

Chłoniaki u psów – stopień zaawansowania klinicznego

Rafał Sapierzyński

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

Chłoniak nie jest jednym nowotworem, ale dużą i heterogenną grupą rozrostów nowotworowych wywodzących się z limfocytów, które wykazują zróżnicowanie pod względem wielu aspektów, ze znacznymi różnicami odnośnie do rokowania. Rozpoznanie cytologiczne lub histopatologiczne ograniczające się do stwierdzenia „chłoniak” nie może być podstawą do żadnych uzasadnionych medycznie działań. Co więcej, w postępowaniu z psem, u którego rozpoznano chłoniaka, istotne jest nie tylko określenie typu histologicznego/cytologicznego nowotworu, ale także określenie stopnia zaawansowania klinicznego choroby, bo tylko takie szerokie podejście pozwala dobrać optymalny sposób postępowania z pacjentem (1, 2, 3).

Dwa kluczowe aspekty, które muszą być ustalone u psa z chłoniakiem, który ma być poddany leczeniu, to typ histologiczny/cytologiczny (mówi o stopniu

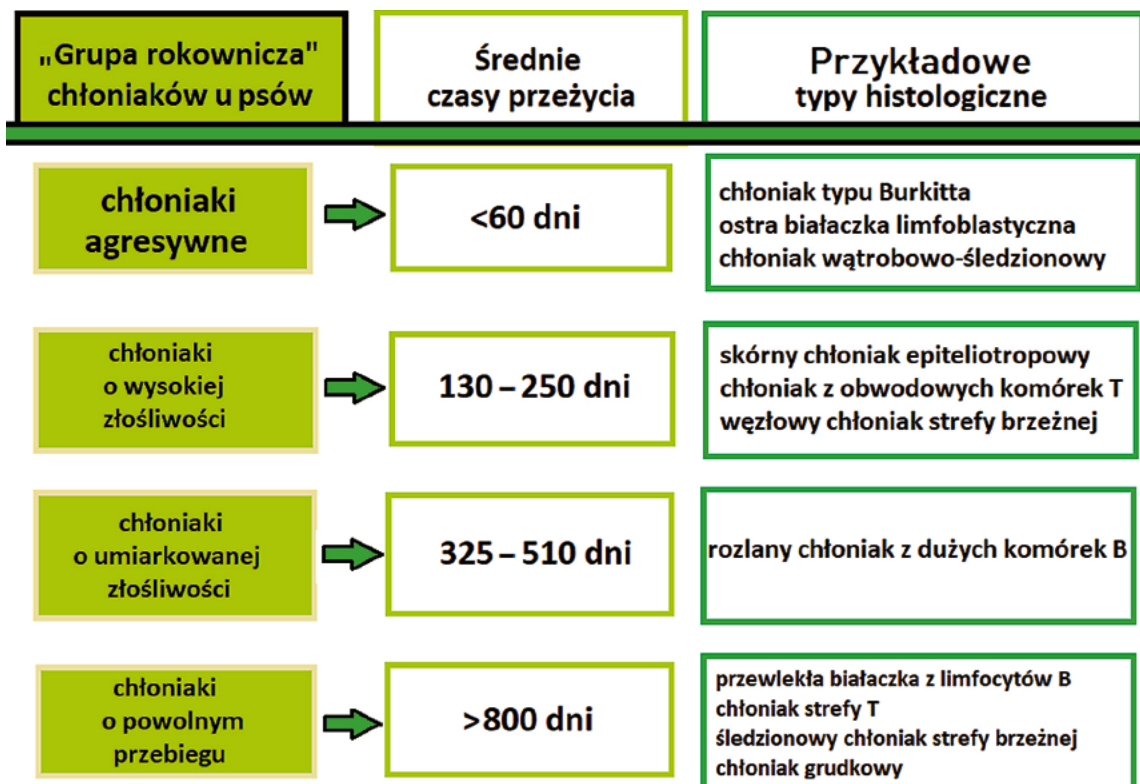
Clinical staging in canine lymphomas

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

Two important treatment steps are crucial in dogs with lymphoma: establishment of cytological/histological tumor subtype and its clinical staging. Cytological examination of samples collected from peripheral lymph nodes is the first step of lymphoma diagnosis, but this method can be also used to establishing clinical staging – fine biopsy of spleen, liver, bone marrow and others, if necessary. Histopathology confirms the diagnosis, according to WHO classification system, however the entire lymph node or large its part has to be sent to laboratory. Regardless of the method of microscopic diagnosis, immunophenotyping by immunohistochemistry or flow cytometry allow to obtain detailed characteristics of lymphoma.

Keywords: dog, lymphoma, tumor staging.

Ryc. 1. Schemat obrazujący podział chłoniaków na jednostki histokliniczne, z uwzględnieniem znaczenia rokowniczego



złośliwości nowotworu) oraz stopień zaawansowania klinicznego (mówi o formie anatomicznej i zasięgu choroby w organizmie pacjenta).

Badanie histopatologiczne pozwala na podział chłoniaków na jednostki chorobowe, które można zgrupować w cztery podstawowe typy histokliniczne (ryc. 1): **grupa o krótkich okresach przeżycia** (poniżej 60 dni, w tym chłoniak Burkitta, ALL, chłoniak wątrobowo-śledzionowy, tzw. białaczka T komórkowa buldogów angielskich), **grupa o umiarkowanie krótkich okresach przeżycia** (średnio 130–250 dni, w tym skórny chłoniak epiteliotropowy, chłoniak z obwodowych komórek T, węzłowy chłoniak strefy brzeżnej i tzw. chłoniak rozlany z małych komórek B), **grupa o umiarkowanie długich okresach przeżycia** (średnio 325–510 dni – chłoniak z dużych rozlanych limfocytów B), **chłoniaki o długich okresach przeżycia** (powyżej 800 dni, w tym chłoniak z dużych ziarnistych limfocytów, przewlekła białaczka B-komórkowa, chłoniak ze strefy płaszczka, chłoniak strefy T, śledzionowy chłoniak strefy brzeżnej oraz chłoniak grudkowy).

