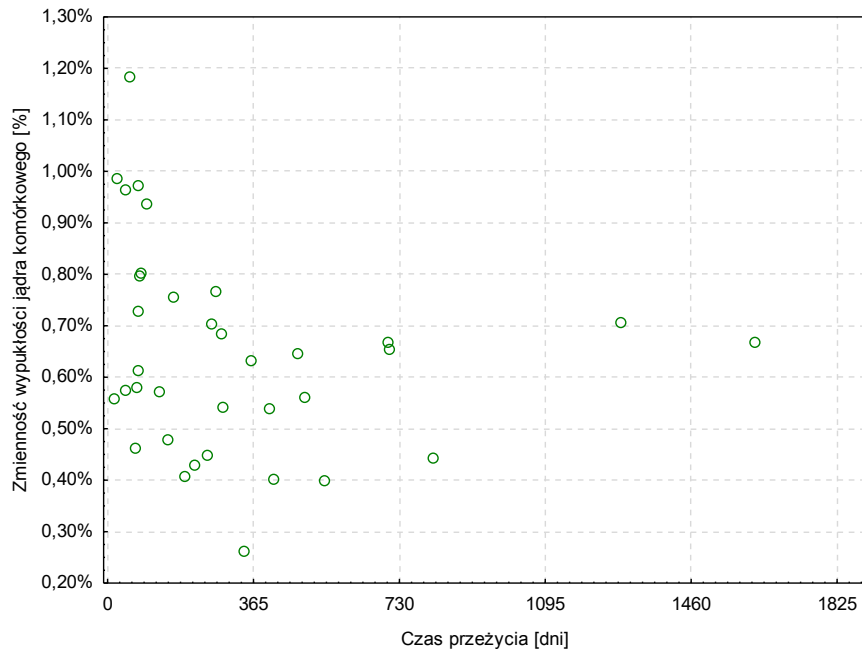
Tabela. 4. Średnie wartości i zmienność parametrów cytomorfometrycznych wyrażona jako mediana, zakres międzykwartylowy i zakres oraz korelacja z całkowitym czasem przeżycia u psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym

		Korelacja z całkowitym czasem przeżycia	
	Psy (n=35)	R _s	Wartość p
Średnie wymiary komórek			
M_Komórka_Pole powierzchni [μm ²]	99,3; 92,7 – 108 (67,1 – 118)	-0,01	0,972
M_Komórka_Pole powierzchni z wypukłościami [μm ²]	99,9; 93,1 – 108 (67,5 – 118)	0,00	0,999
M_Komórka_Minimalna średnica [μm]	10,5; 10,3 – 10,9 (8,62 – 11,6)	0,04	0,827
M_Komórka_Maksymalna średnica [μm]	11,8; 11,4 – 12,4 (9,80 – 12,8)	0,01	0,935
M_Komórka_Średnia średnica [μm]	11,2; 10,8 – 11,6 (9,17 – 12,1)	0,01	0,934
M_Komórka_Obwód [μm]	37,3; 36,1 – 39,0 (31,0 – 40,5)	0,02	0,893
M_Komórka_Obwód z wypukłościami [μm]	37,3; 36,1 – 38,9 (30,8 – 40,5)	0,03	0,869
M_Komórka_Minimalny promień [μm]	5,27; 5,13 – 5,46 (4,31 – 5,80)	0,04	0,827
M_Komórka_Maksymalny promień [μm]	5,90; 5,69 – 6,20 (4,90 – 6,39)	0,01	0,935
M_Komórka_Średni promień [μm]	5,58; 5,39 – 5,81 (4,58 – 6,07)	0,01	0,934
Średnie wymiary jąder komórkowych			
M_Jadro kom_Pole powierzchni[μm ²]	66,5; 63,8 – 72,5	-0,11	0,541

	(46,7 – 81,7)		
M_ Jądro kom _ Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	67,2; 64,3 – 73,3 (47,3 – 83,0)	-0,10	0,565
M_ Jądro kom _ Minimalna średnica [μm]	8,33; 8,13 – 8,75 (6,85 – 9,23)	-0,07	0,689
M_ Jądro kom _Maksymalna średnica [μm]	10,0; 9,65 – 10,4 (8,41 – 11,1)	-0,09	0,624
M_ Jądro kom _Średnia średnica [μm]	9,16; 8,93 – 9,52 (7,64 – 10,1)	-0,09	0,611
M_ Jądro kom _Obwód [μm]	31,0; 30,1 – 32,4 (26,1 – 34,4)	-0,11	0,535
M_ Jądro kom _Obwód z wypukłościami [μm]	30,9; 30,1 – 32,2 (26,0 – 34,2)	-0,10	0,571
M_ Jądro kom _Minimalny promień [μm]	4,17; 4,06 – 4,37 (3,42 – 4,62)	-0,07	0,689
M_ Jądro kom _Maksymalny promień [μm]	5,01; 4,83 – 5,22 (4,21 – 5,54)	-0,09	0,624
M_ Jądro kom _Średni promień [μm]	4,58; 4,47 – 4,76 (3,82 – 5,05)	-0,09	0,611
Średnie indeksy			
Stosunek jądro-komórka (N/C)	0,690; 0,669 – 0,705 (0,642 – 0,763)	-0,28	0,101
Stosunek jądro-komórka (N/C z wypukłościami)	0,693; 0,672 – 0,710 (0,645 – 0,769)	-0,31	0,067
Kulistość komórki	0,894; 0,887 – 0,901 (0,856 – 0,909)	0,09	0,620
Kulistość jądra komórkowego	0,836; 0,827 – 0,845 (0,807 – 0,859)	0,16	0,355
Wypukłość komórki	0,995; 0,994 – 0,995 (0,990 – 0,996)	0,13	0,474
Wypukłość jądra komórkowego	0,990; 0,988 – 0,991 (0,984 – 0,993)	0,30	0,081
Średnie wymiary jąder (n=18)			
M_ Jąderko _ Pole powierzchni [μm^2]	5,09; 4,46 – 6,64 (3,28 – 8,19)	-0,11	0,651
M _ Jąderko _ Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	5,20; 4,59 – 6,74 (3,34 – 8,30)	-0,11	0,651
M_ Jąderko _Minimalna średnica [μm]	2,16; 2,03 – 2,49 (1,73 – 2,82)	-0,11	0,651
M _ Jąderko _Maksymalna średnica [μm]	2,76; 2,64 – 3,19 (2,26 – 3,51)	-0,09	0,717
M _ Jąderko _Średnia średnica [μm]	2,43; 2,30 – 2,80 (1,94 – 3,13)	-0,11	0,675

M _Jąderko_Obwód [μm]	8,29; 7,83 – 9,46 (6,72 – 10,6)	-0,11	0,669
M _Jąderko_Obwód z wypukłościami [μm]	8,27; 7,82 – 9,46 (6,72 – 10,6)	-0,11	0,669
M _Jąderko_Minimalny promień [μm]	1,08; 1,01 – 1,24 (0,863 – 1,41)	-0,11	0,651
M _Jąderko_Maksymalny promień [μm]	1,38; 1,32 – 1,59 (1,13 – 1,76)	-0,09	0,717
M _Jąderko_Średni promień [μm]	1,21; 1,15 – 1,4 (0,972 – 1,56)	-0,11	0,675
M _Jąderko_Kulistość	0,773; 0,757 – 0,785 (0,720 – 0,821)	-0,09	0,729
M _Jąderko_Wypukłość	0,981; 0,977 – 0,983 (0,972 – 0,986)	0,02	0,926
Zmienność wymiarów komórek [%]			
CV%_Komórka_Pole powierzchni [μm^2]	24,1; 21,6 – 26,2 (18,9 – 31,4)	-0,21	0,223
CV%_Komórka_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	24,1; 21,5 – 26,1 (18,8 – 31,4)	-0,20	0,240
CV%_Komórka_Minimalna średnica [μm]	11,9; 11,1 – 13,3 (9,2 – 16,4)	-0,22	0,199
CV%_Komórka_Maksymalna średnica [μm]	11,7; 10,8 – 12,7 (9,9 – 15,9)	-0,19	0,267
CV%_Komórka_Średnia średnica [μm]	11,6; 10,7 – 12,9 (9,4 – 15,7)	-0,20	0,250
CV%_Komórka_Obwód [μm]	11,7; 10,8 – 12,8 (9,5 – 15,8)	-0,21	0,221
CV%_Komórka_Obwód z wypukłościami [μm]	11,7; 10,8 – 12,7 (9,5 – 15,8)	-0,21	0,230
CV%_Komórka_Minimalny promień [μm]	11,9; 11,1 – 13,3 (9,2 – 16,4)	-0,22	0,199
CV%_Komórka_Maksymalny promień [μm]	11,7; 10,8 – 12,7 (9,9 – 15,9)	-0,19	0,267
CV%_Komórka_Średni promień [μm]	11,6; 10,7 – 12,9 (9,4 – 15,7)	-0,20	0,250
Zmienność wymiarów jądra komórkowego [%]			
CV%_Jądro kom_Pole powierzchni [μm^2]	23,2; 20,4 – 25,0 (14,8 – 29,9)	-0,24	0,160
CV%_Jądro kom_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	22,8; 20,3 – 24,9 (14,8 – 30,1)	-0,23	0,187
CV%_Jądro kom_Minimalna średnica [μm]	12,3; 11,6 – 13,5 (8,9 – 14,5)	-0,29	0,095
CV%_Jądro kom_Maksymalna średnica [μm]	11,6; 9,9 – 12,4 (7,9 – 15,7)	-0,23	0,186
CV%_Jądro kom_Średnia średnica [μm]	11,1; 10,0 – 12,2 (7,4 – 14,8)	-0,21	0,219

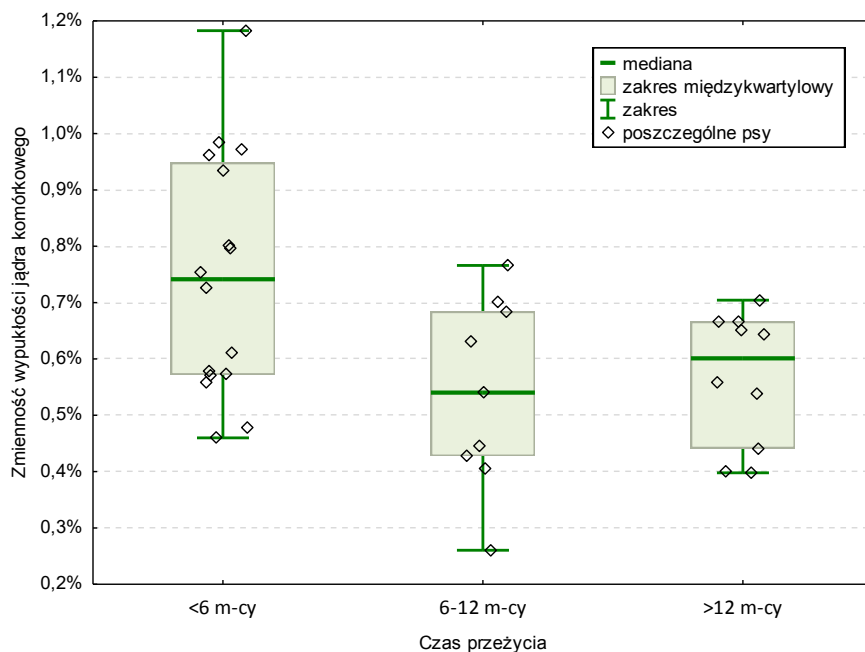
CV%_ Jądro kom _Obwód [μm]	11,1; 9,9 – 12,2 (7,4 – 15,1)	-0,20	0,256
CV%_ Jądro kom _Obwód z wypukłościami [μm]	11,1; 10 – 12,2 (7,5 – 14,9)	-0,21	0,215
CV%_ Jądro kom _Minimalny promień [μm]	12,3; 11,6 – 13,5 (8,9 – 14,5)	-0,29	0,095
CV%_ Jądro kom _Maksymalny promień [μm]	11,6; 9,9 – 12,4 (7,9 – 15,7)	-0,23	0,186
CV%_ Jądro kom _Średni promień [μm]	11,1; 10,0 – 12,2 (7,4 – 14,8)	-0,21	0,219
Zmienność indeksów [%]			
Stosunek jądro-komórka (N/C)	8,1; 7,5 – 8,8 (5,8 – 11,8)	0,15	0,394
Stosunek jądro-komórka (N/C z wypukłościami)	8,1; 7,3 – 8,9 (5,8 – 11,9)	0,16	0,354
Kulistość komórki	4,2; 3,9 – 4,6 (3,0 – 5,1)	-0,26	0,132
Kulistość jądra komórkowego	7,2; 6,6 – 7,7 (5,7 – 9,4)	-0,32	0,060
Wypukłość komórki	0,10; 0,07 – 0,20 (0,06 – 0,30)	-0,28	0,097
Wypukłość jądra komórkowego	0,63; 0,48 – 0,76 (0,26 – 1,20)	-0,34	0,043
Zmienność wymiarów jąderk [%] (n=18)			
CV%_ Jąderko _ Pole powierzchni [μm^2]	55,2; 50,4 – 59,2 (41,3 – 125,8)	-0,13	0,610
CV%_ Jąderko _ Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	54,7; 50,2 – 58,8 (41,0 – 127,2)	-0,11	0,651
CV%_ Jąderko _ Minimalna średnica [μm]	27,4; 25,4 – 31,1 (19,5 – 49,8)	-0,12	0,633
CV%_ Jąderko _ Maksymalna średnica [μm]	26,4; 24,0 – 29,4 (20,4 – 44,1)	0,07	0,785
CV%_ Jąderko _ Średnia średnica [μm]	27,3; 24,6 – 28,9 (19,9 – 48,5)	-0,15	0,553
CV%_ Jąderko _ Obwód [μm]	27,0; 24,9 – 28,8 (20,2 – 47,3)	-0,04	0,861
CV%_ Jąderko _ Obwód z wypukłościami [μm]	26,9; 24,9 – 29,0 (20,2 – 47,0)	-0,04	0,887
CV%_ Jąderko _ Minimalny promień [μm]	27,4; 25,4 – 31,1 (19,5 – 49,8)	-0,12	0,633
CV%_ Jąderko _ Maksymalny promień [μm]	26,4; 24,0 – 29,4 (20,4 – 44,1)	0,07	0,785
CV%_ Jąderko _ Średni promień [μm]	27,3; 24,6 – 28,9 (19,9 – 48,5)	-0,15	0,553
CV%_ Jąderko _ Kulistość	10,8; 8,9 – 11,7 (5,8 – 14,5)	-0,09	0,711
CV%_ Jąderko _ Wypukłość	0,69; 0,52 – 0,82 (0,33 – 1,1)	-0,18	0,463



Ryc. 30. Wykres rozrzutu pomiędzy całkowitym czasem przeżycia psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym a zmiennością wypukłości jądra komórkowego

6.2.3. Analiza różnic w długości całkowitego czasu przeżycia pomiędzy grupami psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym

Jedynym parametrem cytomorfometrycznym istotnie różniącym się między grupami psów z chłoniakiem centroblastycznym była zmienność wypukłości jądra komórkowego ($p=0,030$). Na rycinie (ryc. 31) przedstawiono tendencję do wyższej zmienności wypukłości jądra komórkowego w grupie psów z całkowitym czasem przeżycia <6 miesięcy w porównaniu z pozostałymi grupami. Różnica znikła przy wykonaniu testu post-hoc, w którym porównania poszczególnych par grup, nie osiągnęły istotności statystycznej (grupa <6 m-cy vs. grupa 6-12 m-cy: $p=0,076$; grupa <6 m-cy vs. grupa >12 m-cy: $p=0,094$; grupa 6-12 m-cy vs. grupa >12 m-cy: $p=0,99$). Pozostałe analizowane cechy morfologiczne, zarówno cytoplazmatyczne, jak i jądrowe, wykazywały wartości na poziomie nieistotności statystycznej (tab. 5), w tym także dla parametrów jąderkowych, które oceniono u wybranej liczby pacjentów w każdej grupie.



Ryc. 31. Zmienność wypukłości jądra komórkowego w grupach psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym różniących się całkowitym czasem przeżycia

Tabela. 5. Wyniki pomiarów cytomorfometrycznych w trzech grupach psów z chłoniakiem centroblastycznym wielopostaciowym o różnym czasie przeżycia

	Całkowity czas przeżycia			Test Kruskala- Wallisa wartość p
	<6 m-cy (n=16)	6-12 m-cy (n=9)	>12 m-cy (n=10)	
Średnie wymiary komórek				
M_Komórka_Pole powierzchni [μm ²]	100; 93,7 – 107 (67,1 – 117)	99,3; 92,7 – 108 (87,5 – 118)	97,0; 92,5 – 112 (81,1 – 116)	0,983
M_Komórka_Pole powierzchni z wypukłościami [μm ²]	101; 94,4 – 108 (67,5 – 117)	99,9; 93,1 – 109 (88 – 118)	97,5; 93 – 113 (81,5 – 116)	0,982
M_Komórka_Minimalna średnica [μm]	10,6; 10,2 – 10,9 (8,62 – 11,5)	10,6; 10,3 – 10,9 (9,86 – 11,6)	10,5; 10,3 – 11,2 (9,52 – 11,4)	0,973
M_Komórka_Maksymalna średnica [μm]	11,9; 11,5 – 12,3 (9,8 – 12,7)	11,8; 11,4 – 12,4 (11,1 – 12,8)	11,7; 11,3 – 12,6 (10,7 – 12,8)	0,999
M_Komórka_Średnia średnica [μm]	11,2; 10,9 – 11,6 (9,17 – 12,1)	11,2; 10,8 – 11,6 (10,5 – 12,1)	11; 10,8 – 11,9 (10,1 – 12,1)	0,997

M_Komórka _Obwód [μm]	37,4; 36,4 – 38,8 (31 – 40,4)	37,5; 36,1 – 39 (35,2 – 40,5)	36,9; 35,9 – 39,7 (33,8 – 40,4)	0,998
M_Komórka _Obwód z wypukłościami [μm]	37,4; 36,3 – 38,8 (30,8 – 40,4)	37,4; 36,1 – 39 (35,2 – 40,5)	36,9; 35,9 – 39,7 (33,8 – 40,4)	0,990
M_Komórka _Minimalny promień [μm]	5,3; 5,12 – 5,45 (4,31 – 5,75)	5,31; 5,14 – 5,44 (4,93 – 5,8)	5,24; 5,13 – 5,60 (4,76 – 5,72)	0,973
M_Komórka _Maksymalny promień [μm]	5,94; 5,77 – 6,17 (4,9 – 6,35)	5,90; 5,69 – 6,20 (5,57 – 6,39)	5,84; 5,66 – 6,31 (5,36 – 6,39)	0,999
M_Komórka _Średni promień [μm]	5,6; 5,43 – 5,79 (4,58 – 6,03)	5,58; 5,39 – 5,81 (5,23 – 6,07)	5,51; 5,38 – 5,93 (5,05 – 6,03)	0,997
Średnie wymiary jąder komórkowych				
M_Jądro kom _ Pole powierzchni [μm^2]	68,7; 64,6 – 73,9 (46,7 – 81,7)	66,2; 64,4 – 71,7 (61 – 81,4)	64,5; 62,9 – 75,1 (57,2 – 77,8)	0,667
M_Jądro kom _ Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	69,5; 65,4 – 74,6 (47,3 – 83,0)	66,8; 64,9 – 72,6 (61,6 – 82,2)	65,2; 63,4 – 76,0 (57,8 – 78,6)	0,686
M_Jądro kom _Minimalna średnica [μm]	8,4; 8,19 – 8,75 (6,85 – 9,23)	8,39; 8,23 – 8,74 (7,86 – 9,07)	8,21; 8,13 – 8,76 (7,76 – 8,94)	0,781
M_Jądro kom _Maksymalna średnica [μm]	10,1; 9,83 – 10,5 (8,41 – 11,0)	9,85; 9,73 – 10,3 (9,52 – 11,1)	9,84; 9,65 – 10,6 (9,15 – 10,8)	0,758
M_Jądro kom _Średnia średnica [μm]	9,24; 9,01 – 9,60 (7,64 – 10,1)	9,11; 8,98 – 9,49 (8,74 – 10,1)	9,00; 8,88 – 9,71 (8,48 – 9,89)	0,736
M_Jądro kom _Obwód [μm]	31,3; 30,5 – 32,6 (26,1 – 34,4)	30,8; 30,3 – 31,9 (29,6 – 34,1)	30,4; 29,9 – 32,9 (28,6 – 33,5)	0,686
M_Jądro kom _Obwód z wypukłościami [μm]	31,2; 30,4 – 32,5 (26,0 – 34,2)	30,7; 30,3 – 31,9 (29,5 – 34,1)	30,4; 29,9 – 32,8 (28,5 – 33,5)	0,722

M_ Jądro kom_Minimalny promień [μm]	4,20; 4,09 – 4,37 (3,42 – 4,62)	4,19; 4,11 – 4,37 (3,93 – 4,53)	4,11; 4,06 – 4,38 (3,88 – 4,47)	0,781
M_ Jądro kom_Maksymalny promień [μm]	5,04; 4,91 – 5,26 (4,21 – 5,48)	4,93; 4,86 – 5,13 (4,76 – 5,54)	4,92; 4,82 – 5,32 (4,58 – 5,42)	0,758
M_ Jądro kom_Średni promień [μm]	4,62; 4,5 – 4,8 (3,82 – 5,05)	4,55; 4,49 – 4,74 (4,37 – 5,04)	4,50; 4,44 – 4,85 (4,24 – 4,94)	0,736
Średnie indeksy				
Stosunek jądro-komórka (N/C)	0,697; 0,681 – 0,717 (0,664 – 0,763)	0,696; 0,667 – 0,699 (0,642 – 0,724)	0,675; 0,665 – 0,682 (0,663 – 0,727)	0,129
Stosunek jądro-komórka (N/C z wypukłościami)	0,702; 0,684 – 0,720 (0,67 – 0,769)	0,700; 0,670 – 0,702 (0,645 – 0,728)	0,678; 0,667 – 0,685 (0,666 – 0,732)	0,096
Kulistość komórki	0,890; 0,887 – 0,899 (0,856 – 0,906)	0,895; 0,885 – 0,903 (0,873 – 0,909)	0,895; 0,891 – 0,899 (0,886 – 0,907)	0,444
Kulistość jądra komórkowego	0,834; 0,828 – 0,844 (0,807 – 0,854)	0,841; 0,836 – 0,852 (0,82 – 0,853)	0,838; 0,826 – 0,845 (0,821 – 0,859)	0,425
Wypukłość komórki	0,995; 0,994 – 0,995 (0,991 – 0,996)	0,995; 0,995 – 0,995 (0,99 – 0,996)	0,995; 0,995 – 0,995 (0,993 – 0,996)	0,600
Wypukłość jądra komórkowego	0,989; 0,988 – 0,991 (0,984 – 0,992)	0,991; 0,991 – 0,991 (0,987 – 0,993)	0,991; 0,990 – 0,993 (0,988 – 0,993)	0,063
Średnie wymiary jąderek				
M_ Jąderko_Pole powierzchni [μm^2]	5,14; 4,53 – 7,34 (3,66 – 8,19)	4,93; 3,63 – 6,47 (3,63 – 6,47)	4,98; 4,31 – 6,64 (3,28 – 7,03)	0,628
M_ Jąderko_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	5,27; 4,61 – 7,47 (3,74 –	5,04; 3,71 – 6,57 (3,71	5,06; 4,39 – 6,74	0,628