O ile istnieje konsensus odnośnie do klasyfikacji cytologicznej/histologicznej chłoniaków u psów (uaktualniona klasyfikacja kilońska zaadaptowana dla psów oraz klasyfikacja WHO zaadaptowana dla psów), to nie ma jednoznaczności odnośnie metod określenia stopnia zaawansowania klinicznego tych nowotworów. Wprawdzie istnieje system określania stopnia zaawansowania klinicznego chłoniaków u psów (tab. 1), brak jest zgodności w jakim stopniu ten system wpływa na rokowanie, wybór metody leczenia oraz, w których przypadkach i jakimi metodami winien być określony. W związku z powyższym z inicjatywy Europejskiej Grupy zajmującej się chłoniakami u psów (The European Canine Lymphoma Network) na konferencji, która odbyła się w Lugano (Szwajcaria) w czerwcu 2019 r., doszło do spotkania, podczas którego skupiono się na zagadnieniach dotyczących oceny zaawansowania klinicznego i rozpoznawania chłoniaków u psów (3). Wprawdzie nie doszło do konsensusu odnośnie do postępowania, ale poruszono i zaprezentowano wiele opinii na temat diskutowanego zagadnienia. Niniejszy artykuł prezentuje najbardziej aktualne informacje (w dużej mierze bazujące

Tabela 1. System stopniowania zaawansowania klinicznego psów z chłoniakiem wg WHO (2 za Owen 1980)

Stopień	
I	Zajęcie jednego węzła lub tkanki limfatycznej w jednym narządzie (z wyłączeniem zajęcia szpiku kostnego)
II	Regionalne zajęcie kilku węzłów chłonnych (± zajęcie migdałków)
III	Uogólnione zajęcie węzłów chłonnych
IV	Stopień I–III z zajęciem wątroby lub/i śledziony
V	Stopień I–III z zajęciem krwi lub szpiku kostnego
Podstopień	
a	Brak objawów ogólnych
b	Obecność objawów ogólnych (gorączka, utrata masy ciała powyżej 10%, hiperkalcemia, duszność spoczynkowa)

na komunikatach i wykładach zaprezentowanych na konferencji w Lugano) dotyczące sposobów postępowania z psem, u którego rozpoznano chłoniaka i planowane jest postępowanie terapeutyczne.

Ocena zaawansowania klinicznego chłoniaka u psów powinna być przeprowadzona w każdym przypadku, zanim podejmie się decyzje odnośnie do wyboru sposobu postępowania z pacjentem i opierać się powinna na wytycznych WHO, które opracowano dla tego typu nowotworów u ludzi. Określenie stopnia zaawansowania klinicznego jest dopełnieniem rozpoznania typu histologicznego/cytologicznego chłoniaka i obejmuje ocenę lokalizacji i zasięgu choroby, co umożliwia przedstawienie właścicielowi psa perspektyw odnośnie rekomendowanej terapii oraz wynikającego z tego rokowania (3, 4). Nie wiadomo jednak, czy taka bardzo precyzyjna ocena stopnia zaawansowania klinicznego chłoniaków u psów jest konieczna w każdym przypadku. Wobec faktu, że poszerzenie diagnostyki niesie ze sobą zwiększenie kosztów oraz potrzebę wykonania mniej lub bardziej inwazyjnych testów, należy zastanowić się, czy pełne postępowanie jest nieodzowne w każdym przypadku. Przykładowo, dla niektórych chłoniaków o wysokiej złośliwości ocena zajęcia płuc czy szpiku kostnego będzie istotna dla rokowania (różnicowanie między chłoniakiem limfoblastycznych i ostrą białaczką limfoblastyczną), a dla innych nie (nie wiadomo, czy zajęcie szpiku kostnego w niektórych chłoniakach o powolnym przebiegu ma znaczenie rokownicze; 4). Badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej poparte badaniem cytologicznym zmienionych narządów będzie służyło do oceny zasięgu choroby w przebiegu chłoniaka centroblastycznego – może to wpływać na rokowanie, z kolei w chłoniaku śledzionowym ze strefy brzeżnej wykluczenie pozaśledzionowej lokalizacji guza pozwoli ograniczyć postępowanie terapeutyczne jedynie do splenektomii.

W opinii autora wydaje się prawdopodobne, że sposób podejścia do oceny stopnia zaawansowania klinicznego chłoniaka u psów może zależeć od podtypu histologicznego/cytologicznego rozpoznanego w danym przypadku i nie jest jednolity dla wszystkich przypadków – decyzję podejmuje się indywidualnie dla każdego podtypu chłoniaka.

W tym miejscu należy podkreślić, że określenie rzeczywistego stopnia zaawansowania klinicznego chłoniaka u psa może wymagać wykonania wielu badań i testów, bo tylko takie podejście umożliwi wykrycie wszystkich ognisk choroby, z kolei ograniczenie się jedynie do podstawowych procedur diagnostycznych zapewne będzie skutkowało jego niedoszacowaniem. W badaniach Flory i wsp. (5) wykazano, że zastosowanie większej liczby testów diagnostycznych zwiększa precyzję określenia stopnia zaawansowania klinicznego.

Powszechnie znanym zjawiskiem przy określeniu stopnia zaawansowania klinicznego chłoniaka u psów jest tzw. stage migration, czyli pojawiające się różnice

w ustalonym stopniu zaawansowania klinicznego w zależności od ilości użytych testów diagnostycznych (5). Im więcej testów zostanie użytych do zbadania pacjenta, tym wyższy stopień zaawansowania klinicznego zostanie rozpoznany – tym bardziej będzie bliski prawdy.

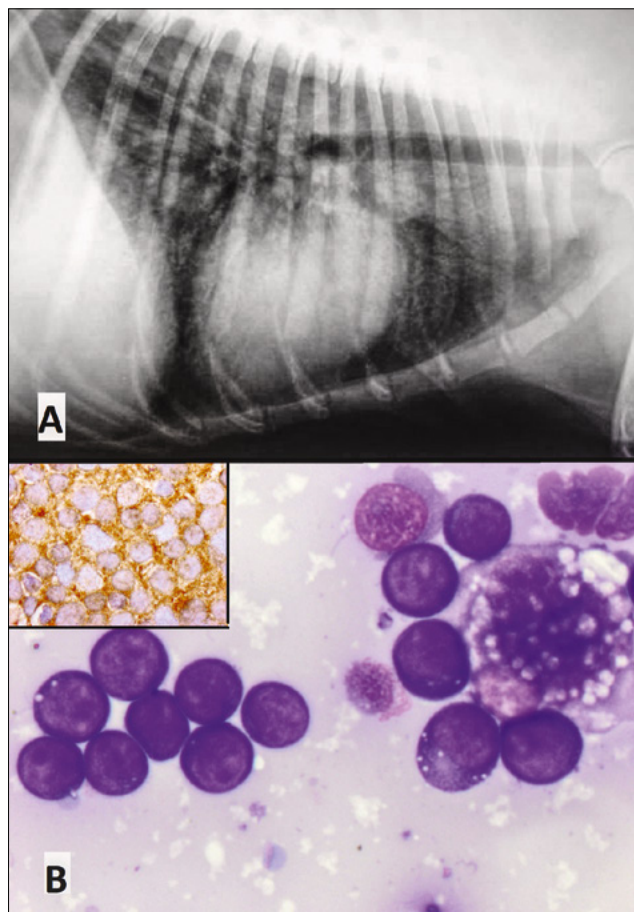
Dokładne określenie stopnia zaawansowania klinicznego (clinical staging) chłoniaków obejmuje cechy anatomiczne rozrostu, takie jak zasięg choroby oraz występowanie i charakter objawów klinicznych (podstopeń A i B), musi być uzupełnione o takie cechy nowotworu, jak: stopień zróżnicowania (stopień złośliwości histologicznej), immunofenotyp oraz cechy histopatologiczne komórek chłoniaka (3). Jedynie dzięki takiemu podejściu możliwe jest określenie tzw. jednostek histoklinicznych, co z kolei pozwala na zaplanowanie najbardziej właściwej terapii oraz precyzyjne określenie rokowania. Oceny stopnia zaawansowania klinicznego chłoniaka przeprowadza się w oparciu o schemat WHO, który zaprezentowano w tabeli 1.

Precyzyjne określenie stopnia zaawansowania klinicznego chłoniaków u psów wymaga podejścia wielodyscyplinarnego, z zastosowaniem wielu testów diagnostycznych (1, 2, 3), w tym:

- precyzyjnego zebrania wywiadu i wykonania gruntownego badania klinicznego,
- obrazowania (USG i RTG) jamy brzusznej i klatki piersiowej,
- badania biochemicznego i morfologicznego krwi, z oceną rozmazu,
- badania cytologicznego (czasami histopatologicznego) węzłów chłonnych, śledziony, wątroby, szpiku kostnego i popłuczyn z drzewa oskrzelowego (ryc. 2),
- badanie metodą rezonansu magnetycznego (MRI) ośrodkowego układu nerwowego i badanie płynu mózgowo-rdzeniowego w przypadku podejrzenia zajęcia ośrodkowego układu nerwowego.

Badanie kliniczne

Badanie kliniczne musi być szczegółowe i obejmować zarówno węzły chłonne, jak i całego pacjenta (ryc. 3). Niestety brak jest jednoznacznych kryteriów wskazujących na to, czy węzeł chłonny jest powiększony – według niektórych autorów na powiększenie węzła wskazuje fakt, gdy jego średnica najdłuższa wynosi powyżej 1,5 cm, chociaż zapewne zależne jest to od wielkości psa. Objawy kliniczne inne niż powiększenie węzłów chłonnych (podstopeń b) obserwuje się u wielu psów z chłoniakiem, w tym u około 70% psów z chłoniakiem rozlanym z dużych komórek B (DLBCL; najpowszechniejszy typ chłoniaka u psów; 3) oraz 86% psów z chłoniakiem T-komórkowym nieindolentnym (chłoniaki T-komórkowe z wyłączeniem chłoniaka o powolnym przebiegu; 3). Marconato (4) podkreśla też potrzebę przeprowadzenia gruntownego badania klinicznego po zakończonej chemioterapii, w tym precyzyjnej oceny wielkości węzłów chłonnych, co ma celu udokumentowanie odpowiedzi na leczenie (end-staging).