	8,3)	– 6,57)	(3,34 – 7,20)	
M_ Jąderko_Minimalna średnica [μm]	2,18; 2,06 – 2,6 (1,81 – 2,82)	2,14; 1,81 – 2,42 (1,81 – 2,42)	2,12; 2,03 – 2,49 (1,73 – 2,53)	0,693
M_ Jąderko_Maksymalna średnica [μm]	2,78; 2,7 – 3,29 (2,41 – 3,51)	2,73; 2,38 – 3,19 (2,38 – 3,19)	2,81; 2,57 – 3,09 (2,26 – 3,37)	0,703
M_ Jąderko_Średnia średnica [μm]	2,45; 2,33 – 2,9 (2,08 – 3,13)	2,4; 2,06 – 2,76 (2,06 – 2,76)	2,42; 2,26 – 2,8 (1,94 – 2,89)	0,645
M_ Jąderko_Obwód [μm]	8,39; 8,02 – 9,82 (7,25 – 10,6)	8,18; 7,17 – 9,46 (7,17 – 9,46)	8,28; 7,76 – 9,45 (6,72 – 9,89)	0,703
M_ Jąderko_Obwód z wypukłościami [μm]	8,39; 7,98 – 9,8 (7,13 – 10,6)	8,15; 7,06 – 9,46 (7,06 – 9,46)	8,28; 7,76 – 9,45 (6,72 – 9,88)	0,703
M_ Jąderko_Minimalny promień [μm]	1,09; 1,03 – 1,30 (0,906 – 1,41)	1,07; 0,903 – 1,21 (0,903 – 1,21)	1,06; 1,01 – 1,24 (0,863 – 1,27)	0,693
M_ Jąderko_Maksymalny promień [μm]	1,39; 1,35 – 1,65 (1,21 – 1,76)	1,37; 1,19 – 1,59 (1,19 – 1,59)	1,40; 1,29 – 1,55 (1,13 – 1,68)	0,703
M_ Jąderko_Średni promień [μm]	1,22; 1,16 – 1,45 (1,04 – 1,56)	1,2; 1,03 – 1,38 (1,03 – 1,38)	1,21; 1,13 – 1,40 (0,972 – 1,45)	0,645
M_ Jąderko_Kulistość	0,776; 0,762 – 0,783 (0,720 – 0,804)	0,762; 0,757 – 0,78 (0,757 – 0,780)	0,774; 0,743 – 0,785 (0,742 – 0,821)	0,806
M_ Jąderko_Wypukłość	0,980; 0,978 – 0,982 (0,972 – 0,986)	0,977; 0,976 – 0,984 (0,976 – 0,984)	0,981; 0,978 – 0,984 (0,975 – 0,985)	0,788
Zmienność wymiarów komórek [%]				
CV%_Komórka_Pole powierzchni [μm ²]	24,8; 22,9 – 29,1 (19,5 – 31,4)	23,4; 21,6 – 26,2 (18,9 – 27,1)	22,3; 21,6 – 24,4 (21,1 – 26,9)	0,219
CV%_Komórka_Pole	24,7; 22,8 –	23,4; 21,5 –	22,2; 21,5	0,234

powierzchni z wypukłościami [μm^2]	29,1 (19,5 – 31,4)	26,1 (18,8 – 27,1)	– 24,4 (21 – 26,9)	
CV%_Komórka_Minimalna średnica [μm]	12,4; 11,6 – 13,5 (9,2 – 16,4)	12,6; 11,2 – 13,6 (9,4 – 13,8)	11,3; 10,7 – 11,6 (10,2 – 13)	0,141
CV%_Komórka_Maksymalna średnica [μm]	12,6; 11,3 – 14,3 (10 – 15,9)	11,2; 10,5 – 12,3 (9,9 – 14,1)	11,4; 10,8 – 12,2 (10,5 – 13,7)	0,135
CV%_Komórka_Średniaśrednica [μm]	12,1; 11,4 – 13,7 (9,5 – 15,7)	11,6; 10,5 – 12,9 (9,4 – 13,7)	10,9; 10,7 – 11,6 (10,3 – 12,9)	0,213
CV%_Komórka_Obwód [μm]	12,2; 11,4 – 13,9 (9,6 – 15,8)	11,3; 10,5 – 12,7 (9,5 – 13,8)	11,0; 10,8 – 11,7 (10,4 – 13)	0,188
CV%_Komórka_Obwód z wypukłościami [μm]	12,2; 11,3 – 13,9 (9,6 – 15,8)	11,4; 10,5 – 12,7 (9,5 – 13,8)	11,0; 10,8 – 11,7 (10,3 – 13)	0,205
CV%_Komórka_Minimalny promień [μm]	12,4; 11,6 – 13,5 (9,2 – 16,4)	12,6; 11,2 – 13,6 (9,4 – 13,8)	11,3; 10,7 – 11,6 (10,2 – 13)	0,141
CV%_Komórka_Maksymalny promień [μm]	12,6; 11,3 – 14,3 (10 – 15,9)	11,2; 10,5 – 12,3 (9,9 – 14,1)	11,4; 10,8 – 12,2 (10,5 – 13,7)	0,135
CV%_Komórka_Średni promień [μm]	12,1; 11,4 – 13,7 (9,5 – 15,7)	11,6; 10,5 – 12,9 (9,4 – 13,7)	10,9; 10,7 – 11,6 (10,3 – 12,9)	0,213
Zmienność wymiarów jądra komórkowego [%]				
CV%_Jądro kom_Pole powierzchni [μm^2]	24,5; 22,7 – 25,7 (14,8 – 29,9)	22,2; 21,6 – 22,4 (16,1 – 26,9)	21,6; 19,9 – 23,8 (19,4 – 25,0)	0,099
CV%_Jądro kom_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	24,3; 22,5 – 25,6 (14,8 – 30,1)	22,2; 21,4 – 22,2 (16 – 27)	21,5; 19,8 – 23,6 (19,4 – 24,9)	0,128
CV%_Jądro kom_Minimalna średnica [μm]	13,1; 12,2 – 14,2 (8,9 – 14,5)	12,1; 11,7 – 12,5 (9,3 – 13,4)	12,0; 11,1 – 12,4 (10,7 – 13,7)	0,058
CV%_Jądro kom_Maksymalna średnica [μm]	12,0; 11,2 – 12,6 (8 – 15,7)	10,9; 10,6 – 11,6 (7,9 – 13,7)	10,9; 9,6 – 11,7 (9,3 – 12,7)	0,118
CV%_Jądro kom_Średnia średnica [μm]	11,9; 11,0 – 12,7 (7,4 – 14,8)	11,0; 10,5 – 11,1 (8,2 – 13,2)	10,7; 9,7 – 11,8 (9,4 – 12,2)	0,130

CV%_ Jądro kom _Obwód [μm]	11,9; 11,0– 12,6 (7,4 – 15,1)	10,9; 10,4 – 11,2 (7,9 – 13,2)	10,5; 9,6 – 11,6 (9,4 – 12,2)	0,153
CV%_ Jądro kom _Obwód z wypukłościami [μm]	11,8; 11,0– 12,5 (7,5 – 14,9)	10,9; 10,4 – 11,2 (8,0– 13,2)	10,5; 9,6 – 11,7 (9,4 – 12,2)	0,129
CV%_ Jądro kom _Minimalny promień [μm]	13,1; 12,2 – 14,2 (8,9 – 14,5)	12,1; 11,7 – 12,5 (9,3 – 13,4)	12; 11,1 – 12,4 (10,7 – 13,7)	0,058
CV%_ Jądro kom _Maksymalny promień [μm]	12,0; 11,2 – 12,6 (8,0– 15,7)	10,9; 10,6 – 11,6 (7,9 – 13,7)	10,9; 9,6 – 11,7 (9,3 – 12,7)	0,118
CV%_ Jądro kom _Średni promień [μm]	11,9; 11,0– 12,7 (7,4 – 14,8)	11,0; 10,5 – 11,1 (8,2 – 13,2)	10,7; 9,7 – 11,8 (9,4 – 12,2)	0,130
Zmienność indeksów [%]				
Stosunek jądro-komórka (N/C)	8,0; 7,4 – 9,1 (5,8 – 10,6)	8,3; 7,5 – 8,8 (6,3 – 11,8)	8,1; 8,0– 9,0 (6,7 – 9,4)	0,944
Stosunek jądro-komórka (N/C z wypukłościami)	7,8; 7,3 – 9,2 (5,8 – 10,6)	8,2; 7,3 – 8,8 (6,2 – 11,9)	8,1; 7,9 – 9,1 (6,7 – 9,3)	0,926
Kulistość komórki	4,5; 4,0– 4,8 (3,5 – 5,1)	4,2; 3,9 – 4,4 (3,2 – 4,8)	4,2; 3,5 – 4,3 (3,0– 4,8)	0,155
Kulistość jądra komórkowego	7,4; 6,9 – 7,9 (6,1 – 9,4)	7,4; 6,2 – 7,5 (5,8 – 8,3)	6,7; 6,3 – 7 (5,7 – 8,7)	0,185
Wypukłość komórki	0,14; 0,08 – 0,22 (0,06 – 0,3)	0,1; 0,07 – 0,13 (0,07 – 0,2)	0,07; 0,07 – 0,09 (0,06 – 0,26)	0,142
Wypukłość jądra komórkowego	0,74; 0,57 – 0,95 (0,46 – 1,20)	0,54; 0,43 – 0,68 (0,26 – 0,77)	0,60; 0,44 – 0,67 (0,40– 0,70)	0,030
Zmienność wymiarów jądrek [%]				
CV%_ Jąderko _ Pole powierzchni [μm^2]	54,1; 50,4 – 69,7 (41,3 – 125,8)	55,5; 54,1 – 59,2 (54,1 – 59,2)	55,5; 49,9 – 57,8 (49,3 – 69,5)	0,916
CV%_ Jąderko _ Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	53,8; 50,2 – 69,1 (41 – 127,2)	55,2; 53,9 – 58,8 (53,9 – 58,8)	55,1; 49,7 – 57,5 (49,2 – 69,1)	0,917
CV%_ Jąderko _Minimalna średnica [μm]	27,1; 25,2 – 37,1 (19,5 – 49,8)	30,1; 29,7 – 30,4 (29,7 – 30,4)	27,1; 25,4 – 27,6 (25,3 –	0,645

			32,9)	
CV%_ Jąderko _Maksymalna średnica [μm]	25,3; 24 – 31 (20,4 – 44,1)	27,6; 26,1 – 29,4 (26,1 – 29,4)	27,2; 24 – 28,1 (23,6 – 29,8)	0,769
CV%_ Jąderko _Średnia średnica [μm]	25,2; 24,6 – 33,2 (19,9 – 48,5)	28,3; 27,3 – 28,9 (27,3 – 28,9)	26,4; 24,2 – 27,5 (24 – 30,7)	0,645
CV%_ Jąderko _Obwód [μm]	25,3; 24,9 – 32,6 (20,2 – 47,3)	28,1; 27,0 – 28,8 (27,0 – 28,8)	26,6; 24,9 – 27,8 (24,7 – 30,9)	0,601
CV%_ Jąderko _Obwód z wypukłościami [μm]	25,3; 24,9 – 32,5 (20,2 – 47)	28,1; 27,0 – 29,0 (27,0 – 29,0)	26,5; 24,8 – 27,8 (24,7 – 30,9)	0,601
CV%_ Jąderko _Minimalny promień [μm]	27,1; 25,2 – 37,1 (19,5 – 49,8)	30,1; 29,7 – 30,4 (29,7 – 30,4)	27,1; 25,4 – 27,6 (25,3 – 32,9)	0,645
CV%_ Jąderko _Maksymalny promień [μm]	25,3; 24,0 – 31,0 (20,4 – 44,1)	27,6; 26,1 – 29,4 (26,1 – 29,4)	27,2; 24,0 – 28,1 (23,6 – 29,8)	0,769
CV%_ Jąderko _Średni promień [μm]	25,2; 24,6 – 33,2 (19,9 – 48,5)	28,3; 27,3 – 28,9 (27,3 – 28,9)	26,4; 24,2 – 27,5 (24 – 30,7)	0,645
CV%_ Jąderko _Kulistość	10,9; 9,1 – 12,8 (6,6 – 14,2)	10,8; 10 – 11,7 (10 – 11,7)	9,6; 6,6 – 11,5 (5,8 – 14,5)	0,754
CV%_ Jąderko _Wypukłość	0,73; 0,52 – 0,87 (0,45 – 1,1)	0,7; 0,33 – 1,0 (0,33 – 1,0)	0,61; 0,53 – 0,67 (0,38 – 0,82)	0,542

6.3. Chłoniak T-komórkowy wielopostaciowy mieszany

6.3.1. Charakterystyka badanych grup psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym

W badaniu uwzględnione dane dotyczące 24 psów z rozpoznanym chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym. Całą grupę badaną stanowiło 14 samców i 10 samic, a wiek psów mieścił się w zakresie 1 – 13 lat (mediana: 7 lat, IQR: 5 – 8 lat; tab. 6). Wiek nie różnił się istotnie między płciami ($p=0,549$). W badaniu dominowały psy rasowe (96%).

Tabela 6. Charakterystyka demograficzna badanych psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym

Charakterystyka psa	n=24
Wiek [lata]	1 – 13 lat (mediana: 7 lat, IQR: 5 – 8 lat)
Płeć [n (%)]	
samiec	14 (37)
samica	10 (63)
Rasa [n (%)]	
mieszaniec	1 (4)
rasowy	23 (96)

W tabeli (tab. 7) przedstawiono liczbę psów (n) z podziałem na grupy w zależności od zastosowanego leczenia oraz odpowiadające im wartości całkowitego czasu przeżycia. Dla każdej grupy podano medianę przeżycia oraz zakres wartości minimalnych i maksymalnych (w dniach). Różnica w czasie przeżycia była istotnie dłuższa w przypadku psów leczonych chemioterapią ($p=0,014$).

Tabela 7. Całkowite czasy przeżycia w badanych grupach psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym, w zależności od zastosowanego leczenia

	Mediana całkowitego czasu przeżycia w dniach (zakres)
Brak leczenia (n=5)	61 (19 – 106)
Glikokortykosteroidy (n=4)	87 (30 – 520)
Chemioterapia (n=15)	180 (65 – 381)
Łącznie	(9 – 520)

6.3.2. Oceniane parametry morfometryczne

Wyniki analizy morfometrycznej komórek i jąder komórkowych przedstawiono w tabeli (tab. 8). Dane te opisują charakterystykę całej badanej populacji i stanowią punkt odniesienia do dalszej analizy.

Tabela 8. Średnie wartości i zmienność parametrów cytomorfometrycznych u psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym wyrażona jako mediana, zakres międzykwartylowy i zakres

	Psy (n=24)
Średnie wymiary komórek	
M_Komórka_Pole powierzchni [μm^2]	87,6; 71,0 – 98,7 (48,4 – 142)
M_Komórka_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	88,6; 71,8 – 99,7 (49,0 – 143)
M_Komórka_Minimalna średnica [μm]	9,62; 8,61 – 10,1 (7,05 – 12,2)
M_Komórka_Maksymalna średnica [μm]	11,4; 10,2 – 12,2 (8,45 – 14,6)
M_Komórka_Średnia średnica [μm]	10,5; 9,36 – 11,1 (7,77 – 13,3)
M_Komórka_Obwód [μm]	35,2; 31,5 – 37,3 (26,1 – 45,0)
M_Komórka_Obwód z wypukłościami [μm]	35,2; 31,5 – 37,3 (26,1 – 44,9)
M_Komórka_Minimalny promień [μm]	4,81; 4,30 – 5,03 (3,53 – 6,09)
M_Komórka_Maksymalny promień [μm]	5,69; 5,10 – 6,10 (4,23 – 7,31)
M_Komórka_Średni promień [μm]	5,23; 4,68 – 5,53 (3,88 – 6,64)
Średnie wymiary jąder komórkowych	
M_Jądro kom_Pole powierzchni [μm^2]	64,2; 54,9 – 75,2 (39,7 – 101)
M_Jądro kom_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	65,4; 56,0 – 76,4 (40,5 – 103)
M_Jądro kom_Minimalna średnica [μm]	7,99; 7,28 – 8,67 (6,32 – 10,1)
M_Jądro kom_Maksymalna średnica [μm]	9,91; 9,16 – 10,7 (7,70 – 12,5)
M_Jądro kom_Średnia średnica [μm]	8,95; 8,22 – 9,67 (7,02 – 11,2)
M_Jądro kom_Obwód [μm]	30,5; 28,1 – 32,8 (23,8 – 38,2)
M_Jądro kom_Obwód z wypukłościami [μm]	30,4; 28,0 – 32,7 (23,7 – 38,1)
M_Jądro kom_Minimalny promień [μm]	4,00; 3,64 – 4,33 (3,16 – 5,07)
M_Jądro kom_Maksymalny promień [μm]	4,95; 4,58 – 5,33 (3,85 – 6,23)
M_Jądro kom_Średni promień [μm]	4,48; 4,11 – 4,84 (3,51 – 5,61)
Średnie indeksy	
Stosunek jądro-komórka (N/C)	0,770; 0,729 – 0,798 (0,662 – 0,879)
Stosunek jądro-komórka (N/C z wypukłościami)	0,775; 0,732 – 0,803 (0,665 – 0,862)
Kulistość komórki	0,842; 0,826 – 0,851 (0,777 – 0,880)
Kulistość jądra komórkowego	0,818; 0,801 – 0,827 (0,769 – 0,842)
Wypukłość komórki	0,989; 0,988 – 0,990 (0,986 – 0,991)
Wypukłość jądra komórkowego	0,985; 0,981 – 0,987 (0,978 – 0,988)
Zmienność wymiarów komórek [%]	
CV%_Komórka_Pole powierzchni [μm^2]	28,6; 26,7 – 31,4 (19,9 – 39,6)
CV%_Komórka_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	28,5; 26,6 – 31,2 (19,7 – 39,4)
CV%_Komórka_Minimalna średnica [μm]	14,5; 13,3 – 15,6 (11,2 – 18,3)

CV%_Komórka_Maksymalna średnica[μm]	14,4; 13,2 – 16,2 (10,3 – 18,7)
CV%_Komórka_Średnia średnica [μm]	14,0; 13,0 – 15,4 (9,9 – 18,0)
CV%_Komórka_Obwód [μm]	13,9; 13,1 – 15,6 (9,8 – 18,3)
CV%_Komórka_Obwód z wypukłościami [μm]	13,9; 13,1 – 15,6 (9,8 – 18,3)
CV%_Komórka_Minimalny promień [μm]	14,5; 13,3 – 15,6 (11,2 – 18,3)
CV%_Komórka_Maksymalny promień [μm]	14,4; 13,2 – 16,2 (10,3 – 18,7)
CV%_Komórka_Średni promień [μm]	14,0; 13,0 – 15,4 (9,9 – 18,0)
Zmienność wymiarów jądra komórkowego [%]	
CV%_Jądro kom_Pole powierzchni[μm^2]	27,4; 25,6 – 30,5 (20,8 – 35,8)
CV%_Jądro kom_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	27,4; 25,6 – 30,4 (20,9 – 35,5)
CV%_Jądro kom_Minimalna średnica [μm]	14,4; 13,6 – 15,7 (10,4 – 18,4)
CV%_Jądro kom_Maksymalna średnica [μm]	13,6; 12,8 – 15,0 (11,3 – 18,2)
CV%_Jądro kom_Średnia średnica [μm]	13,2; 12,5 – 14,7 (10,4 – 16,9)
CV%_Jądro kom_Obwód [μm]	13,5; 12,7 – 15,0 (10,9 – 16,9)
CV%_Jądro kom_Obwód z wypukłościami [μm]	13,3; 12,6 – 14,8 (10,9 – 16,9)
CV%_Jądro kom_Minimalny promień [μm]	14,4; 13,6 – 15,7 (10,4 – 18,4)
CV%_Jądro kom_Maksymalny promień [μm]	13,6; 12,8 – 15,0 (11,3 – 18,2)
CV%_Jądro kom_Średni promień [μm]	13,2; 12,5 – 14,7 (10,4 – 16,9)
Zmienność indeksów [%]	
Stosunek jądro-komórka (N/C)	8,0; 7,6 – 9,5 (4,8 – 12,8)
Stosunek jądro-komórka (N/C z wypukłościami)	8,0; 7,5 – 9,5 (4,5 – 12,8)
Kulistość komórki	6,8; 6,0 – 8,0 (3,7 – 11,1)
Kulistość jądra komórkowego	8,2; 7,4 – 8,7 (5,9 – 11,3)
Wypukłość komórki	0,20; 0,17 – 0,23 (0,15 – 0,47)
Wypukłość jądra komórkowego	0,85; 0,62 – 1,20 (0,31 – 1,80)

6.3.3. Analiza związku parametrów cytomorfometrycznych z całkowitym czasem przeżycia w grupie psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym leczonych chemioterapią

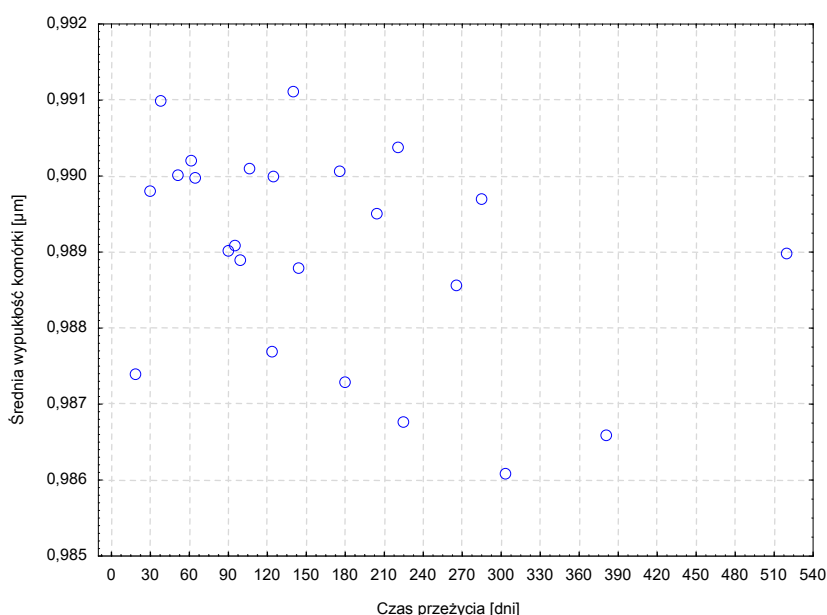
Spośród analizowanych parametrów cytomorfometrycznych w grupie psów leczonych chemioterapią, jedynym parametrem, który wykazał istotną korelację z całkowitym czasem przeżycia była wypukłość komórki ($p=0,041$). Średnia wartość tego parametru znajdowała się na granicy istotności ($p=0,054$). Szczegółowe dane przedstawiono w tabeli (tab. 9). Po zastosowaniu poprawki na powtórzenia wielokrotne żaden z parametrów nie utrzymał poziomu istotności. Na rycinach (ryc. 32-33) nie zaobserwowano wyraźnego trendu korelacyjnego pomiędzy całkowitym czasem przeżycia a wypukłością komórek. Pozostałe analizowane parametry nie osiągnęły istotności statystycznej ($p>0,05$).

Tabela 9. Związek między pomiarami cytomorfometrycznymi a całkowitym czasem przeżycia w grupie psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym leczonych chemioterapią

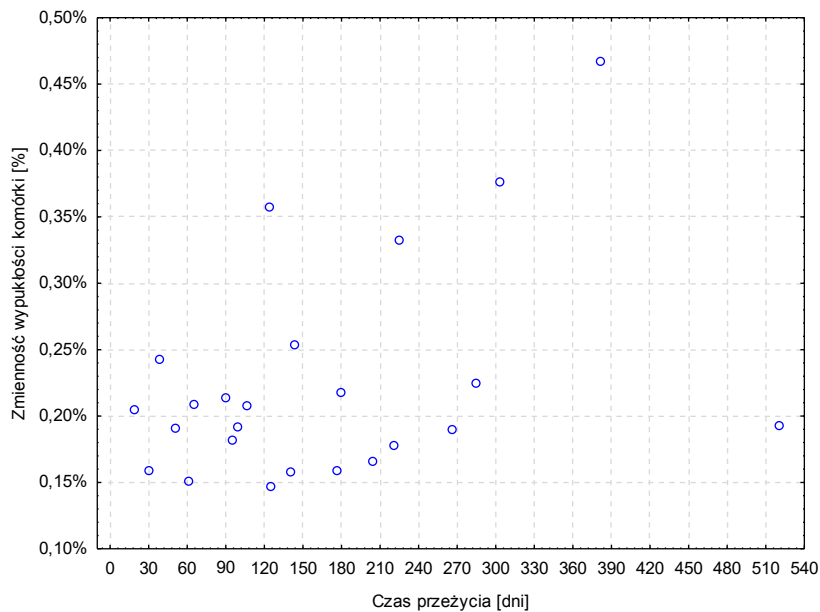
		Korelacja całkowitym z czasem przeżycia	
	Psy leczone chemioterapią (n=15)	R _s	Wartość p
Średnie wymiary komórek			
M_Komórka_Pole powierzchni [μm²]	85,1; 67,9 – 101 (48,4 – 125)	-0,18	0,533
M_Komórka_Pole powierzchni z wypukłościami [μm²]	86,0; 68,7 – 102 (49,0– 126)	-0,18	0,533
M_Komórka_Minimalna średnica [μm]	9,56; 8,50– 10,1 (7,05 – 11,2)	-0,20	0,467
M_Komórka_Maksymalna średnica[μm]	11,3; 10,0– 12,3 (8,54 – 13,7)	-0,13	0,639
M_Komórka_Średnia średnica [μm]	10,3; 9,20– 11,2 (7,77 – 12,4)	-0,18	0,533
M_Komórka_Obwód [μm]	34,8; 31,0– 37,8 (26,1 – 41,8)	-0,13	0,657
M_Komórka_Obwód z wypukłościami [μm]	34,8; 31,0– 37,8 (26,1 – 41,8)	-0,13	0,657
M_Komórka_Minimalny promień [μm]	4,78; 4,25 – 5,04 (3,53 – 5,61)	-0,20	0,467
M_Komórka_Maksymalny promień [μm]	5,67; 5,02 – 6,13 (4,27 – 6,86)	-0,13	0,639
M_Komórka_Średni promień [μm]	5,15; 4,60– 5,61 (3,88 – 6,20)	-0,18	0,533
Średnie wymiary jąder komórkowych			
M_Jądro kom_Pole powierzchni[μm²]	61,5; 51,9 – 75,6 (40,6 – 80,9)	-0,25	0,376
M_Jądro kom_Pole powierzchni z wypukłościami [μm²]	62,4; 52,8 – 76,8 (41,2 – 81,9)	-0,25	0,376
M_Jądro kom_Minimalna średnica [μm]	7,94; 7,18 – 8,68 (6,50– 9,07)	-0,24	0,398
M_Jądro kom_Maksymalna średnica [μm]	9,66; 8,90– 10,7 (7,80– 11,1)	-0,19	0,499
M_Jądro kom_Średnia średnica [μm]	8,76; 8,02 – 9,71 (7,12 – 10,0)	-0,25	0,376
M_Jądro kom_Obwód [μm]	29,7; 27,3 – 33,1 (23,9 – 33,9)	-0,22	0,428
M_Jądro kom_Obwód z wypukłościami [μm]	29,6; 27,2 – 33,0 (23,9 – 33,8)	-0,24	0,390
M_Jądro kom_Minimalny promień	3,97; 3,59 – 4,34	-0,24	0,398

[μm]	(3,25 – 4,54)		
M_ Jądro kom_ Maksymalny promień [μm]	4,83; 4,45 – 5,34 (3,90 – 5,53)	-0,19	0,499
M_ Jądro kom_ Średni promień [μm]	4,38; 4,01 – 4,85 (3,56 – 5,00)	-0,25	0,376
Średnie indeksy			
Stosunek jądro-komórka (N/C)	0,767; 0,722 – 0,784 (0,662 – 0,840)	-0,34	0,221
Stosunek jądro-komórka (N/C z wypukłościami)	0,769; 0,724 – 0,787 (0,665 – 0,841)	-0,33	0,237
Kulistość komórki	0,838; 0,822 – 0,849 (0,777 – 0,880)	-0,41	0,128
Kulistość jądra komórkowego	0,818; 0,798 – 0,830 (0,769 – 0,842)	-0,40	0,140
Wypukłość komórki	0,989; 0,987 – 0,990 (0,986 – 0,991)	-0,51	0,054
Wypukłość jądra komórkowego	0,985; 0,981 – 0,987 (0,978 – 0,988)	-0,40	0,136
Zmienność wymiarów komórek [%]			
CV%_Komórka_Pole powierzchni [μm^2]	27,6; 26,0 – 31,2 (23,7 – 39,6)	-0,27	0,328
CV%_Komórka_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	27,5; 25,9 – 31,1 (23,5 – 39,4)	-0,27	0,328
CV%_Komórka_Minimalna średnica [μm]	14,0; 13,2 – 16,2 (12,7 – 18,3)	-0,18	0,524
CV%_Komórka_Maksymalna średnica [μm]	14,1; 13,1 – 16,3 (12,0 – 18,7)	-0,21	0,459
CV%_Komórka_Średnia średnica [μm]	13,3; 12,8 – 15,9 (11,5 – 18,0)	-0,34	0,221
CV%_Komórka_Obwód [μm]	13,5; 12,7 – 15,9 (11,7 – 18,3)	-0,33	0,232
CV%_Komórka_Obwód z wypukłościami [μm]	13,4; 12,7 – 15,9 (11,8 – 18,3)	-0,35	0,206
CV%_Komórka_Minimalny promień [μm]	14,0; 13,2 – 16,2 (12,7 – 18,3)	-0,18	0,524
CV%_Komórka_Maksymalny promień [μm]	14,1; 13,1 – 16,3 (12,0 – 18,7)	-0,21	0,459
CV%_Komórka_Średni promień [μm]	13,3; 12,8 – 15,9 (11,5 – 18,0)	-0,34	0,221
Zmienność wymiarów jądra komórkowego [%]			
CV%_Jądro kom_Pole powierzchni [μm^2]	27,4; 25,3 – 32,5 (24,5 – 35,8)	0,01	0,970
CV%_Jądro kom_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	27,5; 25,3 – 32,5 (24,3 – 35,5)	0,01	0,970
CV%_Jądro kom_Minimalna średnica [μm]	14,4; 13,3 – 16,8 (12,8 – 18,4)	0,40	0,140
CV%_Jądro kom_Maksymalna średnica [μm]	13,7; 12,8 – 15,1 (11,3 – 18,2)	-0,10	0,732

CV%_ Jądro kom _Średnia średnica [μm]	13,3; 12,4 – 15,7 (11,8 – 16,9)	0,08	0,781
CV%_ Jądro kom _Obwód [μm]	13,4; 12,6 – 15,0 (11,5 – 16,9)	0,04	0,879
CV%_ Jądro kom _Obwód z wypukłościami [μm]	13,4; 12,4 – 15,2 (11,6 – 16,9)	0,01	0,980
CV%_ Jądro kom _Minimalny promień [μm]	14,3; 13,3 – 16,8 (12,8 – 18,4)	0,40	0,140
CV%_ Jądro kom _Maksymalny promień [μm]	13,7; 12,8 – 15,1 (11,3 – 18,2)	-0,10	0,732
CV%_ Jądro kom _Średni promień [μm]	13,3; 12,3 – 15,7 (11,8 – 16,9)	0,08	0,781
Zmienność indeksów [%]			
Stosunek jądro-komórka (N/C)	8,1; 7,6 – 9,6 (4,8 – 12,8)	-0,01	0,980
Stosunek jądro-komórka (N/C z wypukłościami)	8,1; 7,5 – 9,6 (4,7 – 12,8)	-0,06	0,840
Kulistość komórki	6,8; 6,5 – 8,0 (3,7 – 11,1)	0,43	0,114
Kulistość jądra komórkowego	8,4; 6,9 – 8,6 (6,2 – 11,3)	0,32	0,243
Wypukłość komórki	0,19; 0,17 – 0,25 (0,15 – 0,47)	0,53	0,041
Wypukłość jądra komórkowego	0,80; 0,52 – 1,40 (0,31 – 1,50)	0,10	0,723



Ryc. 32. Wykres rozrzutu pomiędzy całkowitym czasem przeżycia psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym poddanych chemioterapii a parametrami wypukłości komórki dla średniej wartości wypukłości komórki. Każdy punkt odpowiada wartości uzyskanej dla pojedynczego pacjenta



Ryc. 33. Wykres rozrzutu pomiędzy całkowitym czasem przeżycia psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym mieszanym poddanych chemioterapii a parametrami wypukłości komórki dla zmienności wypukłości komórki. Każdy punkt odpowiada wartości uzyskanej dla pojedynczego pacjenta

6.4. Guz z komórek tucznych

6.4.1. Charakterystyka badanych grup psów z guzem z komórek tucznych o niskiej złośliwości histologicznej

Badaniem objęto 27 psów z guzem z komórek tucznych o niskiej złośliwości histologicznej (MCT low grade), które w badaniu cytologicznym określono jako guz komórek tucznych o I stopniu złośliwości lub niejednoznacznym stopniu złośliwości (stopień I/II). Grupę badaną stanowiło 9 samców i 18 samic, a wiek psów mieścił się w przedziale 6 – 18 lat (mediana: 11 lat, IQR: 8 – 13 lat). Nie stwierdzono istotnych różnic wieku między płciami ($p=0,738$). W badanej grupie większość stanowiły psy rasowe (85%).

Tabela 10. Charakterystyka demograficzna badanych psów z guzem z komórek tucznych o niskim stopniu złośliwości histologicznej

Charakterystyka psów	n=27
Wiek	6 – 18 lat (mediana: 11 lat, IQR: 8 – 13 lat)
Płeć [n (%)]	
samiec	9 (33,3)
samica	18 (66,7)
Rasa [n (%)]	
mieszaniec	4 (15)
rasowy	23 (85)

6.4.2. Oceniane parametry cytomorfometryczne

Wybrane parametry cytomorfometryczne (pole powierzchni i obwód) obliczono w dwóch wariantach: klasycznym oraz uwzględniającym wypukłości obrysu komórki. Porównanie par zestawiających parametr klasyczny z odpowiadającym mu parametrem uwzględniającym wypukłości, wykazało bardzo wysoką zgodność - wartości korelacji przekraczały 0,99 przy $p < 0,001$.

6.4.3. Zależność między pomiarami cytomorfometrycznymi a obecnością przerzutów guza z komórek tucznych o niskim stopniu złośliwości histologicznej

W porównaniu grup psów z przerzutami guza z komórek tucznych o niskiej złośliwości histologicznej do regionalnych węzłów chłonnych (grupa I) i bez przerzutów (grupa II) stwierdzono istotne różnice w średnich wymiarach jąder komórkowych, obejmujących pole powierzchni ($p=0,001$), średnicę ($p=0,001$), oraz obwód ($p=0,001$) (tab. 11). Rozkład wartości dla pola powierzchni, średnicy oraz obwodu w obu grupach przedstawiono na rycinach (ryc. 34-36). Odnotowano również istotne różnice w średnich wartościach wskaźnika kulistości komórki ($p=0,023$) oraz wypukłości jądra ($p=0,038$), jednak różnice dla tych dwóch parametrów były nieznaczne i po zastosowaniu poprawki Holmana-Bonferroniego utraciły one istotność statystyczną (kolejno $p=0,768$ i $p=0,999$).

Tabela 11. Porównanie pomiarów cytomorfometrycznych między badanymi grupami psów z guzem z komórek tłuszczowych o niskim stopniu złośliwości histologicznej

	Grupa I (n=15)	Grupa II (n=12)	Wartość p^4	Wartość p^5
Średnie wymiary komórek				
M_Komórka_Pole powierzchni [μm^2]	218; 192 – 316 (173 – 515)	189; 169 – 221 (140 – 330)	0,083	0,999
M_Komórka_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	220; 194 – 317 (174 – 518)	191; 171 – 222 (142 – 332)	0,083	0,999
M_Komórka_Minimalna średnica [μm]	15,0; 14,3 – 18,2 (13,6 – 23,1)	14,2; 13,4 – 15,1 (12 – 18,5)	0,075	0,999
M_Komórka_Maksymalna średnica [μm]	18,0; 16,8 – 21,5 (15,9 – 26,9)	16,8; 15,8 – 18,2 (14,6 – 22,3)	0,137	0,999
M_Komórka_Średnia średnica [μm]	16,4; 15,4 – 19,8 (14,7 – 24,9)	15,3; 14,5 – 16,5 (13,1 – 20,2)	0,102	0,999
M_Komórka_Obwód [μm]	55,4; 52,2 – 66,5 (49,3 – 84,0)	51,7; 48,9 – 55,9 (44,3 – 68,5)	0,113	0,999
M_Komórka_Obwód z wypukłościami [μm]	55,4; 52,1 – 66,5 (49,3 – 84,0)	51,7; 48,9 – 55,9 (44,3 – 68,5)	0,113	0,999
M_Komórka_Minimalny promień [μm]	7,52; 7,14 – 9,11 (6,81 – 11,6)	7,08; 6,71 – 7,56 (5,98 – 9,25)	0,075	0,999
M_Komórka_Maksymalny promień [μm]	8,98; 8,39 – 10,8 (7,95 – 13,4)	8,42; 7,9 – 9,11 (7,28 – 11,2)	0,137	0,999
M_Komórka_Średni promień [μm]	8,22; 7,7 – 9,88 (7,34 – 12,4)	7,65; 7,26 – 8,27 (6,56 – 10,1)	0,102	0,999

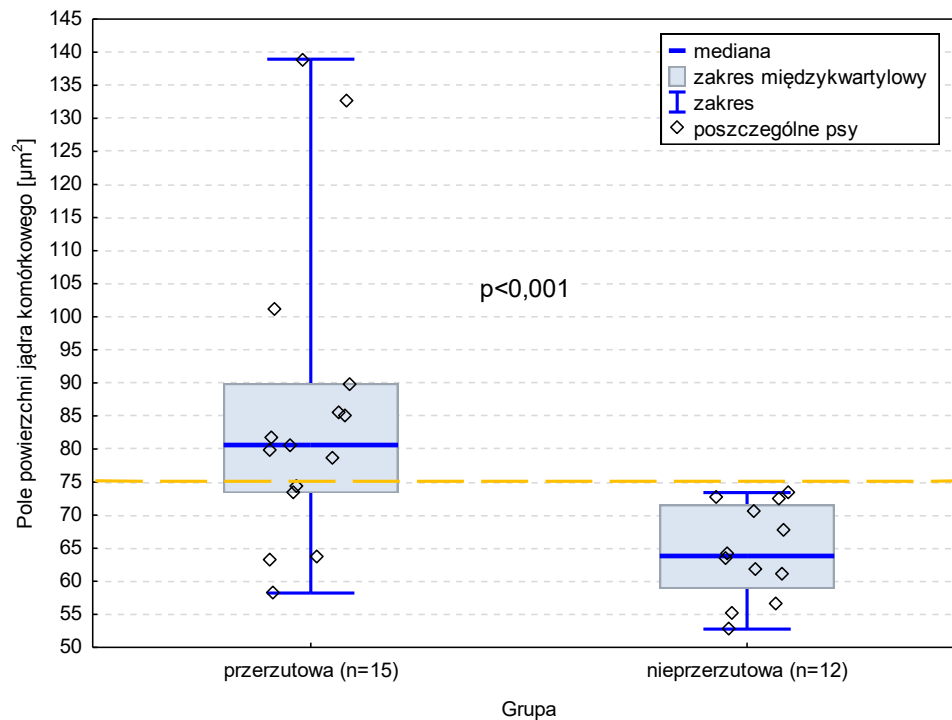
⁴ Bez poprawki na porównania wielokrotne

⁵ Z poprawką Holma-Bonferroniego na porównania wielokrotne (wyjściowa liczba porównań wielokrotnych 40. Z analizy wyłączono promienie komórek i jąder, ponieważ stanowią one funkcję średnicy)

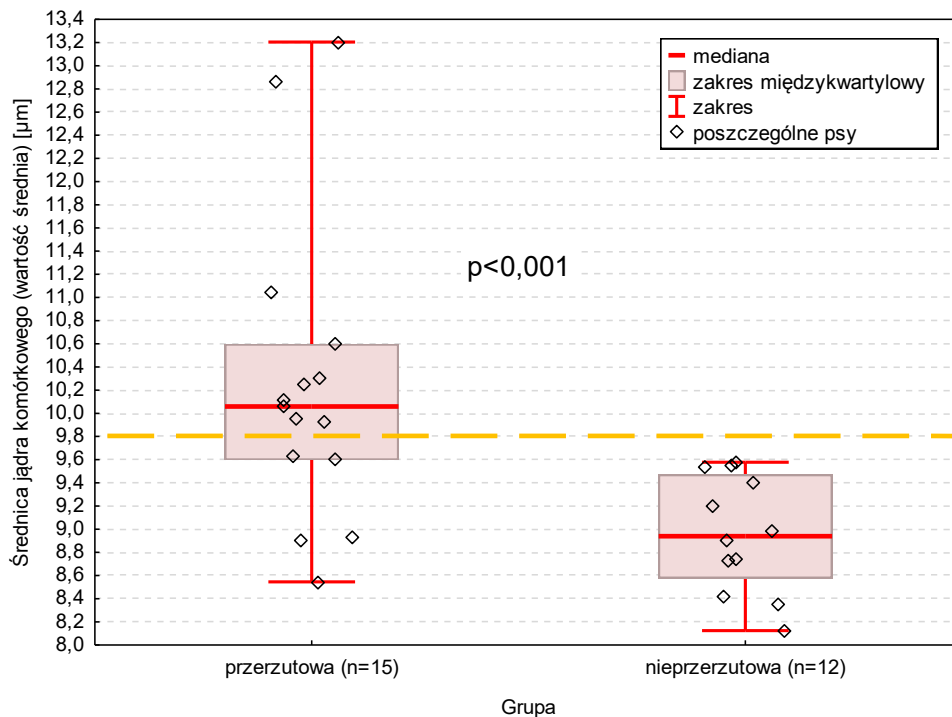
Średnie wymiary jąder komórkowych				
M_ Jądro kom_ Pole powierzchni [μm^2]	80,6; 73,4 – 89,9 (58,2 – 139)	63,8; 58,9 – 71,5 (52,8 – 73,4)	0,001	0,042
M_ Jądro kom_ Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	81,4; 74,2 – 90,8 (59,0 – 141)	64,6; 59,6 – 72,3 (53,4 – 74,2)	0,001	0,041
M_ Jądro kom_ Minimalna średnica [μm]	9,17; 8,71 – 9,64 (7,72 – 12,2)	8,17; 7,76 – 8,68 (7,40 – 8,76)	0,003	0,092
M_ Jądro kom_ Maksymalna średnica [μm]	11,1; 10,6 – 11,7 (9,56 – 14,4)	9,93; 9,46 – 10,4 (8,96 – 10,5)	0,001	0,028
M_ Jądro kom_ Średnia średnica [μm]	10,1; 9,60 – 10,6 (8,55 – 13,2)	8,94; 8,58 – 9,47 (8,12 – 9,58)	0,001	0,032
M_ Jądro kom_ Obwód [μm]	33,9; 32,4 – 35,7 (29,4 – 44,7)	30,2; 28,9 – 31,8 (27,2 – 32,3)	0,001	0,032
M_ Jądro kom_ Obwód z wypukłościami [μm]	33,9; 32,4 – 35,7 (29,3 – 44,6)	30,2; 28,9 – 31,8 (27,2 – 32,3)	0,001	0,031
M_ Jądro kom_ Minimalny promień [μm]	4,58; 4,36 – 4,82 (3,86 – 6,09)	4,09; 3,88 – 4,34 (3,70 – 4,38)	0,003	0,092
M_ Jądro kom_ Maksymalny promień [μm]	5,57; 5,31 – 5,84 (4,78 – 7,22)	4,97; 4,73 – 5,19 (4,48 – 5,27)	0,001	0,028
M_ Jądro kom_ Średni promień [μm]	5,03; 4,80 – 5,30 (4,27 – 6,60)	4,47; 4,29 – 4,74 (4,06 – 4,79)	0,001	0,031
Średnie indeksy				
Stosunek jądro-komórka (N/C)	0,423; 0,307 – 0,434 (0,179 – 0,531)	0,354; 0,336 – 0,402 (0,197 – 0,418)	0,164	0,999
Stosunek jądro-komórka (N/C z wypukłościami)	0,424; 0,308 – 0,435 (0,180 – 0,532)	0,355; 0,338 – 0,403 (0,198 – 0,419)	0,164	0,999
Kulistość komórki	0,847; 0,843 – 0,857 (0,826 – 0,864)	0,833; 0,827 – 0,844 (0,817 – 0,865)	0,023	0,768
Kulistość jądra komórkowego	0,824; 0,812 – 0,827 (0,796 – 0,866)	0,832; 0,825 – 0,837 (0,793 – 0,848)	0,196	0,999
Wypukłość komórki	0,993;	0,993;	0,317	0,999