Ryc. 2. Przypadek wskazujący na możliwość rozpoznania zajęcia płuc przez chłoniaka badaniem cytologicznym popłuczyn z drzewa oskrzelowego. Na ryc. A obraz RTG klatki piersiowej opisany przez radiologa jako zmiany naciekowe tkanki płucnej. U pacjenta pobrano popłuczyny z drzewa oskrzelowego, a w badaniu cytologicznym rozpoznano chłoniaka z dużych komórek blastycznych, prawdopodobnie centroblastycznego (ryc. B; barwienie odczynnikiem Giemsy, powiększenie 400×). Z kolei barwienie immunocytochemiczne z zastosowaniem przeciwciał anti-CD79a potwierdziło immunofenotyp B (brązowa barwa cytoplazmy komórek we wstawce)

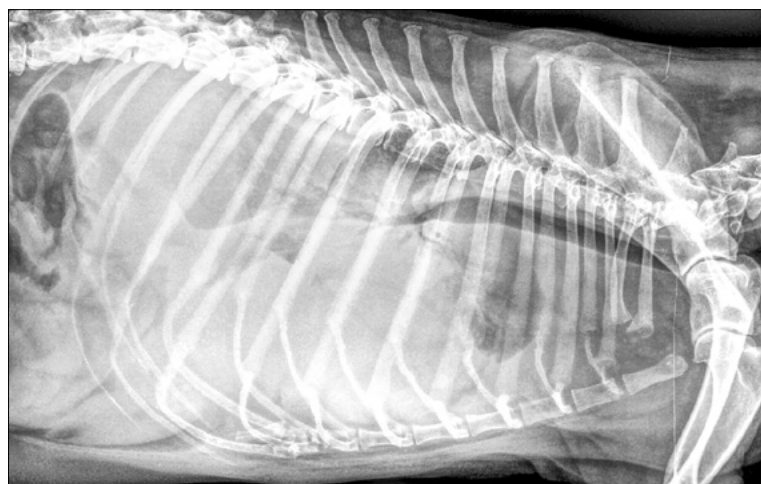
Ryc. 3. Najpowszechniejszą nieprawidłowością w badaniu klinicznym u psów z chłoniakiem jest obwodowa limfadenomegalia – u pacjenta na rycinie powiększone węzły chłonne żuchwowe są widoczne nawet z dystansu



U ludzi z chłoniakiem DLBCL do klasyfikacji stopnia zaawansowania klinicznego wprowadzono określenie „objawów-B” (B-symptoms; BS), który to zespół objawów lepiej koreluje z rokowaniem niż parametr określony jako „podstapię B” (substage B; SSB). Do „objawów B” u ludzi z chłoniakiem należą: niewyjaśnionego pochodzenia gorączka przekraczająca 38°C, utrata masy ciała o co najmniej 10% w ciągu ostatnich 6 miesięcy oraz nocne poty (1). W badaniach Skor i wsp. (1) badacze podjęli próbę porównania przydatności rokowniczej SB i SSB u 55 psów z węzłowym chłoniakiem DLBCL. Do „objawów B” zaliczono: utratę masy ciała o wartości co najmniej 10%, gorączkę o niewyjaśnionej etiologii oraz występowanie duszności spoczynkowej, zaś jako „podstadium B” uwzględniono

jakiegokolwiek objawy kliniczne, z wyłączeniem limfadenomegalii. Chociaż analiza uzyskanych wyników wskazała, że obydwa sposoby klasyfikacji były negatywnie skorelowane z wynikami leczenia (stosowano standaryzowany schemat CHOP), to stwierdzono, że SB lepiej koreluje z parametrami rokowniczymi oceniającymi wyniki leczenia, niż SSB. Przykładowo, okres wolny od postępu choroby (PFS) wynosił dla psów z BS- i BS+, odpowiednio 330 i 95 dni, a dla psów SSB- i SSB+, odpowiednio 240 i 160 dni (1). Autorzy badania rekomendują wykorzystanie „objawów B” u psów z DLBCL, jednak sugerują przeprowadzenie badań na większej populacji psów, która obejmowałaby pacjentów z różnymi typami chłoniaka.

Ryc. 4. Obraz RTG klatki piersiowej psa z chłoniakiem ukazuje masywne powiększenie śródpiersia – zapewne zajęcie węzłów chłonnych śródpiersiowych



Badania obrazowe

Badania obrazowe klatki piersiowej mogą wykazać obecność limfadenopatii w obrębie klatki piersiowej, masy w śródpiersiu lub zmian naciekowych płuc (ryc. 2a, ryc. 4; 2). Zmiany w obrębie śródpiersia najczęściej obserwuje się u 77% psów z chłoniakiem T-komórkowym o umiarkowanej lub wysokiej złośliwości (1). Nie wiadomo jednak, czy badanie obrazowe klatki piersiowej powinno być wykonane u każdego pacjenta z rozpoznanym chłoniakiem, czy jedynie w przypadku tych psów, u których takie badanie może mieć znaczenie prognostyczne (2). Badanie USG jamy brzusznej może ujawnić limfadenomegalię trzewną, zmiany w obrębie śledziony (ryc. 5) i wątroby (zarówno zmiany kształtu, wielkości, jak i struktury), a także umożliwia ocenę zmian w obrębie ściany przewodu

pokarmowego (nie zawsze jednak naciek ściany jelita przejawia się zmianami echostruktury tej ściany). Inne metody obrazowania, takie jak tomografia komputerowa czy rezonans magnetyczny, wykonuje się w oparciu o ocenę kliniczną pacjenta (2).