	0,993 – 0,994 (0,992 – 0,995)	0,992 – 0,993 (0,991 – 0,994)		
Wypukłość jądra komórkowego	0,990; 0,989 – 0,990 (0,988 – 0,992)	0,989; 0,988 – 0,989 (0,988 – 0,990)	0,038	0,999
Zmienność wymiarów komórek [%]				
CV%_Komórka_Pole powierzchni [μm^2]	31,8; 28,2 – 36,6 (22,1 – 47,3)	30,0; 25,2 – 35,2 (23,1 – 43,0)	0,510	0,999
CV%_Komórka_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	31,7; 28,1 – 36,5 (22,1 – 47,2)	29,9; 25,2 – 35,1 (23,0 – 42,9)	0,510	0,999
CV%_Komórka_Minimalna średnica [μm]	15,9; 14,4 – 19,2 (11,9 – 24,8)	15,2; 13,2 – 18,1 (11,7 – 20,6)	0,608	0,999
CV%_Komórka_Maksymalna średnica [μm]	16,3; 13,8 – 19,3 (11,7 – 24,1)	15,0; 12,9 – 18,5 (11,7 – 19,8)	0,510	0,999
CV%_Komórka_Średnia średnica [μm]	15,8; 13,8 – 18,9 (11,2 – 24,3)	14,5; 12,5 – 17,9 (11,4 – 19,9)	0,510	0,999
CV%_Komórka_Obwód [μm]	15,9; 13,8 – 19,0 (11,2 – 24,3)	14,6; 12,5 – 18,2 (11,5 – 19,9)	0,510	0,999
CV%_Komórka_Obwód z wypukłościami [μm]	15,9; 13,8 – 19,1 (11,2 – 24,3)	14,6; 12,5 – 18,2 (11,5 – 19,9)	0,510	0,999
CV%_Komórka_Minimalny promień [μm]	15,9; 14,4 – 19,2 (11,9 – 24,8)	15,2; 13,2 – 18,1 (11,7 – 20,6)	0,608	0,999
CV%_Komórka_Maksymalny promień [μm]	16,3; 13,8 – 19,3 (11,7 – 24,1)	15,0; 12,9 – 18,5 (11,7 – 19,8)	0,510	0,999
CV%_Komórka_Średni promień [μm]	15,8; 13,8 – 18,9 (11,2 – 24,3)	14,5; 12,5 – 17,9 (11,4 – 19,9)	0,510	0,999
Zmienność wymiarów jądra komórkowego [%]				
CV%_Jądro kom_Pole powierzchni [μm^2]	22,1; 19,3 – 27,7 (18,2 – 45,3)	20,9; 19,0 – 22,7 (13,5 – 32,2)	0,317	0,999
CV%_Jądro kom_Pole powierzchni z wypukłościami [μm^2]	22,1; 19,2 – 27,6 (18,1 – 45,1)	20,8; 19,0 – 22,7 (13,5 – 32,0)	0,317	0,999
CV%_Jądro kom_Minimalna średnica [μm]	12,3; 10,5 – 14,5 (8,7 – 24,1)	11,0; 10 – 11,9 (7,4 – 17,1)	0,113	0,999

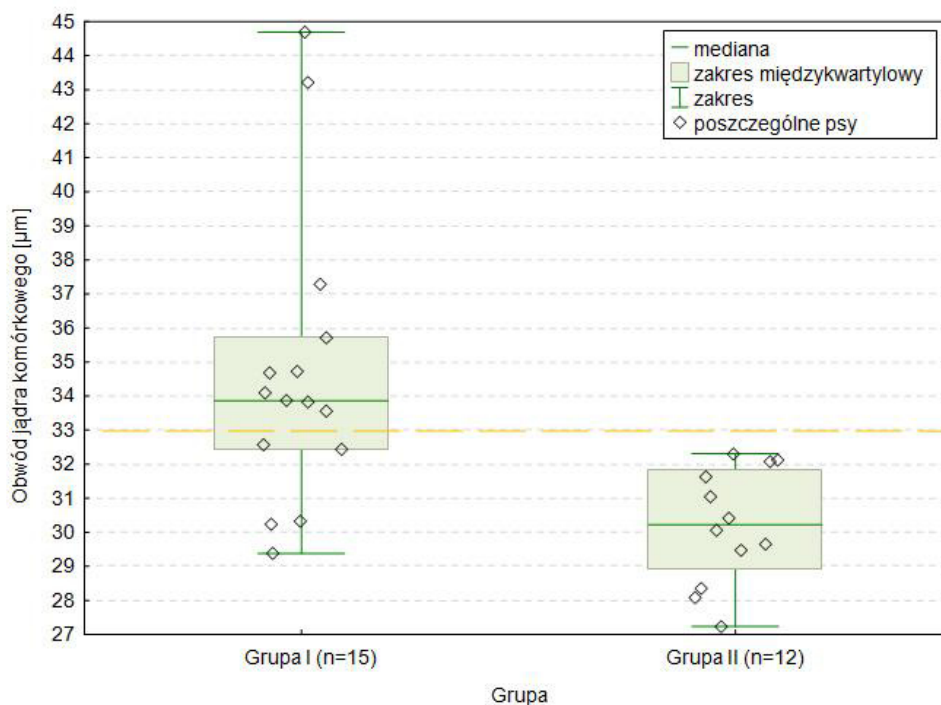
CV%_ Jądro kom _Maksymalna średnica [μm]	11,5; 10,2 – 14,1 (9,4 – 21,6)	10,8; 10 – 12,3 (7,2 – 16,5)	0,393	0,999
CV%_ Jądro kom _Średnia średnica [μm]	11,5; 9,7 – 13,9 (8,8 – 22,4)	10,4; 9,5 – 11,2 (6,7 – 15,9)	0,252	0,999
CV%_ Jądro kom _Obwód [μm]	11,9; 9,6 – 14,7 (9,1 – 22,3)	10,5; 9,6 – 11,4 (6,7 – 16,1)	0,196	0,999
CV%_ Jądro kom _Obwód z wypukłościami [μm]	11,5; 9,6 – 14,0 (9,1 – 22,3)	10,5; 9,6 – 11,3 (6,7 – 16,1)	0,196	0,999
CV%_ Jądro kom _Minimalny promień [μm]	12,3; 10,5 – 14,5 (8,7 – 24,1)	11,0; 10,0 – 11,9 (7,4 – 17,1)	0,113	0,999
CV%_ Jądro kom _Maksymalny promień [μm]	11,5; 10,2 – 14,1 (9,4 – 21,6)	10,8; 10,0 – 12,3 (7,2 – 16,5)	0,393	0,999
CV%_ Jądro kom _Średni promień [μm]	11,5; 9,7 – 13,9 (8,8 – 22,4)	10,4; 9,5 – 11,2 (6,7 – 15,9)	0,252	0,999
Zmienność indeksów [%]				
Stosunek jądro-komórka (N/C)	21,9; 18,2 – 26,4 (13,5 – 43,1)	25,5; 20,7 – 28,6 (17,5 – 34)	0,252	0,999
Stosunek jądro-komórka (N/C z wypukłościami)	21,8; 18,1 – 26,3 (13,4 – 43,0)	25,3; 20,7 – 28,6 (17,5 – 34)	0,252	0,999
Kulistość komórki	6,1; 5,8 – 6,5 (5,2 – 7,7)	7,0; 6,4 – 7,4 (5,2 – 8,8)	0,054	0,999
Kulistość jądra komórkowego	7,3; 6,5 – 8,3 (5,4 – 9,1)	6,7; 6,7 – 7,6 (5,6 – 9)	0,317	0,999
Wypukłość komórki	0,14; 0,11 – 0,18 (0,1 – 0,26)	0,13; 0,12 – 0,15 (0,10 – 0,20)	0,864	0,864
Wypukłość jądra komórkowego	0,20; 0,15 – 0,24 (0,13 – 0,4)	0,16; 0,16 – 0,21 (0,15 – 0,25)	0,643	0,999



Ryc. 34. Rozkład wartości dla pola powierzchni jądra komórkowego w obu badanych grupach psów z MCT o niskiej złośliwości histologicznej. Pomarańczowa przerywana linia oznacza punkt optymalny punkt odcięcia (9.8µm; optymalna wartość graniczną)



Ryc. 35. Rozkład wartości dla średnicy jądra komórkowego w obu badanych grupach psów z MCT o niskiej złośliwości histologicznej. Pomarańczowa przerywana linia oznacza punkt optymalny punkt odcięcia (9.8µm; optymalna wartość graniczną)



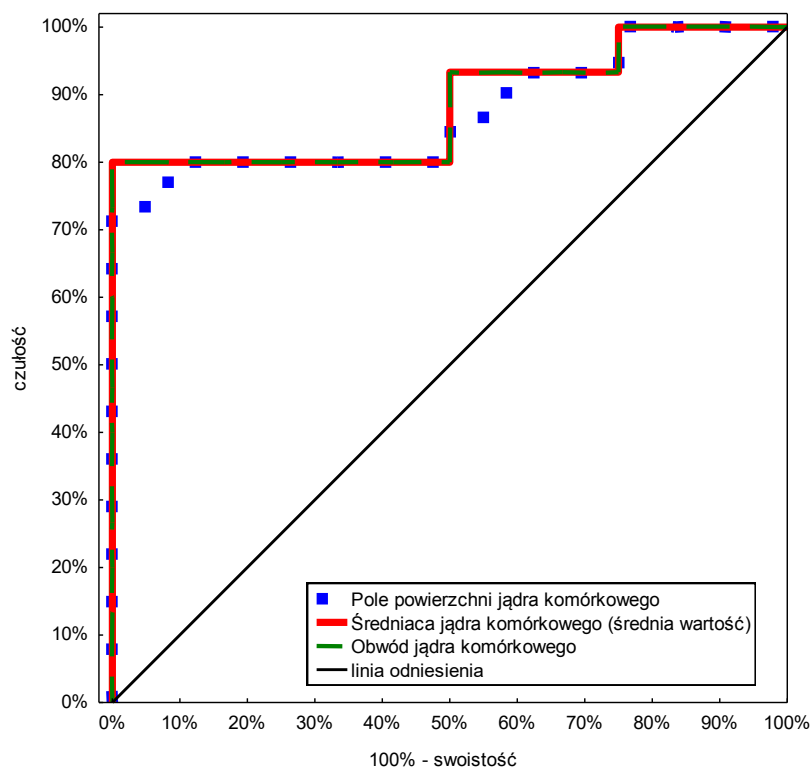
Ryc. 36. Rozkład wartości dla obwodu jądra komórkowego w obu badanych grupach psów z MCT o niskiej złośliwości histologicznej. Pomarańczowa przerywana linia oznacza punkt optymalny punkt odcięcia (9.8µm; optymalna wartość graniczną)

6.4.4. Trafność diagnostyczna wybranych parametrów jądra komórkowego

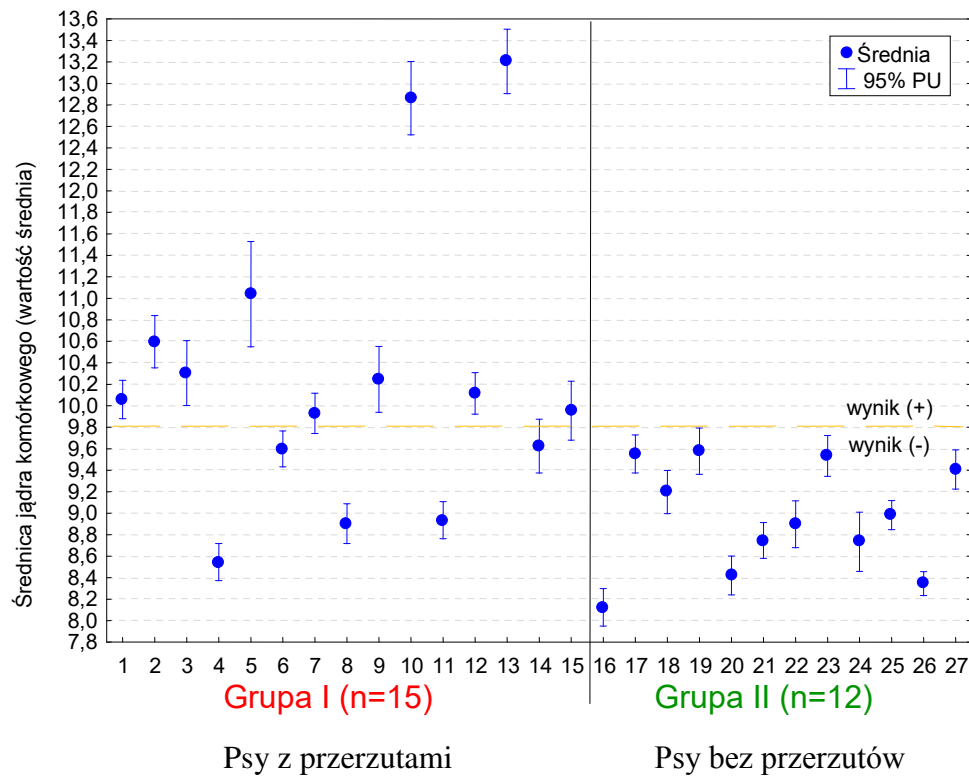
Parametry cytomorfometryczne wykazujące istotność statystyczną (pole powierzchni, średnica, obwód jądra) poddano analizie trafności. Wartości AUROC dla wszystkich badanych cech mieściły się w przedziale 87-88% a swoistość osiągnęła 100%. Szczegółowe wyniki zestawiono w tabeli (tab. 12). Na rycinie (ryc. 37) przedstawiono krzywe ROC dla analizowanych parametrów - wszystkie przebiegały powyżej linii odniesienia. Rycina (ryc. 38) obrazuje rozkład średnich wartości średnicy jądra komórkowego w obu grupach. Większość psów została poprawnie sklasyfikowana względem ustalonego progu (9.8µm), jednak u części psów wartości znajdowały się blisko granicy odcięcia.

Tabela 12. Trafność wybranych parametrów cytomorfometrycznych w odróżnianiu psów z guzem z komórek tłuszczowych o niskim stopniu złośliwości histologicznej z przerzutami i bez przerzutów

						Wartość predykcyjna wyniku przy założeniu prevalencji przerzutów równej 50%	
	AUROC (95% PU) [%]	Optymalny punkt odcięcia	Wartość p	Czułość (ang. sensitivity) (95% PU) [%]	Swoistość (ang. specificity) (95% PU) [%]	Wartość predykcyjna dodatnia (95% PU) [%]	Wartość predykcyjna ujemna (95% PU) [%]
Pole powierzchni jądra komórkowego [μm^2]	87,2 (73,4 – 100)	75	<0,001	68,8 (44,4 – 85,8)	100 (75,8 – 100)	100 (75,8 – 100)	76,2 (60,7 – 80,5)
Średnica jądra komórkowego (średnia) [μm]	88,3 (75,0 – 100)	9,8	<0,001	73,3 (48,0 – 89,1)	100 (75,8 – 100)	100 (81,5 – 100)	78,9 (63,2 – 80,5)
Obwód jądra komórkowego [μm]	88,3 (75,0 – 100)	33	<0,001	73,3 (48,0 – 89,1)	100 (75,8 – 100)	100 (81,5 – 100)	78,9 (63,2 – 80,5)



Ryc. 37. Krzywe ROC dla wybranych parametrów jądra komórkowego (pola powierzchni, średniej średnicy, obwodu) komórek mastocytozy o niskiej złośliwości histologicznej u psów. Analizowane parametry charakteryzowały się wysoką czułością i swoistością (wszystkie krzywe ROC przebiegały blisko górnego rogu wykresu)



Ryc. 38. Rozkład średnich wartości średnicy jądra komórkowego w obu grupach psów z guzem z komórek tłuszczowych o niskiej złośliwości histologicznej. Pomarańczowa przerywana linia oznacza punkt optymalny punkt odcięcia (9.8 μ m; optymalna wartość graniczna)

7. Dyskusja

Badanie cytologiczne materiału pobranego z masy wykrytego guza nowotworowego jest jedną z najczęściej stosowanych metod na początkowym etapie diagnostyki nowotworów u psów, ponieważ jest to badanie tanie, mało inwazyjne, łatwo dostępne, a jego wynik uzyskuje się szybko. Dlatego też, w badaniach własnych uwzględniono właśnie tę metodę wraz z analizą cytomorfometryczną, która umożliwia uzyskanie szczegółowych danych jakościowych i ilościowych dla komórek widocznych w rozmazach cytologicznych. Pozwoliło to na sprawdzenie czy połączenie obu metod mikroskopowej oceny komórek może mieć znaczenie diagnostyczne lub prognostyczne w onkologii weterynaryjnej. Uzyskane wyniki wskazują, że na podstawie analizy cytomorfometrycznej materiału cytologicznego pobranego od psów można uzyskać wartościowe informacje pomocne zarówno w rozpoznawaniu zmian patologicznych w obrębie jamy nosowej, jak i przewidywaniu ryzyka powstawania przerzutów w guzach z komórek tłuszczowych o niskim stopniu złośliwości. W przypadku chłoniaków uzyskane wyniki sugerują, że zastosowanie analizy cytomorfometrycznej nie ma na obecnym etapie wartości prognostycznej.

7.1. Zmiany rozrostowe w jamie nosowej

7.1.1. Charakterystyka demograficzna

W badaniach własnych gruczolakoraki/raki jamy nosowej występowały głównie u psów starszych, co najmniej 6-cio letnich (średnia wieku około 10 lat). Wynik ten jest zgodny z najnowszymi doniesieniami literaturowymi, w których nowotwory te opisywano najczęściej u psów wieku około 9-11 lat (Mizuno i Mori, 2024; Pauly i in., 2024; Vangrinsven i in., 2024). Nieco młodsze były psy, u których rozpoznano nieswoiste zapalenie nosa (średnio około 9 lat), obserwowane już u pacjentów w wieku 2 lat, co także pokrywa się z danymi literaturowymi (Niedenföhr i in., 2024; Vangrinsven i in., 2024). Z kolei, zapalenie nosa o podłożu grzybiczym zarówno w badaniach własnych i według obserwacji innych autorów dotyczy pacjentów najmłodszych, w porównaniu do osobników z nowotworem lub zapaleniem nieswoistym, i chociaż w dalszym ciągu są to psy w średnim wieku (średnio 6-8 lat), to problem grzybicy nosa obserwowano też u kilkumiesięcznych szceniąt lub młodych dorosłych psów (Niedenföhr i in., 2024; Vangrinsven i in., 2024).

Zarówno w badaniach własnych jak i danych z piśmiennictwa nie stwierdzono jednoznacznej predyspozycji, której którejkolwiek płci lub rasy psów do występowania chorób jamy nosowej u psów. Chociaż w badaniach własnych w każdej badanej grupie psów, jak i całościowo dominowały samce, to ze względu na liczebność badanej populacji nie udało się wykazać jednoznacznej skłonności płciowej, co pokrywa się z informacjami uzyskanymi w licznych badaniach (Araujo i in., 2024; Marcus i in., 2025; Mizuno i Mori, 2024; Niedenführ i in., 2024; Pauly i in., 2024; Vangrinsven i in., 2024). Podobnie z predyspozycją rasową, wprowadzie opisywane zmiany rozpoznaje się o osobników ras małych, średnich i dużych, to w przynajmniej części dostępnych badań choroby nosa mogą być powszechniejsze o osobników ras dużych i dolichocefalicznych (Marcus i in., 2025; Niedenführ i in., 2024; Vangrinsven i in., 2024).

7.1.2. Analiza cytomorfometryczna

Uzyskane w badaniach własnych wyniki pozwoliły ocenić, w jaki sposób poszczególne typy zmian patologicznych rozpoznawanych w jamie nosowej u psów znajdują odzwierciedlenie w parametrach cytomorfometrycznych. W badaniach własnych stwierdzono, że większość mierzonych parametrów jąder komórkowych różniła się pomiędzy analizowanymi grupami. Zestawienie wartości średnich wskazuje, że najwyższe parametry jądrowe obserwowano u psów z zapaleniem nieswoistym, gdzie średnia szerokość jądra komórkowego (MNW) wynosiła 9.52 μm , a średnia średnica jądra komórkowego (MND) 10.69 μm , natomiast w zapaleniu grzybiczym wartości te były niższe i wynosiły odpowiednio - 8.54 μm i 9.74 μm . Różnice te osiągnęły istotność statystyczną ($p=0,017$ i $p=0,025$). Podobny obraz odnotowano dla powierzchni jądra komórkowego (MNA), która była wyższa w zapaleniu nieswoistym i niższa w zapaleniu grzybiczym. Średnie wartości w grupie gruczolakoraka/raka były pośrednie i mieściły się pomiędzy wymiarami obserwowanymi w obu typach zapaleń. W odniesieniu do długości i obwodu jąder komórkowych komórek nabłonka jamy nosowej, analiza parami nie wykazała istotności pomiędzy poszczególnymi grupami, choć ogólny efekt między grupami był zauważalny. Pozwala to stwierdzić, że różnice w tych parametrach mają charakter subtelny, zapewne niedostrzegalny w rutynowym badaniu cytologicznym i nie pozwalają jednocześnie wyodrębnić pacjentów z poszczególnych grup badanych.

Interpretacja zaobserwowanych różnic dotyczących morfologii komórek nabłonka pomiędzy zapaleniem nieswoistym a zapaleniem grzybiczym może być przejawem odmiennego mechanizmu biologicznego ich powstawania. W zapaleniu nieswoistym przewlekła stymulacja zapalna prowadzi do regeneracji i rozrostu nabłonka, co histologicznie opisano jako pogrubienie nabłonka z utratą rzęsek oraz zmniejszeniem liczby komórek kubkowych (Neittaanmäki i in., 2025). W obrazie komórkowym nacieku zapalnego dominują w takich przypadkach głównie limfocyty, plazmocyty, a niekiedy eozynofile. Profil cytokinowy obejmuje m.in. cytokiny IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, a odpowiedź immunologiczna w dużym stopniu ma charakter odpowiedzi typu Th2 (Peeters i in., 2007). Taka kombinacja cytokin sprzyja przewlekłej aktywacji i regeneracji nabłonka, morfologicznie przedstawiającej się jako powiększenie komórek, a tym samym jąder komórkowych. Odmienny profil obserwuje się w przebiegu zapalenia na tle grzybiczym, gdzie dominuje odpowiedź typu Th1 ze zwiększoną ekspresją m.in. IL-6, IL-8, IL-10 czy IFN gamma czy TNF alfa (Peeters i in., 2007). Naciek zapalny tworzą przede wszystkim aktywowane limfocyty, makrofagi, komórki plazmatyczne (Peeters i in., 2005), a dodatkowo obecność komponenty Th17 powoduje zwiększoną rekrutację neutrofili (Vanherberghen i in., 2013). Skład nacieku i profil cytokinowy przekładają się na obraz histologiczny, tłumacząc obecność owrzodzeń, martwicy i włóknienia (Peeters i in., 2005). W zapaleniu nosa o podłożu grzybiczym obserwuje się ponadto zwiększoną w porównaniu z zapaleniem nieswoistym, ekspresję IL-10, której rolą jest ograniczenie oraz kontrola zakażenia i ostatecznie, może przekładać się to na zmniejszoną proliferację nabłonka (Peeters i in., 2007). Zatem opisane w literaturze cechy zapalenia nieswoistego i grzybiczego są zgodne z obserwowanymi w badaniach własnych różnicami w wielkości jąder komórkowych.

Z kolei większe wymiary jąder komórek nabłonka objętych nienowotworowym rozrostem w przebiegu zapalenia nieswoistego nosa w porównaniu do jąder komórek nowotworowych ocenianych w badaniach własnych, znajdują częściowe potwierdzenie w pracy Przeździecki i in. (2015b), gdzie wykazano, że zarówno całe komórki jak i jądra komórek odczynowych międzybłonka miały istotnie wyższe parametry cytomorfometryczne niż całe komórki i jądra komórek międzybłoniaka, czyli procesu o charakterze nowotworowym. Meachem i in. (2012) również odnotowali istotnie większe jądra odczynowych komórek mezenchymalnych (fibroblastów) w porównaniu do jąder komórek mięsaków tkanek miękkich. Należy jednak podkreślić,

że w badaniach tych nie dokonano bezpośrednio porównania z komórkami nabłonka odczynowego z komórkami nowotworowymi i nie można ich jednoznacznie porównać do wyników pracy własnej.

Średnie wartości parametrów jądrowych w gruczolakoraku/raku, lokują się pomiędzy zapaleniem nieswoistym a zapaleniem grzybiczym. Można tłumaczyć to dużą heterogennością oraz atypią komórek nowotworowych, co jest zgodne z ich klasyczną cechą złośliwości cytologicznej – znacznego stopnia anizokariozą, czyli zróżnicowaniem wielkości jąder komórkowych. Obserwacje te mają istotne znacznie diagnostyczne, ponieważ wskazują na konieczność zachowania szczególnej ostrożności przy interpretacji materiału cytologicznego pobranego z jamy nosowej u psów z podejrzeniem nowotworu lub zapalenia nieswoistego. Powszechnie przyjmuje się, że obecność dużych komórek z dużym jądrem komórkowym jest charakterystyczna dla zmian nowotworowych. W badaniach własnych wykazano, że w przebiegu zapalenia nieswoistego komórki nabłonka odczynowego mogą wykazywać cechy atypii cytologicznej bardziej nasilone niż te obserwowane w komórkach nowotworowych.

W dotychczasowym piśmiennictwie brak jest informacji dotyczących analizy cytomorfometrycznej komórek nabłonka jamy nosowej u psów w najczęściej występujących zmianach patologicznych w tej lokalizacji anatomicznej. Dostępne publikacje dotyczące chorób jamy nosowej skupiają się głównie na ogólnej diagnostyce histopatologicznej, cytologicznej lub zastosowaniu innych metod pozwalających na różnicowanie omawianych zmian, bez ilościowej analizy wymiarów komórek. Na tle tej luki założono hipotezę, że analiza cytomorfometryczna komórek nabłonka błony śluzowej może być pomocna w różnicowaniu pomiędzy trzema typami zmian patologicznych jamy nosowej u psów: zapaleniem nieswoistym, zapaleniem grzybiczym i nowotworami złośliwymi. Mimo, iż analiza statystyczna wykazała pewne, istotne statystycznie różnice dotyczące średnich wartości parametrów cytomorfometrycznych jąder komórkowych (MNW, MND, MNA) komórek nabłonka jamy nosowej pomiędzy grupą psów z zapaleniem nieswoistym i grzybiczym, to szczegółowa analiza wyników indywidualnych ukazuje na znaczne zróżnicowanie pomiędzy psami w obrębie tych samych grup ($p < 0,001$ dla wszystkich analizowanych parametrów), co przyczyniło się do nakładania wartości pomiędzy poszczególnymi chorobami. Różnice te mogą wynikać z osobniczej zmienności psów (masy, rasy, wieku), jak również ze stopnia nasilenia procesu, obejmującego mniejszą lub większą regenerację, obecność włóknienia, czy - w przypadku zapalenia grzybiczego - nasilenie

owrzodzeń i martwicy. Dodatkowo, na obserwowane wartości mógł wpływać wcześniej wspomniany skład nacieku zapalnego oraz związana z nim ilość wydzielanych cytokin, a w przypadku nowotworów zapewne znacznego stopnia pleomorfizm komórkowy. Co więcej, u części pacjentów wpływ na morfologię komórek mogło mieć wcześniej zastosowane leczenie, jako że u wszystkich pacjentów objawy kliniczne utrzymywały się od co najmniej miesiąca i zwierzęta poddano różnym schematom terapii zachowawczej. Większość pacjentów zapewne otrzymywała leki przeciwzapalne/immunomodulujące, które przez wpływ na toczący się proces zapalny mogły wpływać na nasilenie zmian rozrostowych/regeneracyjnych komórek nabłonka w obrębie jamy nosowej. Z klinicznego punktu widzenia wydaje się, że zebranie grupy pacjentów z przewlekłymi chorobami jamy nosowej, które nie byłyby poddane leczeniu przez dłuższy czas nie jest łatwe. Dlatego, też uzyskane wyniki częściowo potwierdzają postawioną hipotezę, jednak nakładające się wartości wykluczają praktyczne zastosowanie analizy cytomorfometrycznej jako metody użytecznej w jednoznacznym różnicowaniu zmian w obrębie jamy nosowej u psów, może ona jednak okazać się przydatnym elementem wspierającym diagnostykę.

7.2. Chłoniaki

W związku z potencjalnie praktycznym zastosowaniem wyników prezentowanego badania w codziennej pracy cytologia klinicznego do analizy wybrano dwa najczęściej rozpoznawane typy chłoniaka u psów, czyli chłoniaka centroblastycznego oraz chłoniaka T-komórkowego wielopostaciowego mieszanego z komórek małych i dużych. Ponadto, wybranie tych właśnie typów dawało szansę na zebranie stosunkowo licznej grupy pacjentów, bo tylko takie podejście umożliwia przeprowadzenie analizy statystycznej uzyskanych wyników.

7.2.1. Chłoniak centroblastyczny

7.2.1.1. Charakterystyka demograficzna

W badaniu własnym w analizowanej grupie psów z chłoniakiem centroblastycznym dominowały samice (63%) w stosunku do samców, podczas gdy w literaturze opisywanej dla chłoniaka wieloogniskowego (65 psów), w tym 45 przypadków chłoniaka centroblastycznego przez Davies i in. (2018), przeważały samce (62%). Średni wiek psów w chwili rozpoznania wynosił 7 lat (zakres

1-15), wynik ten jest niższy w stosunku do mediany wieku 8,1 roku podanej przez Davies i in. (2018). Pod względem rasy struktura była zbliżona – odsetek mieszańców w badaniach własnych i cytowanej pracy wynosił około 20%. Rozkład ras w pracy własnej dotyczył głównie psów ras dużych.

7.2.1.2. Pomiary cytomorfometryczne

Badania oceniające parametry cytomorfometryczne komórek chłoniaków u psów są nieliczne i koncentrują się głównie na różnicowaniu pomiędzy limfocytami niepobudzonej tkanki limfatycznej, komórkami tkanki limfatycznej odczynowej i komórkami chłoniaków. W naszej pracy założyliśmy, że ocena parametrów cytomorfometrycznych komórek chłoniaków należących do jednego podtypu cytologicznego/histologicznego poddanemu terapii według takiego samego schematu może dostarczyć pewnych wskazówek rokowniczych.

W badaniach własnych oceniających przypadki chłoniaka centroblastycznego według klasyfikacji kilońskiej, odpowiadającemu w klasyfikacji WHO rozlanemu chłoniakowi z dużych komórek B – DLBCL (Childress i in., 2025; Ponce i in., 2004; Ponce i in., 2010) uzyskano dane morfometryczne dotyczące 36 pacjentów. Średnia średnica komórki (MCD) w badaniach własnych wynosiła 11.2, natomiast średnia średnica jądra (MND) 9.16 μm , przy średnim polu powierzchni jądra (MNA) 66,5 μm^2 . Średnia powierzchnia całej komórki (MCA) wynosiła 99.3 μm^2 , co w połączeniu z wartością stosunku jądrowo-cytoplazmatycznego (N/C) 0.69 wskazuje, że jądro zajmowało około 69% objętości komórki. Morfologicznie odpowiada to komórkom blastycznym o dużych jądrach komórkowych i umiarkowanej ilości cytoplazmy.

W porównaniu do średnich wartości pola powierzchni jądra (MNA) uzyskanych dla prawidłowych, małych limfocytów w węzłach chłonnych opisanych przez Nikousefat i in. (2018) - 82.37 μm^2 , średnia powierzchnia jądra w badaniach własnych była mniejsza, natomiast w odniesieniu do limfocytów prawidłowych w pracy Papakonstantinou i O'Brien (2014) - 33.4 μm^2 - większa. Wyniki naszej analizy wydają się być zgodne z wynikami tej drugiej pracy, jako że komórki i jądra komórek chłoniaków blastycznych, szczególnie centroblastycznych są większe od jąder małych limfocytów. Z kolei, zastanawiające jest porównanie z wynikami pomiarów jąder komórkowych małych limfocytów przeprowadzonych przez Nikousefat i in. (2018), które paradoksalnie charakteryzowały się wielkością przekraczającą wartości uzyskane w badaniach własnych dla nowotworowych blastycznych komórek limfoidalnych.

Podobny układ zależności stwierdzono w przypadku komórek chłoniaka: wartości MNA uzyskane w badaniach własnych były znacząco niższe w porównaniu do danych Nikousefat i in. (2018) - $173.03 \mu\text{m}^2$, ale wyższe niż u Papakonstantinou i O'Brien (2014) - $40.2 \mu\text{m}^2$. Zarówno w badaniach własnych, wartości MNA dla jąder chłoniaka, jak i w pracy Papakonstantinou i O'Brien (2014) - dla jąder prawidłowych limfocytów oraz komórek chłoniaka były znacznie niższe niż te przedstawione przez Nikousefat i in. (2018). Dane Nikousefat i in. (2018) sprawiają wrażenie wewnątrznie niespójnych, ponieważ przedstawione pola powierzchni jąder limfocytów małych i komórek chłoniaków wydają się być znacząco zawyżone w stosunku do wartości średnic podanych przez tych autorów. Po uwzględnieniu wartości promienia komórek i zastosowaniu go we wzorze na pole koła ($P=\pi r^2$) uzyskane wartości pozostają rozbieżne z prezentowanymi przez tych autorów danymi dotyczącymi MNA. Rozbieżności te mogą wynikać z problemów metodologicznych związanych z obliczaniem powierzchni lub z błędów kalibracji w badaniach Nikousefat i in. (2018), jakkolwiek nie mamy dowodów na takowe stwierdzenie.

Uzyskany w badaniach własnych zakres dla pola powierzchni komórki ($67,1 - 118 \mu\text{m}^2$) oraz współczynnik zmienności wynoszący 24%, wskazują, że między poszczególnymi pacjentami występowały istotne różnice w wielkości komórek, przy jednoczesnym zachowaniu jednorodności w obrębie pojedynczego przypadku. Wartości średniego obwodu jądra i średnicy jądra uzyskane w badaniach własnych były niemal identyczne z wynikami Nikousefat i in. (2018), wyniki obu prac potwierdzają dużą zgodność i powtarzalność tych parametrów w analizie cytomorfometrycznej chłoniaków.

W pracy Papakonstantinou i O'Brien (2014) MCA wynosiła $80.3 \mu\text{m}^2$, a MNA - $40.2 \mu\text{m}^2$, dając stosunek jądro-cytoplazmatyczny (N/C) o wartości 0.52. Niższy stosunek N/C w porównaniu z badaniami własnymi (0.69), może świadczyć o uśrednieniu wyników dla mieszanej populacji komórek różnych podtypów chłoniaka (m.in. immunoblastów, komórek z największą zawartością cytoplazmy). W naszych badaniach grupa badawcza obejmowała tylko przypadki chłoniaka centroblastycznego, które wprawdzie zawierają komórki w typie immunoblastów, ale dominują tu komórki w typie centroblastów, czyli komórek z mniejszą ilością cytoplazmy niż immunoblasty. Niestety, nasze rozważania są czysto teoretyczne, bowiem nie wiemy precyzyjnie jakie typy chłoniaków zostały poddane analizie w badaniach Papakonstantinou i O'Brien (2014). Ponadto w badaniach własnych średnia średnica jąderka wynosiła $2.43 \mu\text{m}$

(zakres 1,94–3,13 μm). Wartości górnego zakresu osiągały 1/3 średnicy jądra komórkowego (około 3.1 μm ; MND=9.24 μm), oznacza to, iż w znacznej części jąder komórkowych obecne były jąderka duże lub olbrzymie. Potwierdza to także wysoki współczynnik zmienności sięgający około 52%.

7.2.1.3. Parametry cytomorfometryczne a całkowity czas przeżycia

W dostępnej literaturze brak jest szczegółowych opracowań oceniających znaczenie parametrów cytomorfometrycznych komórek chłoniaka centroblastycznego w kontekście czynników rokowniczych oceniających między innymi całkowity czas przeżycia chorych psów. Na podstawie tego założono hipotezę własną, zakładającą, iż parametry cytomorfometryczne mogą korelować z całkowitym czasem przeżycia u psów z tym nowotworem, co może być pomocne w prognozowaniu przebiegu choroby. W badaniach własnych grupa pacjentów, u których wykonano analizę cytomorfometryczną komórek nowotworowych, była jednolita zarówno pod względem typu cytologicznego chłoniaka, jak i postępowania terapeutycznego, co istotne wszyscy pacjenci byli klasyfikowani w tej samej lecznicy i byli podani leczeniu według tego samego schematu chemioterapeutycznego (CHOP).

Dla parametrów cytomorfometrycznych komórek chłoniaka w kontekście całkowitego czasu przeżycia pacjentów od momentu rozpoznania, nie wykazano jednak istotnych korelacji. W przypadku wszystkich parametrów wartość p była znacznie większa niż 0,05, oznacza to, że żaden z nich nie różnicował pacjentów pod względem szacowania długości przeżycia. Jedynym wyjątkiem była zmienność wypukłości jądra komórkowego, dla której odnotowano słabą ujemną korelację. Może świadczyć to o tym, że w obrębie tego samego guza, występowały zarówno jądra o regularnym, gładkim obrysie, jak i jądra nieregularne. Należy jednak podkreślić, że ten parametr znajdował się na granicy istotności i tracił znaczenie po zastosowaniu poprawki na powtórzenia wielokrotne (której celem jest uniknięcie fałszywie pozytywnych wyników), wskazuje to raczej na obserwację o charakterze przypadkowym. W przypadku parametrów takich jak indeks stosunku jądrowo-cytoplazmatycznego z wypukłościami i współczynnika zmienności kulistości jądra, wyniki sugerują istnienie pewnego trendu, lecz bez istotności statystycznej. Możliwym wyjaśnieniem tego wydaje się być morfologia komórek blastycznych, gdzie przypadki zawierające komórki ze skąpą ilością cytoplazmy, dużymi jądrami, bardziej kulistymi jądrami

(wysoki stopień „blastyczności”) mogły rokować gorzej, ale jak wspomniano, dane nie potwierdziły tego na poziomie istotności statystycznej. Pomimo zaobserwowanych różnic brak korelacji z całkowitym czasem przeżycia, potwierdza, że odmienności te związane są wyłącznie z indywidualnymi cechami morfologicznymi komórek nowotworowych, a nie ich zachowaniem biologicznym.

W analizie porównawczej pomiędzy grupami pacjentów z uwzględnieniem całkowitego czasu przeżycia również zmienność wypukłości jąder komórkowych osiągnęła istotność statystyczną ($p=0,030$), wynik ten jak się wydaje także miał najprawdopodobniej charakter przypadkowy i nie wskazuje na rzeczywistą zależność pomiędzy grupami. Może to odzwierciedlać większą atypię w guzach o gorszym rokowaniu, ale nie znajduje on potwierdzenia na poziomie istotności.

W pracy własnej zastosowany podział psów na grupy całkowitego czasu przeżycia został oparty na danych literaturowych. W dostępnych badaniach wykazano, że całkowity okres przeżycia psów z chłoniakiem centroblastycznym poddanych chemioterapii z zastosowaniem schematu COP lub CHOP wynosi około 11 miesięcy, większość pacjentów przeżywa jedynie kilka miesięcy (do 6 miesięcy - 73% psów), znacznie mniej dożywa roku (12 miesięcy – 38% psów), a przeżycie około dwóch lat należy do rzadkości (9% pacjentów) (Davies i in., 2018).

Podsumowując, wyniki badań własnych można stwierdzić, że analiza cytomorfometryczna komórek chłoniaka centroblastycznego zarówno dla pojedynczych parametrów, jak i w porównaniu pomiędzy grupami nie mają istotnego związku z całkowitym czasem przeżycia, dlatego wykluczają one przyjętą hipotezę. Uzyskane wyniki są spójne z obserwacjami Munasinghe i in. (2015), w których nie stwierdzono zależności pomiędzy parametrami cytomorfometrycznymi komórek nowotworowych a całkowitym czasem przeżycia psów poddanych chemioterapii. Na obecny moment możemy stwierdzić, że analiza cytomorfometryczna komórek chłoniaków centroblastycznych nie ma przydatności rokowniczej u psów.

7.2.2. Chłoniak T - komórkowy wielopostaciowy mieszany

7.2.2.1. Charakterystyka demograficzna

W pracy własnej rozkład płci badanej populacji psów był zbliżony (14 samców i 10 samic), podobnie jak w pracy Rebhun i in. (2011) dotyczącej chłoniaków T-komórkowych, nieznaczna większość przypadków dotyczyła samców. Dane te są zbieżne także pod względem rozkładu wieku pacjentów, w badaniach własnych przedział wiekowy wynosił 1-13 lat, ze średnią 7 lat, natomiast w badaniu Rebhun i in. (2011) - 4-13 lat z medianą 7 lat. Pod względem liczebności ras w obu pracach dominowały psy ras dużych.

7.2.2.2. Pomiary cytomorfometryczne

W badaniach własnych analizowano 24 przypadki chłoniaka T-komórkowego mieszanego z komórek małych i dużych według klasyfikacji kilońskiej, odpowiadającego obwodowemu chłoniakowi z komórek T, bliżej niesprecyzowanemu w klasyfikacji WHO (Childress i in., 2025; Jankowska i in., 2024; Ponce i in., 2004; Ponce i in., 2010). Średnia powierzchnia komórki (MCA) wynosiła $87,6 \mu\text{m}^2$ (zakres $48,4\text{--}142 \mu\text{m}^2$), a średnia średnica komórki (MCD) $10,5 \mu\text{m}$ (zakres $7,77\text{--}13,3 \mu\text{m}$), jak widać wartości te opisują typową budowę morfologiczną komórek chłoniaka składającego się z mieszanej populacji komórek małych i dużych. Średnia pola powierzchni jądra (MNA) wynosiła $64,2 \mu\text{m}^2$, natomiast średnia średnica jądra (MND) $8,95 \mu\text{m}$ (zakres $7,02\text{--}11,2 \mu\text{m}$). Parametry te wskazują na obecność dużego, dominującego w komórce jądra, potwierdza to również stosunek N/C wynoszący 0.77, należy więc przyjąć, że około 77% powierzchni całej komórki nowotworowej zajmuje jądro komórkowe. Jest to z kolei typowa cecha komórek blastycznych, podobnie jak wcześniej opisywanego chłoniaka centroblastycznego i odmienna od limfocytów małych, gdzie jądro zajmuje prawie całą objętość komórki (jądro jest małe, a cytoplazma bardzo skąpa, stąd jądro zajmuje prawie całą powierzchnię komórki).

W porównaniu z wartościami dla prawidłowych małych limfocytów podanymi przez Nikousefat i in. (2018; MNA= $82,37 \mu\text{m}^2$; MND= $4,22 \mu\text{m}$), co zaskakujące w badaniach własnych uzyskano niższe wartości MNA i wyższe MND. Jeszcze niższe wartości MNA dla prawidłowych limfocytów ($33,4 \mu\text{m}^2$) podali Papakonstantinou i O'Brien (2014). W przypadku komórek chłoniaka w badaniu Nikousefat i in. (2018)

MNA wynosiła $173.03 \mu\text{m}^2$, czyli wartość wyższą niż w badaniach własnych ($64,2 \mu\text{m}^2$) oraz pracy Papakonstantinou i O'Brien (2014), gdzie uzyskano jedynie $40.2 \mu\text{m}^2$. Dla powierzchni komórki Papakonstantinou i O'Brien (2014) uzyskali wartość $80.3 \mu\text{m}^2$, zatem komórki nowotworowe w badaniu własnym były nieznacznie większe. Podobnie jak było to omówione w przypadku analizy komórek chłoniaka centroblastycznego w naszym opracowaniu, należy zwrócić uwagę na potencjalny problem metodologiczny w pracy Nikousefat i in. (2018), dotyczący wartości MNA dla prawidłowych limfocytów i komórek chłoniaków (patrz wyżej).

Szerokie zakresy MCA i MNA w badaniu własnym odzwierciedlają różnorodność morfologiczną w obrębie komórek badanego chłoniaka T, co podobnie jak w przypadku jąder komórkowych jest typową cechą morfologiczną komórek tego typu chłoniaka. Średnie wartości średnicy i obwodu uzyskane w badaniach własnych były zbliżone do uzyskanych przez Nikousefat i in. (2018). Stosunek jądrocytoplazmatyczny w badaniu Papakonstantinou i O'Brien (2014) był niższy (0.52) niż w badaniach własnych, i podobnie jak w przypadku opisanego wcześniej chłoniaka centroblastycznego, może wynikać z różnic w składzie populacji komórek (w naszym badaniu populacja pacjentów była homogenna pod względem podtypu cytologicznego chłoniaka, a w cytowanej pracy prawdopodobnie niejednorodna – wprawdzie określono w niej immunofenotyp komórek chłoniaka, jednak nie sprecyzowano podtypu cytologicznego). Współczynnik zmienności (CV) potwierdził zróżnicowanie wielkości komórek i jąder w obrębie populacji w każdym z analizowanych przypadków. Najwyższe wartości uzyskano dla powierzchni komórki (29%) oraz dla powierzchni jądra komórkowego (28%). Takie wartości CV dla obu parametrów wskazują na niejednorodność morfologiczną komórek, szczególnie pod względem ich wielkości i jak podkreślono wcześniej, jest to zgodne z obrazem cytologicznym badanego typu chłoniaka.

7.2.2.3. Parametry cytomorfometryczne a całkowity czas przeżycia psów

W odniesieniu do chłoniaków T-komórkowych wielopostaciowych mieszanych u psów również nie znaleziono w literaturze badań bezpośrednio oceniających znaczenie prognostyczne parametrów cytomorfometrycznych komórek nowotworowych. Przyjęto zatem kolejną hipotezę, zakładającą możliwą korelację pomiędzy parametrami cytomorfometrycznymi a całkowitym czasem przeżycia psów z tym typem cytologicznym chłoniaka. W analizie całkowitego czasu

przeżycia psów z chłoniakiem T-komórkowym zebranych w badaniach własnych wykazano istotne różnice pomiędzy psami poddanymi chemioterapii a psami nie poddanymi terapii lub leczonymi paliatywnie. Psy nie poddane żadnemu leczeniu lub leczone paliatywnie za pomocą glikokortykosteroidów żyły krócej niż psy poddane chemioterapii. Różnica ta wynika z samego faktu wdrożenia agresywnej terapii, była ona potwierdzona w licznych badaniach klinicznych (Jankowska i in., 2024; Rebhun i in., 2011). Z tego też względu w dalszej analizie cytomorfometrycznej uwzględniono wyłącznie grupę psów leczonych cytostatykami, natomiast psy niepoddane terapii lub otrzymujące jedynie glikokortykosteroidy zostały wykluczone ze szczegółowych analiz. Niestety ten zabieg sprawił, że liczebność grupy badanej była niewielka i obejmowała jedynie 15 przypadków.