Badanie biochemiczne i morfologiczne krwi

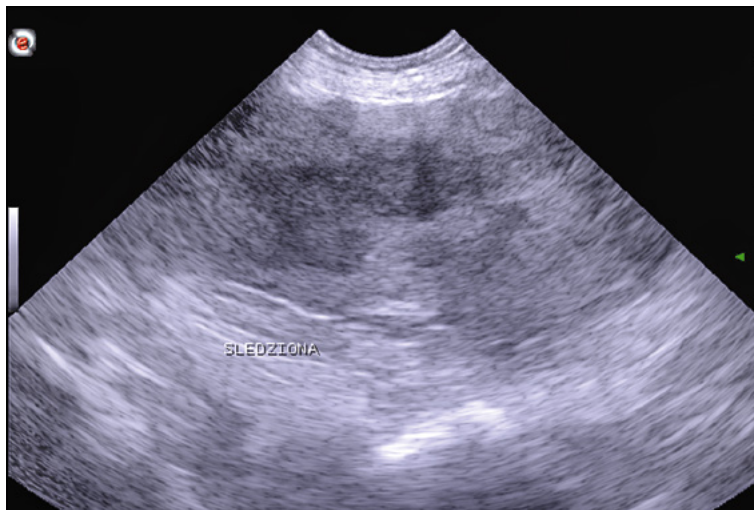
Oprócz stwierdzenia obecności komórek nowotworowych w badaniu cytologicznym rozmazów krwi obwodowej, rutynowe badanie krwi nie pozwala na rozpoznanie tego typu nowotworu, bowiem spektrum możliwych nieprawidłowości badania morfologicznego i biochemicznego krwi jest duże (2). U psów z chłoniakiem obserwuje się zarówno leukocytozę/leukopenię, niedokrwistość/nadkrwistość (niekiedy ze zmienioną morfologią erytrocytów), nadpłytkowość/małopłytkowość. Wyniki badania morfologicznego krwi rzadko korespondują z zajęciem szpiku kostnego, chociaż wysoka reakcja białaczkowata wskazuje na zajęcie szpiku kostnego (2). Co ważne, oprócz samej wartości leukocytozy istotne w ocenie zajęcia krwi jest badanie mikroskopowe rozmazu z oceną morfologii komórek limfoidalnych przez doświadczonego cytologa klinicznego. Limfocytoza, nawet o dużym nasileniu, może wynikać z odczynowego rozrostu tej linii komórkowej, w przebiegu różnych procesów patologicznych – reakcja białaczkowata. W badaniu biochemicznym notuje się zmiany wskazujące na zajęcie, uszkodzenie wątroby i/lub nerek, niekiedy zmiany poziomu białka, z możliwą gammopatią monoklonalną. U części pacjentów, z reguły z chłoniakiem T-komórkowym, rozpoznaje się hiperkalcemię, dlatego też określenie kalcemii powinno być wykonane u każdego psa z rozpoznaniem/podejrzewaniem chłoniakiem – hiperkalcemia jest czynnikiem o niekorzystnym znaczeniu rokowniczym. Oprócz przesłanek, które sugerują, które narządy mogą być objęte zmianami naciekowymi w przebiegu chłoniaka, to badanie krwi jest nieodzowne przy planowaniu leczenia, ale także może pomóc w wyborze kolejnych testów, które należy przeprowadzić (np. biopsja szpiku kostnego, czy biopsja wątroby).

Badanie histopatologiczne

Badanie histopatologiczne jest podstawą rozpoznania chłoniaka oraz określenia jego podtypu histologicznego w klasyfikacji WHO. Badanie to umożliwia ocenę

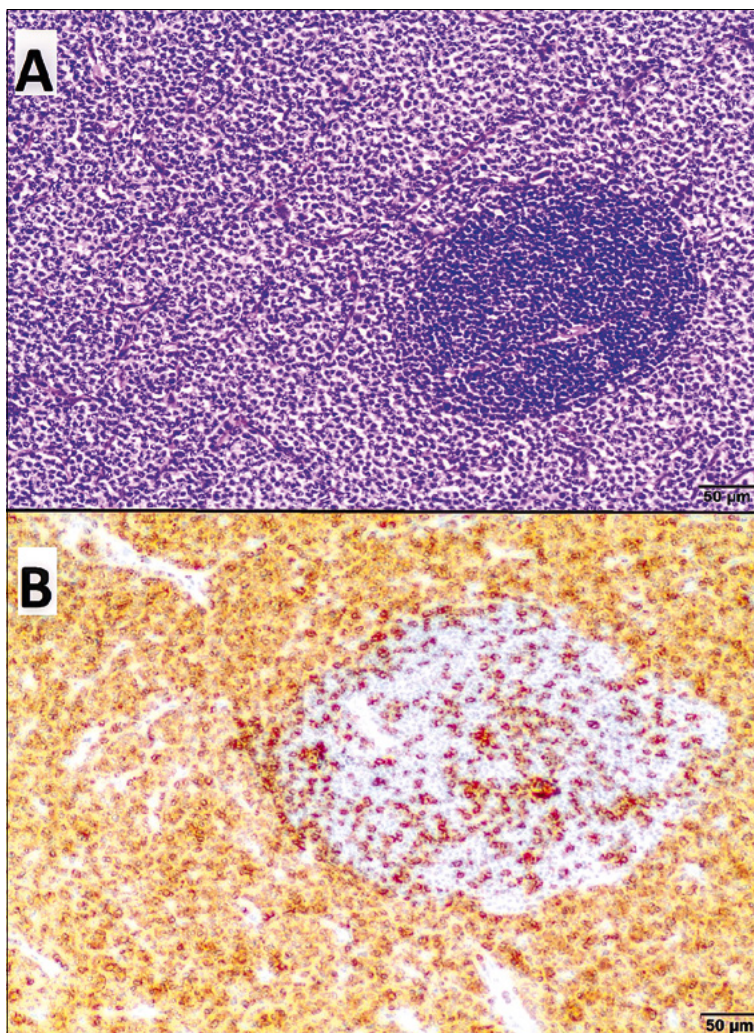
Ryc. 6. Barwienie immunohistochemiczne jest nieodzowne do określenia immunofenotypu komórek chłoniaka.