Podobnie jak w chłoniaku centroblastycznym, jedynie zmienność wypukłości komórki była parametrem, istotnie związanym z całkowitym czasem przeżycia, wynik jednak był graniczny i po uwzględnieniu poprawki na porównania wielokrotne również tracił znaczenie statystyczne. Zauważono również pewny trend dla stosunku jądrowo-cytoplazmatycznego (N/C) - zarówno klasycznego, jak i z wypukłościami, a także kulistości komórek i jąder, oraz średniej wartości wypukłości jądra. Kierunek tych zależności sugeruje, że wyższe wartości wspomnianych parametrów mogą wiązać się z krótszym przeżyciem, ale należy je interpretować ostrożnie z uwagi na słaby efekt statystyczny. Być może sytuacja wyglądała by inaczej gdyby udało się zebrać większą grupę pacjentów z tym typem chłoniaka, zatem jak się wydaje zasadne może być kontynuowanie badań w tym zakresie. Ostatecznie, podobnie jak w obserwacjach innych autorów (Munasinghe i in., 2015), w badaniach własnych nie potwierdzono istnienia wyraźnego związku między parametrami cytomorfometrycznymi a całkowitym czasem przeżycia psów z chłoniakiem wielopostaciowym mieszanym T-komórkowym poddanych chemioterapii. Najważniejszym czynnikiem wpływającym na długość życia pozostawał rodzaj zastosowanego leczenia, a przyjęta hipoteza nie znalazła potwierdzenia.

7.3. Guz z komórek tucznych

7.3.1. Charakterystyka demograficzna

W analizowanej populacji w badaniach własnych, guz z komórek tucznych był rozpoznawany przede wszystkim u psów starszych (6-18 lat, mediana 11 lat), częściej

u samic (67%) niż u samców (33%). Przeważały psy rasowe (85%), w tym najliczniej labradory (około 22%). W badaniach literaturowych opisywano natomiast psy młodsze (4-13 lat, mediana 8 lat), również z przewagą samic, dominacją mieszańców, jednak wśród psów rasowych labradory występowały równie często (Zanardi i in., 2025).

7.3.2. Parametry cytomorfometryczne i porównanie między grupami

W niniejszej pracy postawiono hipotezę, w której parametry cytomorfometryczne mogą być wykorzystywane do oszacowania ryzyka pojawienia się przerzutów w przypadku mastocytozy niskiego stopnia złośliwości histologicznej. Mastocytozy low grade w większości przypadków są guzami niezłośliwymi i wystąpienie przerzutów w ich przypadku zdarza się rzadko. Niemniej jednak, istnieje grupa pacjentów, u których mimo niskiego stopnia złośliwości histologicznej dochodzi do rozsiewu komórek nowotworowych. Celem pracy było sprawdzenie, czy analiza cytomorfometryczna może pozwolić na wcześniejszą identyfikację takich przypadków. W literaturze trudno znaleźć badania, które analizowałyby problem występowania przerzutów w mastocytomach low grade w kontekście mikroskopowych cech morfologicznych komórek i jąder komórkowych. Nieco inaczej wygląda kwestia guzów z komórek tucznych o złośliwości pośredniej i wysokiej lub pośród mastocytom bez uwzględnienia ich stopnia złośliwości histologicznej (Casanova i in., 2021; Catarino i in., 2025; Horta i in., 2018; Marconato i in., 2008; Stefanello i in., 2015).

W badaniach własnych pole powierzchni komórek nowotworowych w mastocytomach przerzutujących było większe niż w przypadkach guzów z komórek tucznych, które nie dały przerzutów ($218 \mu\text{m}^2$ vs. $189 \mu\text{m}^2$), jednak obie wartości były i tak niższe niż te przedstawione przez Neto i in. (2010) dla guzów II i III stopnia złośliwości w preparatach barwionych tą samą metodą. Podobnie obwód komórki w badaniach własnych ($55,4 \mu\text{m}$ i $51,7 \mu\text{m}$, dla odpowiednio MCT z przerzutami i MCT bez przerzutów) był mniejszy w porównaniu z wartościami uzyskanymi przez Neto i in. (2010). Wyniki te wskazują, że mastocytozy oceniane w badaniach własnych rzeczywiście odpowiadają guzom o niższym stopniu złośliwości histologicznej - komórki MCT low grade są zazwyczaj mniejsze niż te widoczne w MCT high grade. Należy również zauważyć, że wartości pól powierzchni i obwodów z wypukłościami były prawie całkowicie skorelowane z ich klasycznym odpowiednikiem, zawsze minimalnie się od nich różniąc, dlatego oba parametry można uznać za wzajemnie potwierdzające się.

Oдноśnie parametrów cytomorfometrycznych analizowanych w przedstawionej pracy, w badaniach własnych jądra komórkowe nowotworowych mastocytów były większe u psów z guzami przerzutującymi niż u psów bez przerzutów. Podobne obserwacje otrzymał Marconato i in. (2008), w których wartości pola powierzchni oraz obwodu były większe w mastocytomach obecnych w węzłach chłonnych niż w mastocytomach nieprzerzutujących (w obu przypadkach niezależnie od stopnia złośliwości histologicznej). Większe wymiary komórek oraz jąder komórkowych w guzach przerzutujących można interpretować jako wyraz zwiększonej aktywności metabolicznej oraz proliferacyjnej, cechującej komórki intensywnie dzielące się, co z kolei obserwuje się zazwyczaj w komórkach nowotworów bardziej agresywnych klinicznie. Świadczy o tym również wyższy stosunek jądrocytoplazmatyczny (N/C) dla komórek guzów przerzutujących (0,42 vs. 0,35 dla nieprzerzutujących), co jest zgodne z obserwacjami Neto i in. (2010), w których wyższy stosunek N/C posiadały komórki guzów z komórek tucznych o wyższym stopniu złośliwości. W badaniach własnych wykazano, że mastocytomy low grade, które dawały przerzuty, charakteryzowały się większymi wymiarami jąder komórkowych. W literaturze zjawisko to opisywano głównie w odniesieniu do mastocytom o wyższym stopniu złośliwości (Marcos i in., 2022, Neto i in., 2010; Strefezzi i in., 2003, 2009), co może wskazywać na tendencję do przerzutowania w przypadku mastocytom o większych wymiarach jąder komórkowych, również tych należących do nowotworów o niskim stopniu złośliwości histologicznej.

Współczynnik zmienności był wyższy w grupie mastocytom przerzutujących (31,8 vs. 30% dla guzów nieprzerzutujących), świadczy on o nieco większej heterogenności populacji komórek (obecność komórek dużych i małych) w MCT przerzutujących i może wskazywać na cechujący nowotwory złośliwe pleomorfizm, podobne różnice odnotowano w badaniu Marconato i in. (2008). Współczynniki kształtu jąder komórkowych w badaniach własnych oraz obserwacjach innych autorów (Marconato i in., 2008; Strefezzi i in., 2003) nie miały wartości diagnostycznej, co może dowodzić, że regularny kształt komórek nie odzwierciedla biologicznej agresywności guza, przynajmniej w przypadku MCT low grade.

Uzyskane wyniki wskazują na przydatność analizy cytomorfometrycznej w odróżnianiu subtelnych różnic w wielkości jąder komórkowych mastocytom niskiego stopnia złośliwości histologicznej. W badaniu wykorzystano klasyfikację według kryteriów cytologicznych według Camus i in. (2016) oraz histologicznych

według Kiupel i in. (2011), które w dużej mierze opierają się na nieco subiektywnej ocenie, zwłaszcza w interpretacji i ocenie stopnia anizokariozy. Cytomorfometria pozwala na zobiektywizowanie tych cech i ich precyzyjne określenie, zatem charakteryzuje się większą trafnością niż ocena wizualna dokonywana przez patologa.

7.3.3. Trafność diagnostyczna cytomorfometrii

Parametry cytomorfometryczne takie jak pole powierzchni jądra komórkowego, średnica jądra komórkowego oraz jego obwód wykazują porównywalną, wysoką trafność diagnostyczną w przewidywaniu obecności przerzutów u psów z mastocytomą o niskim stopniu złośliwości histologicznej (low grade). Potwierdzeniem tego jest zbliżona wartość AUROC dla wszystkich trzech parametrów, sięgająca około 87-88%. Ustalone optymalne punkty odcięcia, pozwoliły zakwalifikować pacjenta do grupy z przerzutami lub bez przerzutów – przekroczenie wartości granicznych pola powierzchni, średnicy i obwodu jądra komórkowego (kolejno: $75 \mu\text{m}^2$; $9,8 \mu\text{m}$; $33 \mu\text{m}$) oznacza wynik dodatni, sugerujący obecność przerzutów, natomiast wartości niższe od punktu odcięcia klasyfikowane są jako wynik ujemny. Choć przedziały ufności były szerokie (sięgały 100%) i należy to wiązać z niewielką liczbą badanych psów, to uzyskana istotność statystyczna potwierdza, że wartości AUROC odzwierciedlają rzeczywistą różnicę pomiędzy grupami. Czułość dla analizowanych parametrów wynosiła około 69-73%, co wskazuje, że u około 30% psów z przerzutami uzyskano wynik fałszywie ujemny, a zatem część pacjentów została nieprawidłowo rozpoznana. Odmienne przedstawia się sytuacja w odniesieniu do swoistości, której wartości były wyższe niż dla czułości i we wszystkich trzech parametrach osiągnęła 100%. W praktyce oznacza to, że żaden z psów wolnych od przerzutów nie został błędnie zaklasyfikowany jako mający przerzuty do węzła chłonnego (nie otrzymał wyniku fałszywie dodatniego). Klinicznie jest to niezwykle ważne, ponieważ wysoka swoistość minimalizuje przypadki błędnego rozpoznania, a tym samym podejmowania intensywniejszych terapii, u psów które tego nie wymagają. Wartość predykcyjna dodatnia (PPV), czyli prawdopodobieństwo rzeczywistej obecności przerzutów przy wyniku dodatnim, wynosiła 100% dla wszystkich trzech parametrów przy założonej prevalencji 50%. Pozwala to na stwierdzenie, że dodatni wynik testu praktycznie potwierdzał obecność przerzutów. Z kolei wartość predykcyjna ujemna (NPV) była niższa (około 76-79%), dlatego wynik ujemny nie wykluczał całkowicie obecności przerzutów i ryzyko wystąpienia przerzutów pomimo ujemnego wyniku sięgało około

21-24% (mimo wartości parametrów poniżej punktu odcięcia). Wynik dodatni znacznie silniej zwiększa prawdopodobieństwo obecności przerzutów, niż wynik ujemny zwiększa pewność ich braku. Wartości predykcyjne zależą od wyjściowego prawdopodobieństwa, a więc będą inne u psów z mastocytoma o niskim stopniu złośliwości niż tych z mastocytomą o wyższym stopniu złośliwości. Choć ogólne wyniki analizy wydają się spójne, to przy dokładniejszym spojrzeniu na wartości uzyskane dla poszczególnych psów widać, że u wielu osobników wyniki znajdowały się blisko wartości granicznej. Wskazuje to, że przyjęte punkty odcięcia w dużej mierze mają charakter umowny, a aby z odpowiednią pewnością ocenić przydatność cytomorfometrii, konieczne byłoby przeanalizowanie znacznie większej ilości przypadków. Niemniej obserwacje własne wskazują na częściowe potwierdzenie postawionej hipotezy, w której parametry cytomorfometryczne komórek mastocytomy niskiego stopnia złośliwości histologicznej mogą stanowić narzędzie pomocnicze w ocenie ryzyka przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, ale wymagają dalszej weryfikacji na większej grupie pacjentów.

7.4. Ograniczenia i wartość badań własnych

Wyniki niniejszej pracy należy interpretować w kontekście kilku istotnych ograniczeń. Pierwszym z nich jest liczba analizowanych prób. W przypadku zmian w obrębie jamy nosowej liczebność analizowanych grup była stosunkowo mała, szczególnie w zapaleniu grzybiczym, gdzie oceniono jedynie 10 przypadków. Brak grupy kontrolnej w badaniach własnych obejmujących zdrowe psy utrudnia odniesienie uzyskanych wartości do stanu prawidłowego. W kolejnych analizach należałoby uwzględnić grupę kontrolną, aby uzyskać wartości referencyjne dla komórek nabłonka jamy nosowej nie objętej procesem patologicznym. Analizie poddano wyłącznie parametry jądra komórkowego, a wynikało to z ograniczonej liczby komórek nadających się do oceny, co wiązało się między innymi z uszkodzeniem błony komórkowej komórek nabłonka oraz jakością preparatów (np. niewielka liczba dobrze zachowanych komórek w rozmazach). Można przypuszczać, że w preparatach odciskowych uzyskanych z wycinków zmienionej śluzówki pobranych w czasie rynoskopii liczba uszkodzonych komórek byłaby mniejsza. W pracy własnej celem było użycie metody wymazowej, czyli metody stosunkowo mało inwazyjnej, umożliwiającej pozyskanie materiału bez konieczności pobierania wycinków w trakcie endoskopii,

ale sposób ten może się wiązać z większym odsetkiem uszkodzonych komórek nabłonkowych błony śluzowej. W przyszłości badania powinny zostać również rozszerzone o dodatkowe parametry morfometryczne obejmujące całe komórki oraz stosunek jądrowo-cytoplazmatyczny.

Dla zmiennej liczby badanych komórek w poszczególnych analizach tj. 50 jąder w przypadku zmian rozrostowych w jamie nosowej, 60 komórek w chłoniaku centroblastycznym oraz po 100 komórek w chłoniaku T-komórkowym wielopostaciowym pleomorficznym i w mastocytomie niskiego stopnia złośliwości histologicznej, różnicę tę należy rozpatrywać w kontekście jakości preparatów cytologicznych, a tym samym dostępności komórek nieuszkodzonych. Jednak większe znaczenie dla badania cytomorfometrycznego ma liczba badanych pacjentów niż liczba analizowanych komórek, co podkreśla publikacja Kidney i Meachem (2014), w której wskazano, że kluczową jednostką statystyczną jest liczba pacjentów, a liczba komórek mierzonych w obrębie jednego przypadku służy jedynie zmniejszeniu błędu pomiarowego i uzyskaniu dokładniejszej wartości średniej dla danego nowotworu. Łącznie, niewielka liczba pacjentów we wszystkich analizowanych grupach w pracy własnej może mieć wpływ na moc statystyczną analizy i uchwycenie pełnej zmienności populacji. Dodatkowo, nakładanie się wartości ocenianych parametrów cytomorfometrycznych między grupami, nie pozwoliło na ustalenie konkretnych punktów odgraniczających (cut-off values) zarówno dla zmian w jamie nosowej, jak i chłoniaków. W przypadku mastocytom wartości dla indywidualnych psów były blisko progów odgraniczających, świadczy to o umownie przyjętych wartościach progów i wymagają one weryfikacji na większej grupie przypadków.

Mimo wykazanych ograniczeń, badania własne wnoszą istotne i nowe informacje do diagnostyki i prognostyki wybranych patologii u psów. Praca uzupełnia lukę istniejącą w literaturze w zakresie badań cytomorfometrycznych nabłonka zmian rozrostowych w jamie nosowej u psów i może stanowić materiał referencyjny dla kolejnych analiz. Uwzględniono w niej również najczęstsze typy zmian diagnozowane w jamie nosowej u psów, z równoległą, aczkolwiek ograniczoną liczebnością przypadków analizą danych demograficznych. Z praktycznego punktu widzenia, należy podkreślić, że cytomorfometria może stanowić cenne wsparcie w procesie diagnostycznym, jednak nie zastąpi pełnej diagnostyki, obejmującej przede wszystkim badanie histopatologiczne.

W przypadku chłoniaków ograniczenia literaturowe (brak badań porównawczych) silnie przekładają się na możliwości interpretacji wyników badań własnych, w szczególności chłoniaka T-komórkowego, które nie są w pełni porównywalne. Niemniej podkreśla to przewagę badań własnych nad cytowanymi pracami, przynajmniej w niektórych aspektach. Przede wszystkim uwzględniono w nich najczęściej występujące u psów typy chłoniaków (B i T) wraz z określeniem podtypów w klasyfikacji Kiel i WHO z wykonaniem immunofenotypowania. Pozwoliło to na analizę wyłącznie wybranego podtypu chłoniaka. W badaniach własnych uwzględniono pomiary oparte na cytowanych publikacjach, rozszerzone o dodatkowe parametry - zarówno całych komórek, jak i jąder komórkowych w chłoniaku B i T, a w części przypadków chłoniaka B komórkowego także dla jąder. Umożliwiło to pełniejszy opis morfologii komórek, obejmujący nieanalizowane rutynowo elementy (m.in. jąderka). W przypadku badania Papakonstantinou uwzględniono pomiary wybranych parametrów całych komórek, ale profil badania był ukierunkowany diagnostycznie a nie prognostycznie. Badania własne dostarczyły unikalnych informacji dotyczących morfologii komórek chłoniaka centroblastycznego i chłoniaka wielopostaciowego mieszanego T-komórkowego. Wyniki te uzupełniają lukę informacyjną i mogą stanowić podstawę do tworzenia charakterystyki poszczególnych typów omawianych nowotworów. Mogą one również przyczynić się do standaryzacji opisów morfologicznych chłoniaków, gdzie konkretne wartości liczbowe mogą zostać wykorzystane w badaniach porównawczych oraz w analizach nad skutecznością leczenia.

Analiza cytomorfometryczna guzów z komórek tucznych o niskim stopniu złośliwości histologicznej wykazała, że największą wartość rokowniczą w kontekście występowania przerzutów mają parametry jądrowe. Ponadto badania własne pozwoliły na rozróżnienie mastocytom w obrębie jednej klasyfikacji histologicznej low grade (w klasyfikacji dwustopniowej), podobnie do badania Strefezzi i in. (2009) w którym obrębie II stopnia złośliwości (w klasyfikacji trójstopniowej) rozróżniono mastocytomy o wyższej i niższej złośliwości. Wyniki przekładają się na potencjalne wykorzystanie kliniczne, zwłaszcza dzięki wysokiej swoistości, która umożliwia wiarygodne potwierdzenie obecności przerzutów, a dzięki temu wcześniejsze zaplanowanie agresywniejszej terapii.

Reasumując, z uwagi na potencjalne zastosowanie praktyczne cytomorfometrii jąder komórkowych komórek MCT low grade u psów i możliwe tego konsekwencje

kluczowe, powyższa obserwacja wymaga zweryfikowania w kolejnych, najlepiej prospektywnych badaniach obejmujących większą grupę psów z guzem z komórek tłuszczowych o niskiej złośliwości uwzględniając zachowanie biologiczne tych powszechnie występujących nowotworów u psów.

8. Podsumowanie

W przypadku zmian w obrębie jamy nosowej podstawą diagnostyki pozostają badania obrazowe oraz badanie histopatologiczne, natomiast badanie cytologiczne pełni rolę uzupełniającą. Chociaż wyniki wskazują, że cytomorfometria jąder komórkowych może być pomocna w różnicowaniu zapalenia nieswoistego i zapalenia grzybiczego, to z klinicznego punktu widzenia, ma to istotne znaczenie, że już na etapie badania cytologicznego można uzyskać cenną informację różnicującą.

W badaniach cytomorfometrycznych komórek chłoniaków należących do dwóch najpowszechniej występujących typów chłoniaków u psów nie uzyskano wyników, które miałyby znaczenie rokownicze. Jakkolwiek, obecność pewnych trendów lub drobnych różnic uzyskanych w badanej pracy, a uznanych za przypadkowe może wskazywać na potrzebę podjęcia dodatkowych badań, które obejmowały by większą grupę pacjentów jednorodną pod względem typu cytologicznego chłoniaka i zastosowanych schematów leczenia. Jest to o tyle istotne, że w warunkach klinicznych podstawą rozpoznania chłoniaków u psów jest badanie cytologiczne bioptatów pobranych z węzłów chłonnych (Childress i in., 2025; Regan i in. 2013; Sapieryński i in., 2010). Badanie to jest w głównym stopniu ukierunkowane na rozpoznanie nowotworu, jednak zasadne jest poszukiwanie nowych metod, które wykorzystując metody komputerowej analizy obrazu posiadanych już rozmazów cytologicznych dały by szanse na zidentyfikowanie potencjalnych parametrów, które były by pomocne w określaniu rokowania dla pacjentów poddanych chemioterapii, a także wytypowania tych przypadków, w których chemioterapia nie przyniesie, a w których przyniesie korzyści terapeutyczne.

Podobnie w przypadku mastocytom u psów, które w dużej mierze są rozpoznawane na podstawie badania cytologicznego, ewentualna możliwość wykorzystania cytomorfometrii jako badania pomocniczego byłaby szczególnie cenna. Uzyskane wyniki sugerują, jej przydatność w identyfikacji psów z przerzutami niskiego stopnia złośliwości histologicznej do regionalnych węzłów chłonnych. Pomimo, że ogólny obraz wydaje się obiecujący, to aby jednoznacznie ocenić wartość kliniczną cytomorfometrii w kontekście wykrywania przerzutów, należałoby przeanalizować znacznie większą grupę pacjentów. Niewątpliwie jednak wykorzystanie cytomorfometrii jako narzędzia wspomagającego w przewidywaniu wystąpienia

przerzutów w mastocytomach low grade, mogłaby mieć znaczący wpływ na cały proces diagnostyczno-terapeutyczny pacjentów z tym typem nowotworu.

9. Wnioski

Szczegółowe wnioski wynikające z badań własnych:

1. Parametry cytomorfometryczne jąder komórkowych komórek nabłonka jamy nosowej objętej procesem nowotworowym nie mają wartości diagnostycznej w odróżnianiu ich od nienowotworowych zmian rozrostowych nabłonka jamy nosowej towarzyszących procesom zapalnym tej struktury u psów.
2. Wymiary jąder komórkowych komórek nabłonka jamy nosowej u psów z zapaleniem nieswoistym nosa są większe niż jądra komórkowe komórek nabłonka jamy nosowej z zapaleniem grzybiczym jamy nosowej, co wskazuje na potencjalne znaczenie diagnostyczne cytomorfometrii jąder komórkowych w różnicowaniu tych dwóch jednostek chorobowych.
3. Analiza cytomorfometryczna komórek nowotworowych nie ma wartości prognostycznej w rokowaniu całkowitego czasu przeżycia psów z chłoniakiem centroblastycznym leczonych za pomocą schematu CHOP.
4. Analiza cytomorfometryczna komórek nowotworowych nie ma wartości prognostycznej w rokowaniu całkowitego czasu przeżycia psów z chłoniakiem T-komórkowym wielopostaciowym z komórek małych i dużych.
5. W guzach komórek tucznych niskiego stopnia złośliwości u psów średnie wymiary pola powierzchni, średnicy i obwodu jądra komórkowego są większe u pacjentów, u których doszło do powstania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, w porównaniu pacjentów bez przerzutów, co wskazuje że ocena cytomorfometryczna tych parametrów może mieć znacznie rokownicze.
6. Ze względu na to, że średnie wymiary pola powierzchni, średnicy i obwodu komórek nowotworowych są większe u psów z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych niż u psów bez przerzutów, analiza cytomorfometryczna może mieć wartość pomocniczą w potwierdzeniu obecności przerzutów mastocytozy o niskim stopniu złośliwości (low grade) do regionalnych węzłów chłonnych, jednocześnie analiza ta nie pozwala na wykluczenie obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.

10. Bibliografia

Altman, D., Machin, D., Bryant, T., & Gardner, M. (2000). *Statistics with confidence: Confidence intervals and statistical guidelines* (2. Wyd), 46–47. BMJ Books.

Anderson, K., Pellin, M., Snyder, E., & Clarke, D. (2024). Tumor Grade and Mitotic Count Are Prognostic for Dogs with Cutaneous Mast Cell Tumors Treated with Surgery and Adjuvant or Neoadjuvant Vinblastine Chemotherapy. *Veterinary Sciences*, 11(8), 363. DOI: 10.3390/vetsci11080363

Araujo, D. C. C., Cunha, S. C. D. S., Silva, F. B. F., Lopes, N. L., Fernandes, J. I.(2024). Radiotherapy in the treatment of sinonasal neoplasms in dogs. *Ciência Rural*, 54. DOI: 10.1590/0103-8478cr20230075

Barbosa, D.de F., Paraventi, M. D., Strefezzi, R.deF. (2014). Reproducibility of nuclear morphometry parameters from cytologic smears of canine cutaneous mast cell tumors--intra- and interobserver variability. *Veterinary Clinical Pathology*, 43(3), 469–472. DOI: 10.1111/vcp.12167

Berlato, D., Bulman-Fleming, J., Clifford, C. A., Garrett, L., Intile, J., Jones, P., Kamstock, D. A., Liptak, J. M., Pavuk, A., Powell, R., & Rasotto, R. (2021). Value, Limitations, and Recommendations for Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Veterinary Pathology*, 58(5), 858–863. DOI: 10.1177/03009858211009785

Biénès, T., Vangrinsven, E., Fastrès, A., Garigliany, M. M., Billen, F., & Clercx, C. (2022). Utility of fungal polymerase chain reaction on nasal swab samples in the diagnosis and monitoring of sinonasal aspergillosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 36(4), 1295–1302. DOI: 10.1111/jvim.16441

Blackwood, L., Murphy, S., Buracco, P., De Vos, J. P., De Fornel-Thibaud, P., Hirschberger, J., Kessler, M., Pastor, J., Ponce, F., Savary-Bataille, K., & Argyle, D. J. (2012). European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10(3), e1–e29. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2012.00341.x

Blaxill, J. E., & Bennett, P. F. (2024). Evaluation of clinical response and prognostic factors in canine multicentric lymphoma treated with first rescue therapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, 22(2), 265–277. DOI: 10.1111/vco.12974

- Buhmeida A. (2006). Quantitative pathology: historical background, clinical research and application of nuclear morphometry and DNA image cytometry. *The Libyan Journal of Medicine*, 1(2), 126–139. DOI: 10.4176/060911
- Cagnasso, F., Roncone, S., Caccamo, R., Peano, A., & Gianella, P. (2021). Severe chronic idiopathic suppurative lymphoplasmacytic rhinitis in a dog. *Veterinary Record Case Reports*, 9:e77. DOI: 10.1002/vrc2.77
- Callan, M. B. (2004). Epistaxis. W: L. G. King (Red.), *Textbook of respiratory disease in dogs and cats*, 29–35. W.B. Saunders
- Camus, M. S., Priest, H. L., Koehler, J. W., Driskell, E. A., Rakich, P. M., Ilha, M. R., & Krimer, P. M. (2016). Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome. *Veterinary pathology*, 53(6), 1117–1123. DOI: 10.1177/0300985816638721
- Caniatti, M., da Cunha, N. P., Avallone, G., Romussi, S., Mortellaro, C. M., Tranquillo, V., & Ghisleni, G. (2012). Diagnostic accuracy of brush cytology in canine chronic intranasal disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(1), 133–140. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00388.x
- Caniatti, M., Roccabianca, P., Scanziani, E., Paltrinieri, S., & Moore, P. F. (1996). Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Veterinary Pathology*, 33(2), 204–212. DOI: 10.1177/030098589603300210
- Carter, J. V., Pan, J., Rai, S. N., & Galandiuk, S. (2016). ROC-ing along: Evaluation and interpretation of receiver operating characteristic curves. *Surgery*, 159(6), 1638–1645. DOI: 10.1016/j.surg.2015.12.029
- Casanova, M., Branco, S., Veiga, I. B., Barros, A., & Faísca, P. (2021). Stereology in Grading and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology*, 58(3), 483–490. DOI: 10.1177/0300985820985138
- Catarino, J., Macara, A., Barros, A., Ramilo, D., Coelho, F., Santos, J., & Faísca, P. (2025). Stereological estimation of mean nuclear volume as a prognostic factor in canine subcutaneous mast cell tumors. *Veterinary pathology*, 62(3), 284–292. DOI: 10.1177/03009858251315094

Childress, M. O., Avery, A., Behling-Kelly, E., Bennett, P., Brockley, L., Dickinson, R., Hughes, K., Kisseberth, W. C., Marconato, L., Martini, V., McCleary-Wheeler, A., Minoli, L., Rowland, P., Sills, S., & Aresu, L. (2025). Diagnosis and Classification of Primary Nodal Lymphomas in Dogs: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Veterinary and Comparative Oncology*, 23(3), 331–345. DOI: 10.1111/vco.13064

Cino, M., Gariboldi, E. M., Stefanello, D., Spindler, K. P., Ferraris, E. I., Morello, E. M., Bertola, L., Maniscalco, L., & Martano, M. (2023). Ki67 Index in Patnaik Grade 2/Kiupel Low-Grade Canine Cutaneous Mast Cell Tumors with Early Lymph Node Metastasis: A Descriptive Study. *Veterinary Sciences*, 10(7), 436. DOI: 10.3390/vetsci10070436

Davies, O., Szladovits, B., Polton, G., Garden, O. A., Leo, C., & Lara-Garcia, A. (2018). Prognostic significance of clinical presentation, induction and rescue treatment in 42 cases of canine centroblastic diffuse large B-cell multicentric lymphoma in the United Kingdom. *Veterinary and Comparative Oncology*, 16(2), 276–287. DOI: 10.1111/vco.12378

De Lorenzi, D., Bonfanti, U., Masserdotti, C., Caldin, M., & Furlanello, T. (2006). Diagnosis of canine nasal aspergillosis by cytological examination: a comparison of four different collection techniques. *The Journal of Small Animal Practice*, 47(6), 316–319. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2006.00153.x

De Vico, G., Sfacteria, A., Maiolino, P., & Mazzullo, G. (2002). Comparison of nuclear morphometric parameters in cytologic smears and histologic sections of spontaneous canine tumors. *Veterinary Clinical Pathology*, 31(1), 16–18. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2002.tb00271.x

Dolka, I., Czopowicz, M., Gruk-Jurka, A., Wojtkowska, A., Sapierzyński, R., & Jurka, P. (2018). Diagnostic efficacy of smear cytology and Robinson's cytological grading of canine mammary tumors with respect to histopathology, cytomorphometry, metastases and overall survival. *PloS one*, 13(1), e0191595. DOI: 10.1371/journal.pone.0191595

Dolka, I., Gruk-Jurka, A., Wojtkowska, A., Miśkiewicz, A., Jurka, P., Sapierzyński, R. (2016). Evaluation of canine mammary tumours using cytological features,

computerized cytomorphometry and immunocytochemistry. *Journal of Comparative Pathology*, 154(1), 110. DOI: 10.1016/j.jcpa.2015.10.132

Doust, R., & Sullivan, M. (2004). Nasal discharge, sneezing, and reverse sneezing. W: L. G. King (Red.), *Textbook of respiratory disease in dogs and cats*, 17–29. W.B. Saunders

Dunn, J. (2014). Cytology of the respiratory tract. W J. Dunn (Red.), *Manual of diagnostic cytology of the dog and cat*, 75–88. John Wiley & Sons, Ltd.

Engdahl, K., Saellström, S., Hedhammar, Å., Dimopoulou, M., & Rönnerberg, H. (2025). The epidemiology of mast cell tumours in insured dogs in Sweden. *Preventive Veterinary Medicine*, 242, 106589. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2025.106589

Fournel-Fleury, C., Magnol, J. P., Bricaire, P., Marchal, T., Chabanne, L., Delverdier, A., Bryon, P. A., & Felman, P. (1997a). Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of Comparative Pathology*, 117(1), 35–59. DOI: 10.1016/s0021-9975(97)80065-5

Fournel-Fleury, C., Magnol, J. P., Chabanne, L., Ghernati, I., Marchal, T., Bonnefond, C., Bryon, P. A., & Felman, P. (1997b). Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. *Journal of Comparative Pathology*, 117(1), 61–72. DOI: 10.1016/s0021-9975(97)80066-7

Fournel-Fleury, C., Ponce, F., Felman, P., Blavier, A., Bonnefont, C., Chabanne, L., Marchal, T., Cadore, J. L., Goy-Thollot, I., Ledieu, D., Ghernati, I., & Magnol, J. P. (2002). Canine T-cell lymphomas: a morphological, immunological, and clinical study of 46 new cases. *Veterinary Pathology*, 39(1), 92–109. DOI: 10.1354/vp.39-1-92

Furtado, A.R.R., & Constantino-Casas, F. (2013), Histopathology inflammation scoring and classification in 34 dogs with inflammatory nasal disease. *Veterinary Record*, 173, 71-71. DOI: 10.1136/vr.101120

Gavazza, A., Cremonini, V., Miglio, A., Starita, C., Rossi, G., & Antognoni, M. T. (2024). Hematological ratios and indices in canine large B-cell lymphoma. *Open Veterinary Journal*, 14(4), 980–989. DOI: 10.5455/OVJ.2024.v14.i4.5

Goddard, A., & Rautenbach, Y. (2025). Respiratory tract cytology. W: A. M. Barger, A. L. MacNeill (Red.), *Small animal cytologic diagnosis: Canine and feline disease* (2. Wyd.), 321-326). CRC Press/Taylor & Francis Group.

Haghofer, A., Parlak, E., Bartel, A., Donovan, T. A., Assenmacher, C. A., Bolfa, P., Dark, M. J., Fuchs-Baumgartinger, A., Klang, A., Jäger, K., Klopffleisch, R., Merz, S., Richter, B., Schulman, F. Y., Janout, H., Ganz, J., Scharinger, J., Aubreville, M., Winkler, S. M., Kiupel, M., ... Bertram, C. A. (2025). Nuclear pleomorphism in canine cutaneous mast cell tumors: Comparison of reproducibility and prognostic relevance between estimates, manual morphometry, and algorithmic morphometry. *Veterinary Pathology*, 62(2), 161–177. DOI: 10.1177/03009858241295399

Harris, B. J., Lourenço, B. N., Dobson, J. M., & Herrtage, M. E. (2014). Diagnostic accuracy of three biopsy techniques in 117 dogs with intra-nasal neoplasia. *The Journal of Small Animal Practice*, 55(4), 219–224. DOI: 10.1111/jsap.12187

Hergt, F., von Bomhard, W., Kent, M. S., & Hirschberger, J. (2016). Use of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors on cytology specimens. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(3), 477–483. DOI: 10.1111/vcp.12387

Horta, R. S., Lavalle, G. E., Monteiro, L. N., Souza, M. C. C., Cassali, G. D., & Araújo, R. B. (2018). Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Veterinary Pathology*, 55(2), 212–223. DOI: 10.1177/0300985817747325

Istrate, A., Constantinescu, R., Anandavel, L., Rajeshkumar Tandel, S., Dye, S., & Dye, C. (2025). A Novel Machine Learning Model for the Automated Diagnosis of Nasal Pathology in Canine Patients. *Animals : an open access journal from MDPI*, 15(12), 1718. DOI: 10.3390/ani15121718

Jankowska, U., Jagielski, D., Czopowicz, M., & Sapierzyński, R. (2024). Prognostic role of the updated Kiel classification in canine high-grade T-cell lymphomas. *Veterinary Medicine and Science*, 10(4), e1398. DOI: 10.1002/vms3.1398

Jeong S. Y. (2023). Evaluation of factors influencing survival time in 77 dogs with lymphoma. *Open Veterinary Journal*, 13(9), 1124–1134. DOI: 10.5455/OVJ.2023.v13.i9.8

- Kidney, B. A., & Meachem, M. D. (2014). Morphometric studies in veterinary cytology. *Veterinary Clinical Pathology*, 43(3), 305–309. DOI: 10.1111/vcp.12191
- Kiupel, M., & Camus, M. (2019). Diagnosis and Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 49(5), 819–836. DOI: 10.1016/j.cvsm.2019.04.002
- Kiupel, M., Webster, J. D., Bailey, K. L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C. J., Fitzgerald, S. D., Gamble, D., Ginn, P. E., Goldschmidt, M. H., Hendrick, M. J., Howerth, E. W., Janovitz, E. B., Langohr, I., Lenz, S. D., Lipscomb, T. P., Miller, M. A., Misdorp, W., Moroff, S., Mullaney, T. P., ... Miller, R. (2011). Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary Pathology*, 48(1), 147–155. DOI: 10.1177/0300985810386469
- Krick, E. L., Billings, A. P., Shofer, F. S., Watanabe, S., & Sorenmo, K. U. (2009). Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(2), 130–138. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2009.00185.x
- Lennert, K., Feller, A.C. (1992). The Kiel Classification. In: *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas*. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-97187-7_2
- Lobetti R. G. (2009). A retrospective study of chronic nasal disease in 75 dogs. *Journal of the South African Veterinary Association*, 80(4), 224–228. DOI: 10.4102/jsava.v80i4.212
- Lobetti, R. (2014). Idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis in 33 dogs. *Journal of the South African Veterinary Association*, 85(1). DOI: 10.4102/jsava.v85i1.1151a
- London, C. A., & Thamm, D. H. (2019). 21 – Mast Cell Tumors. W: D. M. Vail, D. H. Thamm, & J. M. Liptak (Red.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Sixth ed.)*, 382–403. W.B. Saunders.
- Marcos, R., Almeida, J., Marques, J., Moreira, R., Dias-Pereira, P., Correia-Gomes, C., & Santos, M. (2022). Canine mast cell tumors: utility of stereologic tools in cytology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 34(2), 263–267. DOI: 10.1177/10406387211058825

- Marconato, L., Faroni, E., Battisti, E., Zaccone, R., Stefanello, D., & Sabattini, S. (2024). Incorporation of Biologic Variables Into the Staging for Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumours: Proposal of the UBo pTNM System. *Veterinary and Comparative Oncology*, 22(4), 513–522. DOI: 10.1111/vco.13000
- Marconato, L., Marchetti, V., Francione, D., Masserdotti, C., Gregori, M., Leotta, R., & Abramo, F. (2008). Morphometrical approach for predicting regional lymph node micrometastatic load in canine mast cell tumours: preliminary results. *Veterinary and Comparative Oncology*, 6(3), 162–170. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2008.00157.x
- Marcus, V. B., Bertonha, I. B., Eisenhardt, L. M., Kommers, G. D., & Flores, M. M. (2025). Morphological changes in the nasal cavity of dogs and cats submitted to routine post-mortem examination: a systematic investigation. *Journal of Comparative Pathology*, 220, 23–29. DOI: 10.1016/j.jcpa.2025.05.005
- Marouda, C., Anagnostou, T., Brunetti, B., Savvas, I., Papazoglou, L. G., & Psalla, D. (2024). Cutaneous Canine Mast Cell Tumor: The Use of Proliferative Markers (Ki-67 and Ki-67 × AgNOR) in Cytological Samples for Diagnosis and Prognosis. *Veterinary Sciences*, 11(1), 23. DOI: 10.3390/vetsci11010023
- Markström, S. (2024). Prognosis and risk factors in dogs with malignant lymphoma: A retrospective single-center study from 2005–2021 of 356 cases (Praca magisterska, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Clinical Sciences). Promotorzy: H. Rönnberg, S. Saellström.
- Meachem, M. D., Burgess, H. J., Davies, J. L., & Kidney, B. A. (2012). Utility of nuclear morphometry in the cytologic evaluation of canine cutaneous soft tissue sarcomas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(3), 525–530. DOI: 10.1177/1040638712440988
- Meler, E., Dunn, M., & Lecuyer, M. (2008). A retrospective study of canine persistent nasal disease: 80 cases (1998-2003). *The Canadian Veterinary Journal*, 49(1), 71–76.
- Meuten, D. J., Raskin, R. E., & Rebar, A. H. (2005). Cytology of internal organs. W: *The North American Veterinary Conference – 2005 Proceedings*, 193–194. Orlando, FL.

- Mizuno, R., & Mori, T. (2024). Prognostic factors and survival following radiation therapy for canine nasal tumors: A single-institution retrospective study of 166 cases. *Open Veterinary Journal*, 14(7), 1538–1552. DOI: 10.5455/OVJ.2024.v14.i7.3
- Munasinghe, L. I., Kidney, B. A., MacDonald-Dickinson, V., Larson, V. S., Jackson, M. L., & Fernandez, N. J. (2015). Evaluation of lymph node aspirates at diagnosis and relapse in dogs with high-grade multicentric lymphoma and comparison with survival time. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(2), 310–319. DOI: 10.1111/vcp.12243
- Neittaanmäki, H., Javela, H. M., Kuningas, E., Koskinen, K., Tilamaa, A., Rajamäki, M., Viitanen, S., & Airas, N. (2025). Nasal histological findings in asymptomatic control dogs and in dogs with chronic inflammatory rhinitis. *Veterinary Pathology*, 3009858251349138. Advance online publication. DOI:10.1177/03009858251349138
- Neto, R. T., Pinczowski, P., Rahal, S. C., Kitchell, B. E., & Amorim, R. L. (2010). Cytoplasmic and nuclear morphometric parameters in cytologic preparations of canine cutaneous mast cell tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 3(2), 93–99.
- Niedenführ, T. A., Weickelt, A., Wolf, G., Zablotzki, Y., & Schulz, B. S. (2024). Comparison of bacterial culture results obtained from three different sampling locations in dogs and cats with chronic nasal disease. *New Zealand Veterinary Journal*, 72(6), 317–322. DOI: 10.1080/00480169.2024.2378696
- Nikousefat, Z., Hashemnia, M., & Karamyan, A. (2018). Potential of the ImageJ software in the differentiation of various types of canine lymphadenopathies with fine needle aspiration cytology (FNAC). *Comparative Clinical Pathology*, 2(3), 643–648. DOI: 10.1007/s00580-018-2641-5
- Ostrzeszewicz, M., & Sapierzyński, R. (2015). Fungal rhinitis in dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18(4), 683–688. DOI: 10.1515/pjvs-2015-0088
- Paaymans, S. J. (2017). Canine nasal adenocarcinoma. Clinicopathologic (Conference, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University). Opiekun naukowy: S. Muro.
- Pauly, L. A. M., Junginger, J., Oechtering, G. U., Hewicker-Trautwein, M., & Rösch, S. (2024). Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, cyclooxygenase-2, survivin, E-cadherin and Ki-67 in canine nasal

carcinomas and sarcomas - a pilot study. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1388493. DOI: 10.3389/fvets.2024.1388493

Papakonstantinou, S., & O'Brien, P. J. (2014). High content imaging for the morphometric diagnosis and immunophenotypic prognosis of canine lymphomas. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 86(6), 373–382. DOI: 10.1002/cyto.b.21170

Patnaik, A. K., Ehler, W. J., & MacEwen, E. G. (1984). Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology*, 21(5), 469–474. DOI: 10.1177/030098588402100503

Peeters, D., & Clercx, C. (2007). Update on canine sinonasal aspergillosis. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 37(5), 901–vi. DOI: 10.1016/j.cvsm.2007.05.005

Peeters, D., Day, M. J., & Clercx, C. (2005). An immunohistochemical study of canine nasal aspergillosis. *Journal of Comparative Pathology*, 132(4), 283–288. DOI: 10.1016/j.jcpa.2004.11.002

Peeters, D., Peters, I. R., Helps, C. R., Gabriel, A., Day, M. J., & Clercx, C. (2007). Distinct tissue cytokine and chemokine mRNA expression in canine sino-nasal aspergillosis and idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117(1-2), 95–105. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.01.018

Pietra, M., Spinella, G., Pasquali, F., Romagnoli, N., Bettini, G., & Spadari, A. (2010). Clinical findings, rhinoscopy and histological evaluation of 54 dogs with chronic nasal disease. *Journal of Veterinary Science*, 11(3), 249–255. DOI: 10.4142/jvs.2010.11.3.249

Pinello, K., Leite-Martins, L., Gregório, H., Oliveira, F., Kimura, K. C., Dagli, M. L. Z., de Matos, A., & Niza-Ribeiro, J. (2025). Exploring risk factors linked to canine lymphoma: a case-control study. *Topics in Companion Animal Medicine*, 65, 100948. DOI: 10.1016/j.tcam.2025.100948

Pinto de Azevedo, G. (2022). Canine mast cell tumors: Can cytology provide prognostic information? Praca magisterska, Universidade do Porto

- Piotrowska, E. (2012). Analiza parametrów morfometrycznych komórek dla komputerowego wspomaganie diagnostyki medycznej (Praca doktorska, Politechnika Opolska)
- Ponce, F., Magnol, J. P., Ledieu, D., Marchal, T., Turinelli, V., Chalvet-Monfray, K., & Fournel-Fleury, C. (2004). Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 167(2), 158–166. DOI: 10.1016/j.tvjl.2003.10.009
- Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J. P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M., Delignette, M. L., & Fournel-Fleury, C. (2010). A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Veterinary Pathology*, 47(3), 414–433. DOI: 10.1177/0300985810363902
- Przeździecki, R., Czopowicz, M., & Sapieryński, R. (2015a). Accuracy of routine cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of oral amelanotic melanomas in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(4), 597–604. DOI: 10.1111/vcp.12292
- Przeździecki, R., Czopowicz, M., & Sapieryński, R. (2015b). Cytomorphometry of serosal effusion in dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18(3), 481–487. DOI: 10.1515/pjvs-2015-0063
- Rani, R. (2021). Studies on prevalence and diagnosis of epistaxis in dogs (Praca dyplomowa, College of Veterinary Science, Guru Angad Dev Veterinary and Animal Sciences University, Ludhiana). Opiekun naukowy: S. Chhabra.
- Rebhun, R. B., Kent, M. S., Borroffka, S. A., Frazier, S., Skorupski, K., & Rodriguez, C. O. (2011). CHOP chemotherapy for the treatment of canine multicentric T-cell lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9(1), 38–44. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2010.00230.x
- Regan, R. C., Kaplan, M. S., & Bailey, D. B. (2013). Diagnostic evaluation and treatment recommendations for dogs with substage-a high-grade multicentric lymphoma: results of a survey of veterinarians. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(4), 287–295. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2012.00318.x

Roels, S., van Diest, P. J., Beliën, J. A. M., & Ducatelle, R. (1998). Computerized image analysis in diagnostic veterinary pathology: Is the era of descriptive veterinary pathology coming to an end? *European Journal of Veterinary Pathology*, 4(3), 21-27.