Na ryc. A widoczny węzeł chłonny zajęty przez chłoniaka z dużych blastycznych limfocytów (zwraca tu uwagę grudka chłonna utworzona z małych dojrzałych limfocytów – pozostałość prawidłowej grudki chłonnej); barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 100x. Na ryc. B ten sam węzeł zabarwiony immunohistochemicznie przeciwciałem anti-CD3 – widoczna dodatnia reakcja cytoplazmatyczna w komórkach nowotworowych (brązowa barwa cytoplazmy – chłoniak T-komórkowy) oraz prawidłowych limfocytach T grudki chłonnej, z kolei większość komórek grudki chłonnej nie wykazuje reakcji barwnej (sinoniebieskie jądra komórkowe), co wskazuje, że są to dojrzałe prawidłowe limfocyty B



morfologii komórek, określenie architektoniki pobranej tkanki, określenie relacji liczbowych poszczególnych komórek widocznych w obrębie pobranego materiału, ocenę aktywności proliferacyjnej, a także wykonanie barwienia immunohistochemicznego z określeniem immunofenotypu komórek nowotworowych (antygeny różnicowania – CD; ryc. 6) oraz innych cech komórek nowotworowych (nasilenie proliferacji – ocena Ki67, ekspresja białek zaangażowanych w apoptozę – białko Bcl-2, surwiwina). Niestety, nie

Ryc. 5. Obraz USG śledziony psa z chłoniakiem T-komórkowym o wysokiej złośliwości