Romańska, M., Degórska, B., & Zabielska-Koczywās, K. A. (2024). The Use of Sentinel Lymph Node Mapping for Canine Mast Cell Tumors. *Animals : an open access journal from MDPI*, 14(7), 1089. DOI:10.3390/ani14071089

Rösch, S., Woitas, J., Neumann, S., Alef, M., Kiefer, I., & Oechtering, G. (2024a). Diagnostic benefits of platelet-to-lymphocyte, neutrophil-to-lymphocyte, and albumin-to-globulin ratios in dogs with nasal cavity diseases. *BMC Veterinary Research*, 20(1), 44. DOI: 10.1186/s12917-024-03876-5

Rösch, S., Woitas, J., & Oechtering, G. U. (2024b). Diagnostic Utility of Canine C-Reactive Protein, Haptoglobin, and 25-Hydroxyvitamin-D in Dogs with Nasal Cavity Disease. *Animals : an open access journal from MDPI*, 14(19), 2908. DOI: 10.3390/ani14192908

Rösch, S., Estaller, A., Oechtering, G. U., & Neumann, S. (2025). Diagnostic value of serum survivin, Ki-67 and thymidine kinase in dogs with nasal cavity disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1553551. DOI: 10.3389/fvets.2025.1553551

Sabattini, S., Brocanelli, A., Zacccone, R., Faroni, E., Renzi, A., Ciammaichella, L., Bettini, G., & Marconato, L. (2024). The 2-tier grading system identifies canine cutaneous and/or subcutaneous mast cell tumors with aggressive biological behavior regardless of growth model. *Veterinary Pathology*, 61(6), 874–881. DOI: 10.1177/03009858241240443

Sapierzyński R. (2010). Practical aspects of immunocytochemistry in canine lymphomas. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(4), 661–668. DOI: 10.2478/v10181-010-0016-1

Sapierzyński, R., Dolka, I., & Fabisiak, M. (2012). High agreement of routine cytopathology and immunocytochemistry in canine lymphomas. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15(2), 247–252. DOI; 10.2478/v10181-011-0141-5

Sapierzyński, R., Micuń, J., Jagielski, D., & Jurka, P. (2010). Cytopathology of canine lymphomas (100 cases). *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(4), 653–659. DOI: 10.2478/v10181-010-0015-2

- Sapierzyński, R., & Zmudzka, M. (2009). Endoscopy and histopathology in the examination of the nasal cavity in dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 12(2), 195–201.
- Scarpa, F., Sabattini, S., & Bettini, G. (2016). Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14(3), 245–251. DOI: 10.1111/vco.12090
- Seelig, D. M., Avery, A. C., Ehrhart, E. J., & Linden, M. A. (2016). The Comparative Diagnostic Features of Canine and Human Lymphoma. *Veterinary Sciences*, 3(2), 11. DOI: 10.3390/vetsci3020011
- Setthawongsin, C., Tangkawattana, S., Rungsipipat, A., & Techangamsuwan, S. (2018). Computerized Cytomorphometric and Cytomorphological Analysis of Canine Transmissible Venereal Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 163, 18–22. DOI: 10.1016/j.jcpa.2018.07.003
- Simeonov, R. (2009). Nuclear morphometry in relation to tumor grade in canine spontaneous cutaneous squamous cell carcinomas. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 33(5), 439–442. DOI: 10.3906/vet-0805-18
- Simeonov, R. (2010). Nuclear morphometry in relation to metastases in canine spontaneous cutaneous squamous cell carcinomas. *Trakia Journal of Sciences*, 8(1), 74–78.
- Simeonov R. (2012). Nuclear morphometry in cytological specimens of canine ceruminous adenomas and carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10(4), 246–251. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2011.00289.x
- Simeonov, R. (2014). Subtyping canine anal sac gland adenocarcinomas by means of quantitative morphology. *Acta Veterinaria Eurasia*, 40(3), 243–248.
- Simeonov R. (2019). Nuclear morphometry in 36 canine spontaneous perianal gland tumours. *Veterinaria Italiana*, 55(4), 307–310. DOI 10.12834/VetIt.1031.5489.2
- Simeonov, R., Ananiev, J., & Gulubova, M. (2015). Quantitative morphology in canine cutaneous soft tissue sarcomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(4), 481–484. DOI: 10.1111/vco.12099

Simeonov, R., & Simeonova, G. (2006a). Computerized morphometry of mean nuclear diameter and nuclear roundness in canine mammary gland tumors on cytologic smears. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(1), 88–90. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2006.tb00093.x

Simeonov, R., & Simeonova, G. (2006b). Fractal dimension of canine mammary gland epithelial tumors on cytologic smears. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(4), 446–448. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2006.tb00162.x

Simeonov, R., & Simeonova, G. (2006c). Use of nuclear roundness as a complementary method for differentiation of benign from malignant canine mammary gland epithelial tumour on cytologic smears. *Trakia Journal of Sciences*, 4(2), 47–50.

Simeonov, R., & Simeonova, G. (2007a). Computerized cytomorphometric analysis of nuclear area, nuclear perimeter and mean nuclear diameter in spontaneous canine mammary gland tumours. *Veterinary Research Communications*, 31(5), 553–558. DOI: 10.1007/s11259-007-3562-y

Simeonov, R., & Simeonova, G. (2007b). Use of quantitative analysis as a method for differentiation between canine cutaneous apocrine adenomas and apocrine carcinomas on cytological smears. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 54(9), 542–544. DOI: 10.1111/j.1439-0442.2007.00973.x

Simeonov, R., & Simeonova, G. (2008a). Computer-assisted nuclear morphometry in the cytological evaluation of canine perianal adenocarcinomas. *Journal of Comparative Pathology*, 139(4), 226–230. DOI: 10.1016/j.jcpa.2008.07.004

Simeonov, R., & Simeonova, G. (2008b). Quantitative analysis in spontaneous canine anal sac gland adenomas and carcinomas. *Research in Veterinary Science*, 85(3), 559–562. DOI: 10.1016/j.rvsc.2008.03.009

Simeonov, R., Simeonova, G. (2010a). Comparative morphometric analysis of recurrent and nonrecurrent canine basal cell carcinomas: a preliminary report. *Veterinary Clinical Pathology*, 39(1), 96–98. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2009.00173.x

Simeonov, R., Simeonova, G. (2010b). Prognostic value of nuclear morphometry in spontaneous canine sebaceous carcinomas: A preliminary report. *Comparative Clinical Pathology*, 19(3), 405–408. DOI: 10.1007/s00580-009-0953-z

Spuzak, J., Jankowski, M., Kubiak, K., Glińska-Suchocka, K., Grzegory, M., & Hałoń, A. (2014). Neoplastic lesions in the nasal cavities of dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(2), 375–377. DOI: 10.2478/pjvs-2014-0054

Stefanello, D., Buracco, P., Sabattini, S., Finotello, R., Giudice, C., Grieco, V., Iussich, S., Tursi, M., Scase, T., Di Palma, S., Bettini, G., Ferrari, R., Martano, M., Gattino, F., Marrington, M., Mazzola, M., Elisabetta Vasconi, M., Annoni, M., & Marconato, L. (2015). Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009-2014). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 246(7), 765–769. DOI: 10.2460/javma.246.7.765

Stefanello, D., Gariboldi, E. M., Boracchi, P., Ferrari, R., Ubiali, A., De Zani, D., Zani, D. D., Grieco, V., Giudice, C., Recordati, C., Caniatti, M., Auletta, L., & Chiti, L. E. (2024). Weishaar's classification system for nodal metastasis in sentinel lymph nodes: Clinical outcome in 94 dogs with mast cell tumor. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 38(3), 1675–1685. DOI: 10.1111/jvim.16997

Strefezzi, R.de F., Xavier, J. G., & Catão-Dias, J. L. (2003). Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, 40(3), 268–275. DOI: 10.1354/vp.40-3-268

Strefezzi, R.deF., Xavier, J. G., Kleeb, S. R., & Catão-Dias, J. L. (2009). Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(6), 821–825. DOI: 10.1177/104063870902100608

Sutthigran, S., Saisawart, P., Teewasutrakul, P., Sirivisoot, S., Thanaboonnipat, C., Rungsipipat, A., & Choisunirachon, N. (2024). Hematological and blood biochemistry parameters as prognostic indicators of survival in canine multicentric lymphoma treated with COP and L-COP protocols. *Veterinary World*, 17(2), 344–355. DOI: 10.14202/vetworld.2024.344-355

Thrusfield, M. (2018). *Veterinary epidemiology* (4. wyd.). John Wiley & Sons.

Turkar, S., Preet, G. S., Saini, N., Chhabra, S., & Deshmukh, S. (2021). A case report on clinico-pathological diagnosis, prognosis and treatment of nasal tumours in dogs. *Haryana Veterinarian*, 60(SI), 127–129.

Vail, D. M., Thamm, D. H., & Liptak, J. M. (2019). Hematopoietic Tumors. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 688–772. DOI: 10.1016/B978-0-323-59496-7.00033-5

Valli, V. E., Kass, P. H., San Myint, M., & Scott, F. (2013). Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Veterinary Pathology*, 50(5), 738–748. DOI: 10.1177/0300985813478210

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., ... Vernau, W. (2011). Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Veterinary Pathology*, 48(1), 198–211. DOI: 10.1177/0300985810379428

Vangrinsven, E., Duprez, J. N., Meex, C., Taminiau, B., Daube, G., Billen, F., Mainil, J., & Clercx, C. (2024). Comparison of culture-dependent and -independent bacterial detection results on nasal swabs in dogs with nasal discharge. *Journal of Small Animal Practice*, 65(6), 376–386. DOI: 10.1111/jsap.13734

Vanherberghen, M., Bureau, F., Peters, I. R., Day, M. J., Lynch, A., Fievez, L., Billen, F., Clercx, C., & Peeters, D. (2013). Cytokine and transcription factor expression by *Aspergillus fumigatus*-stimulated peripheral blood mononuclear cells in dogs with sino-nasal aspergillosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 154(3-4), DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.05.009

Windsor, R. C., & Johnson, L. R. (2006). Canine chronic inflammatory rhinitis. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 21(2), 76–81. DOI: 10.1053/j.ctsap.2005.12.014

Windsor, R. C., Johnson, L. R., Sykes, J. E., Drazenovich, T. L., Leutenegger, C. M., & de Cock, H. E. V. (2006). Molecular Detection of Microbes in Nasal Tissue of Dogs with Idiopathic Lymphoplasmacytic Rhinitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(2), 250–256. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2006.tb02854.

Zanardi, S., Guerra, D., Sabattini, S., Foglia, A., Del Magno, S., Cola, V., Pisoni, L., Ciammaichella, L., Faroni, E., Agnoli, C., Renzi, A., & Marconato, L. (2025). Intraoperative methylene blue staining is effective as a single mapping technique in the

identification of sentinel lymph nodes in dogs with low-grade mast cell tumours. *The Journal of Small Animal Practice*, 66(5), 321–327. DOI: 10.1111/jsap.13832

Zandvliet M. (2016). Canine lymphoma: a review. *The Veterinary Quarterly*, 36(2), 76–104. DOI: 10.1080/01652176.2016.1152633

11. Aneks

Aneks 1. Wymiary jąder u poszczególnych psów podane jako średnia arytmetyczna
± odchylenie standardowe i zakres

Pies	Rozpoznanie	Liczba pomiarów	Średnia długość [μm]	Średnia szerokość [μm]	Średnia średnica [μm]	Średni obwód [μm]	Średnie pole powierzchni [μm^2]
1	Guczołakorak/ rak	50	12.41±1.62 (10.00-16.69)	10.06±1.50 (6.61-13.00)	11.24±1.33 (8.52-14.28)	38.31±4.37 (30.27-48.71)	97.26±23.43 (58.78-161.25)
2	Guczołakorak/ rak	50	12.04±1.55 (9.34-17.05)	9.77±1.11 (6.74-12.55)	10.91±1.12 (8.76-14.8)	36.38±3.73 (29.84-47.91)	88.56±18.65 (56.36-155.61)
3	Guczołakorak/ rak	50	12.71±1.46 (10.15-16.77)	10.08±1.33 (7.78-14.1)	11.39±1.21 (9.49-14.91)	38.62±3.51 (31.44-49.74)	98.22±18.65 (64.84-171.68)
4	Guczołakorak/ rak	50	14.13±1.98 (10.29-19.21)	10.42±1.11 (8.52-13.34)	12.27±1.3 (9.95-16.04)	41.70±4.19 (34.27-54.07)	113.67±22.55 (79.87-182.27)
5	Guczołakorak/ rak	50	12.07±1.36 (9.71-16.69)	9.79±1.01 (7.30-12.63)	10.93±0.96 (9.55-13.09)	36.66±3.19 (31.22-44.22)	89.29±15.38 (61.84-121.29)
6	Guczołakorak/ rak	50	10.73±1.06 (9.09-13.07)	9.34±0.96 (7.58-11.48)	10.04±0.91 (8.61-11.82)	34.29±3.25 (28.90-41.24)	79.45±15.23 (54.91-114.91)
7	Guczołakorak/ rak	50	10.34±2.65 (6.34-17.69)	7.75±1.72 (4.90-10.61)	9.05±2.06 (5.73-13.63)	31.50±7.08 (19.42-43.85)	66.85±28.00 (25.47-113.80)
8	Guczołakorak/ rak	50	9.45±1.52 (7.16-12.6)	7.63±1.5 (5.12-10.81)	8.54±1.35 (6.19-11.56)	29.61±4.55 (21.14-39.26)	58.52±18.71 (30.48-102.27)
9	Guczołakorak/ rak	50	10.31±1.85 (7.12-14.98)	7.97±2.06 (3.72-12.2)	9.14±1.76 (6.19-13.59)	31.78±5.95 (22.57-48.63)	67.81±28.34 (28.07-159.18)
10	Guczołakorak/ rak	50	10.92±1.60 (7.72-15.54)	8.20±1.48 (5.84-11.74)	9.56±1.31 (6.89-13.64)	33.36±4.20 (24.86-48)	72.87±19.25 (41.16-143.84)
11	Guczołakorak/ rak	50	12.09±1.75 (9.09-17.44)	9.93±1.74 (6.64-14.68)	11.01±1.60 (8.24-15.94)	37.43±5.49 (30.22-56.16)	95.13±31.52 (61.76-211.98)
12	Zapalenie niespecyficzne	50	11.93±2.00 (8.47-17.86)	9.66±1.53 (6.24-12.72)	10.79±1.60 (8.19-15.29)	37.00±5.39 (27.22-50.54)	92.13±26.01 (48.65-164.82)
13	Zapalenie niespecyficzne	50	10.88±1.55 (7.85-13.73)	8.49±1.38 (6.24-12.32)	9.68±1.28 (7.33-12.71)	33.51±4.43 (25.85-43.97)	74.09±19.82 (45.09-127.34)
14	Zapalenie niespecyficzne	50	11.40±1.66 (8.58-16.27)	9.22±1.91 (6.02-14.77)	10.31±1.67 (7.84-15.35)	36.01±5.03 (26.83-52.78)	85.79±26.6 (48.24-182.69)
15	Zapalenie niespecyficzne	50	11.96±1.74 (8.94-18.42)	9.57±1.65 (5.42-13.47)	10.77±1.42 (7.71-14.71)	36.50±4.75 (28.54-52.37)	87.36±23.3 (50.32-166.49)
16	Zapalenie niespecyficzne	50	11.60±1.40 (8.90-17.52)	9.44±1.10 (6.89-12.55)	10.52±1.12 (8.44-14.52)	35.79±4.13 (27.36-52.52)	85.36±20.78 (49.81-174.77)
17	Zapalenie niespecyficzne	50	11.28±1.74 (7.63-15.80)	8.70±1.29 (6.22-11.68)	9.99±1.28 (7.56-13.39)	33.90±4.15 (27.30-44.98)	74.73±18.96 (48.56-134.29)
18	Zapalenie niespecyficzne	50	12.48±2.06 (7.9-17.83)	10.41±1.85 (6.62-15.01)	11.45±1.81 (7.52-16.42)	38.96±5.64 (28.42-57.25)	103.00±32.22 (51.63-221.49)
19	Zapalenie niespecyficzne	50	12.68±1.75 (8.31-16.47)	9.36±1.14 (6.64-11.64)	11.02±1.26 (7.48-13.45)	37.23±3.86 (27.30-44.60)	91.38±18.13 (50.04-127.69)
20	Zapalenie niespecyficzne	50	12.12±1.22 (9.08-14.69)	9.75±1.11 (7.46-11.75)	10.94±0.96 (8.91-12.97)	37.17±3.17 (30.91-43.76)	92.05±16.33 (64.43-128.44)
22	Zapalenie niespecyficzne	50	12.43±1.18 (10.46-14.9)	10.27±1.19 (7.78-12.68)	11.35±1.04 (9.16-13.31)	38.00±3.43 (31.27-45.01)	97.58±18.38 (62.68-135.11)
23	Zapalenie niespecyficzne	50	11.55±1.35 (9.28-15.56)	9.88±1.06 (7.45-12.06)	10.71±1.02 (8.63-13.04)	36.23±3.72 (30.22-46.9)	87.74±17.52 (60.85-139.6)
24	Zapalenie niespecyficzne	50	11.20±1.29 (9.02-15.03)	9.78±1.01 (7.38-11.86)	10.49±1.05 (8.52-13.04)	35.40±3.65 (29.07-46.10)	85.65±18.48 (54.79-139.75)
25	Zapalenie niespecyficzne	50	10.81±1.09 (8.41-13.65)	9.58±1.07 (7.6-12.49)	10.2±0.99 (8.01-13.07)	34.62±3.44 (29.11-44.22)	81.61±16.67 (57.21-134.07)
26	Zapalenie niespecyficzne	50	12.24±2.26 (9.23-16.34)	9.56±1.30 (6.77-14.11)	10.9±1.55 (8.68-14.63)	37.31±5.65 (28.71-52.12)	93.46±27.72 (54.43-178.6)
27	Zapalenie niespecyficzne	50	12.00±1.48 (10.11-17.87)	9.72±1.41 (7.28-13.91)	10.86±1.21 (9.4-14.68)	36.82±4.50 (31.22-53.16)	90.18±23.60 (59.4-181.22)

28	Zapalenie niespecyficzne	50	13.81±2.16 (10.63-20.42)	10.67±1.8 (7.69-15.37)	12.24±1.79 (9.22-16.92)	41.73±6.38 (31.54-57.53)	115.87±37.00 (61.84-220.15)
29	Zapalenie niespecyficzne	50	11.52±1.12 (9.32-14.37)	9.78±1.23 (6.51-12.33)	10.65±1.00 (8.16-12.8)	35.88±3.10 (28.67-42.05)	86.49±15.57 (53.61-119.19)
30	Zapalenie niespecyficzne	50	11.52±1.55 (8.57-15.36)	9.19±1.3 (7.09-12.84)	10.36±1.19 (8.03-13.24)	35.31±3.82 (27.35-44.69)	81.55±17.43 (49.67-126.44)
31	Zapalenie niespecyficzne	50	12.03±2.20 (7.13-16.71)	8.87±1.35 (5.82-11.63)	10.45±1.55 (6.48-14.17)	36.08±5.63 (21.63-48.95)	83.15±22.18 (32.59-132.16)
32	Zapalenie niespecyficzne	50	12.24±1.24 (9.46-16.14)	11.07±1.37 (7.80-15.14)	11.65±1.22 (8.63-15.64)	39.13±4.00 (30.12-53.10)	104.21±22.13 (60.57-195.11)
33	Zapalenie niespecyficzne	50	13.08±1.61 (9.80-17.21)	8.98±0.99 (6.37-11.21)	11.03±0.89 (8.66-12.4)	37.57±3.04 (30.29-46.28)	89.04±11.72 (57.79-110.23)
34	Zapalenie niespecyficzne	50	11.96±1.28 (9.50-16.13)	9.9±1.26 (7.00-12.78)	10.93±1.08 (9.48-14.46)	36.96±3.89 (32.11-51.3)	92.62±21.21 (66.39-177.87)
35	Zapalenie niespecyficzne	50	11.09±1.55 (9.21-15.18)	8.64±1.34 (5.46-11.03)	9.87±1.19 (7.7-12.64)	34.07±4.53 (25.95-45.14)	77.02±20.14 (44.1-127.21)
36	Zapalenie niespecyficzne	50	12.67±1.78 (9.39-16.43)	8.95±1.21 (6.27-12.10)	10.81±1.04 (8.87-13.14)	36.74±3.44 (29.94-43.79)	86.71±15.32 (60.32-127.22)
37	Zapalenie grzybicze	50	10.29±1.16 (8.26-13.32)	8.48±1.01 (6.13-10.86)	9.38±0.90 (7.56-11.38)	31.86±2.96 (26.11-39.68)	66.86±12.84 (41.28-101.26)
38	Zapalenie grzybicze	50	10.53±2.96 (5.25-19.95)	8.06±2.35 (3.65-14.56)	9.3±2.56 (4.73-16.73)	32.22±8.45 (17.08-58.4)	72.4±39.88 (18.64-220.94)
39	Zapalenie grzybicze	50	10.33±1.81 (6.86-13.96)	7.96±1.18 (5.3-10.9)	9.14±1.30 (6.51-11.68)	32.25±4.55 (22.91-42.32)	64.9±17.74 (31.20-112.25)
40	Zapalenie grzybicze	50	9.84±1.21 (6.79-12.32)	8.23±1.09 (5.62-10.93)	9.03±1.03 (6.46-10.95)	31.51±3.51 (24.26-39.33)	65.26±13.62 (37.35-92.22)
41	Zapalenie grzybicze	50	10.89±1.72 (8.23-15.41)	8.07±1.50 (5.21-12.43)	9.48±1.36 (7.02-13.18)	33.47±4.79 (25.64-44.04)	70.62±20.49 (35.41-117.72)
42	Zapalenie grzybicze	50	12.62±1.62 (9.05-17.29)	9.22±1.43 (5.48-12.17)	10.92±1.28 (8.00-13.23)	38.61±4.49 (27.86-47.33)	91.84±19.24 (49.01-128.74)
43	Zapalenie grzybicze	50	11.3±1.71 (7.59-14.79)	7.91±1.04 (6.11-10.55)	9.61±1.07 (7.42-11.63)	33.93±4.09 (24.46-42.06)	72.61±16.25 (39.38-111.45)
44	Zapalenie grzybicze	50	10.61±1.52 (7.55-14.22)	8.56±1.56 (5.42-12.09)	9.58±1.36 (6.66-13.16)	33.51±5.02 (23.56-48.52)	73.04±21.83 (33.89-138.72)
45	Zapalenie grzybicze	50	11.85±1.92 (7.91-17.55)	9.42±1.88 (6.72-13.15)	10.64±1.59 (7.6-14.91)	37.25±5.47 (26.19-52.28)	90.41±26.95 (46.27-175.96)
46	Zapalenie grzybicze	50	10.99±1.58 (7.36-15.55)	8.95±1.14 (6.53-11.32)	9.97±1.23 (6.95-13.12)	35.05±3.71 (26.56-43.76)	78.66±17.66 (42.69-123.38)