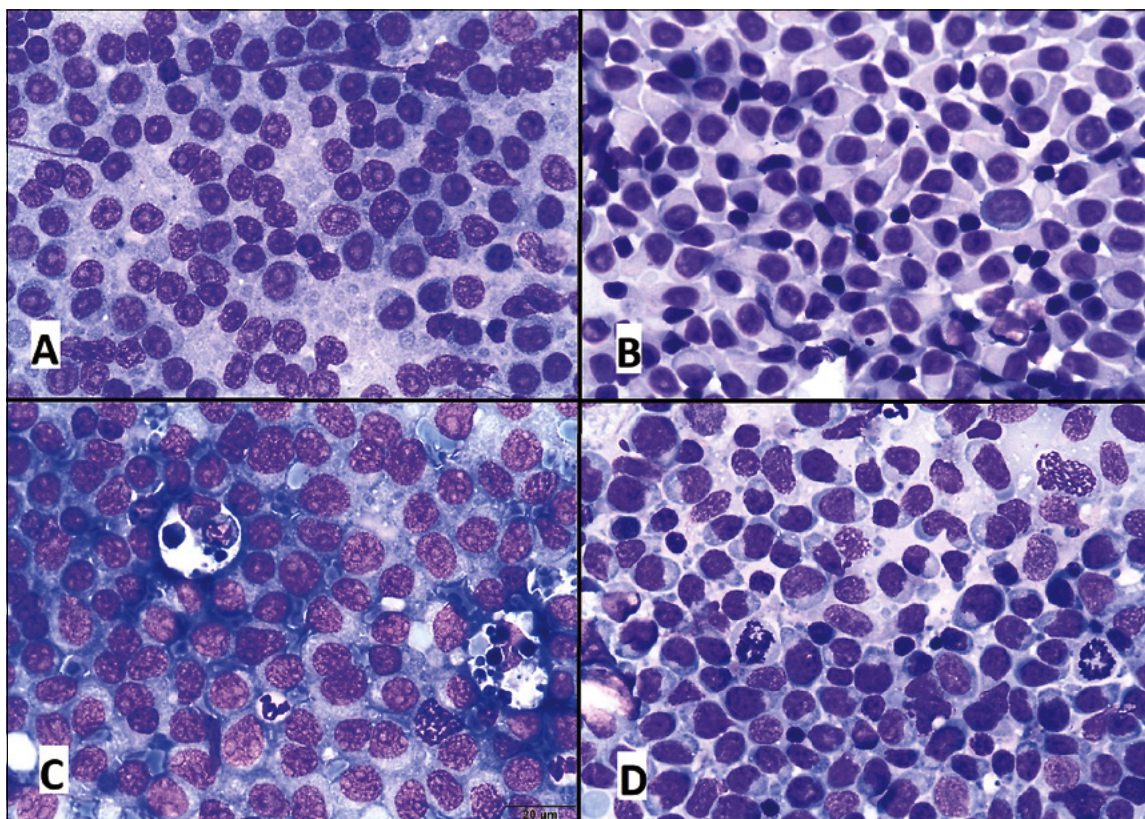


w każdym przypadku, w którym wykonano barwienie immunohistochemiczne z zastosowaniem dwóch przeciwciał (CD3, CD 79alfa lub CD20), możliwe jest określenie jednoznacznego rozpoznania – w około 20% przypadków nie da się jednoznacznie określić rozpoznania podtypu histologicznego (2). Wobec powyższego poleca się stosowanie bardziej rozbudowanego panelu przeciwciał (CD20, CD21, CD79alfa, PAX-5 – dla chłoniaków B – komórkowych; CD3, CD4 i CD8 – dla chłoniaków T-komórkowych; dodatkowo Bcl-2, Bcl-6, MUM-1 dla śledzionowych chłoniaków o niskiej złośliwości), jednak taka procedura zwiększa koszty badania. Badanie histopatologiczne może obejmować badanie wyciętego węzła chłonnego (biopsja wycięciowa) lub jego fragmentu (biopsja wycinkowa), guza pozawęzłowego, a w niektórych przypadkach dużych biopłatów pobranych za pomocą biopsji rdzeniowej. Preferowaną metodą jest badanie całego węzła chłonnego (1, 2, 3, 4), gdyż zarówno badanie biopłatów tru-cut, jak i wycinków węzła może być niewystarczające, nie tylko do rozpoznania typu histologicznego, ale nawet rozpoznania chłoniaka w ogóle (z własnych doświadczeń wynika, że badanie biopłatów tru-cut pobranych z węzłów chłonnych umożliwia rozpoznanie chłoniaka jedynie w części przypadków, a określenie podtypu histologicznego u nielicznych pacjentów). Trzeba wyraźnie podkreślić, że jedynie badanie stosunkowo

dużych biopłatów o wysokiej jakości pozwala na trafne rozpoznanie – jedynie wycinki, które ukazują architekturę zajętego węzła będą nadawały się do badania. Pomimo że badanie histopatologiczne powinno być podstawą rozpoznania chłoniaków u psów, to w praktyce stosuje się je jako metodę drugiego rzutu, w sytuacji, gdy badanie cytologiczne nie pozwala na postawienie rozpoznania. Wydaje się jednak, że taka ocena histopatologiczna powinna być wdrożona u tych pacjentów, u których stan ogólny pozwala na zabieg w znieczuleniu ogólnym, właściciel akceptuje wyższe koszty diagnostyki, a precyzyjne rozpoznanie podtypu histologicznego będzie wpływało na dobór schematu terapii.

Badanie cytologiczne w rozpoznawaniu chłoniaków u psów

Chociaż podstawą rozpoznania chłoniaka jest badanie histopatologiczne, to w codziennej praktyce weterynaryjnej zdecydowana większość rozpoznań u psów określana jest badaniem cytologicznym biopłatów cienkoigłowych. Według wielu autorów badanie cytologiczne to w większości przypadku metoda z wyboru, a przy okazji wiarygodna w rozpoznawaniu chłoniaków o wysokiej złośliwości (badanie cytologiczne pozwala na rozpoznanie chłoniaka u psa w 80–90%



Ryc. 7. Rycina prezentuje rokownicze zastosowanie cytodiagnostyki chłoniaków u psów w oparciu o klasyfikację kilońską; preparaty barwione odczynnikami Giemsa; powiększenie 200×. Na ryc. A obraz cytologiczny chłoniaka z komórek średnich z makrojąderkami (WHO: chłoniak strefy brzeżnej) – chłoniak o powolnym przebiegu, o ile ograniczony jest do śledziony, to splenektomia często daje całkowite wyleczenie i pacjent nie wymaga chemioterapii uzupełniającej. Ryc. B – obraz cytologiczny chłoniaka z komórek jasnych (WHO: chłoniak węzłowy strefy T) – kolejny przykład chłoniaka o powolnym przebiegu – wielu pacjentów bez chemioterapii przeżywa 2–3 lata od momentu rozpoznania. Ryc. C – chłoniak centroblastyczny (WHO: zazwyczaj chłoniak DLBCL) – chłoniak o umiarkowanej złośliwości – w przypadku właściwego schematu chemioterapii szansa na przeżycie dłużej niż rok jest wysoka. Ryc. D – chłoniak plazmocytoidny (WHO: chłoniak z obwodowych komórek T, bliżej niesprecyzowany) – rokowanie jest niekorzystne, okresy przeżycia rzadko przekraczają kilka miesięcy

przypadków). W onkologii medycznej badanie cytologiczne jest używane jako metoda rozpoczynająca diagnostykę chłoniaków i jest niewystarczająca do określania typów histologicznych w klasyfikacji WHO. W chłoniakach u psów, u których rozpoznanie opiera się na badaniu cytologicznym, stosuje się system uaktualnionej klasyfikacji kilońskiej (updated the Kiel classification), przy czym uzupełnienie barwienia podstawowego barwieniem immunocytochemicznym (ocena immunofenotypu komórek nowotworowych) zdecydowanie zwiększa wiarygodność rozpoznania. W związku z tym, że nie w każdym przypadku takie barwienie można wykonać (brak zgody właściciela na pokrycie dodatkowego kosztu, brak dostępnego materiału do barwień dodatkowych), rozpoznanie podtypu cytologicznego musi być traktowane z ostrożnością (autor w takich przypadkach umieszcza w komentarzu wyniku badania cytologicznego formułę „rozpoznanie morfologiczne” – co oznacza, że określenie podtypu cytologicznego nie zostało potwierdzone barwieniem immunocytochemicznym). Chociaż nie zawsze badanie cytologiczne pozwala na oszacowanie podtypu cytologicznego chłoniaka, to metodę tę należy uznać za wiarygodną, w większości przypadków można ustalić rozpoznanie chłoniaka blastycznego/chłoniaka o umiarkowanej lub wysokiej złośliwości, co więcej takie różnicowanie ma istotną wartość prognostyczną (ryc. 7). Według obserwacji własnych ocena nasilenia proliferacji komórek nowotworowych w badaniu cytologicznym może mieć wartość prognostyczną w chłoniakach centroblastycznych u psów (6), z kolei w badaniach Purzyckiej i wsp. (1) wykazano taką przydatność także w przypadku chłoniaków T-komórkowych o wysokiej złośliwości.

Badanie cytologiczne w chłoniakach o niskiej złośliwości

Wydaje się, że badanie cytologiczne może być niewystarczające do rozpoznania chłoniaków o niskiej złośliwości (chłoniaki utworzone z małych dojrzałych limfocytów), bo komórki nowotworowe w takich przypadkach są praktycznie nie do odróżnienia od limfocytów prawidłowych. Jednak niektórzy autorzy sugerują (z czym nie sposób się zgodzić), że chociażby w przypadku chłoniaków z komórek jasnych (chłoniaki strefy T o powolnym przebiegu) diagnoza jest zdecydowanie łatwiejsza w badaniu cytologicznym niż w badaniu histopatologicznym (w tym drugim przypadku nieodzowne jest barwienie immunohistochemiczne). Według opinii autora w przypadkach „oczywistych” – np. chłoniak z komórek strefy brzeżnej – rozpoznanie także nie powinno nastęrczać trudności. W takich przypadkach, kluczowa dla rozpoznania nie jest ocena morfologii komórek rozrostu (jak powiedziano wcześniej, komórki chłoniaków o niskiej złośliwości są morfologicznie identyczne z prawidłowymi lub odczynowymi limfocytami małymi), ale wysoki odsetek tych komórek wśród wszystkich komórek w rozmazach. Przykładowo, jeżeli rozmazy zawierają obfitość małych limfocytów, tak jak w niepobudzonym węźle chłonnym (niekiedy powyżej 90% komórek limfoidalnych), a materiał pobrano z powiększonego węzła

– to wydaje się oczywiste, że ten węzeł nie może być normalny. Z kolei w nienowotworowym węźle pobudzonym oprócz małych limfocytów powinny być też obecne mniej lub bardziej liczne blasty, które zazwyczaj są nieliczne w chłoniaku o niskiej złośliwości.

Stosowanie klasyfikacji WHO do oceny cytologicznej chłoniaków

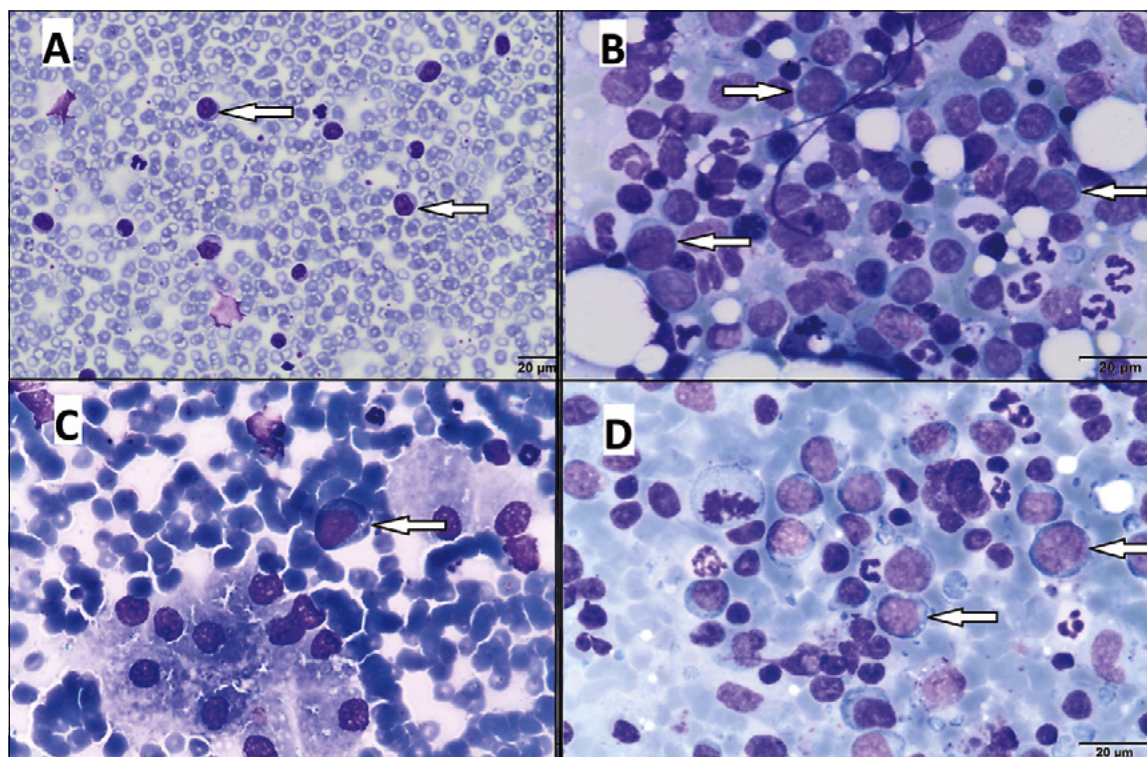
Należy jednoznacznie podkreślić, że do określenia podtypu histologicznego w klasyfikacji WHO niezbędna jest ocena architektоники tkankowej – badania histopatologicznego. W badaniu cytologicznym należy stosować klasyfikację kilońską. Większość typów cytologicznych chłoniaków w klasyfikacji kilońskiej ma swoje odpowiedniki w klasyfikacji WHO, jednak taka bezpośrednia translacja może być obciążona błędem i w każdym przypadku musi być szacunkowa. Przykładowo, chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL; klasyfikacja WHO) to zazwyczaj chłoniak centroblastyczny lub immunoblastyczny (klasyfikacja kilońska), jednak z powodu tego, że badanie cytologiczne nie daje możliwości określenia architektоники tkankowej (rozlany lub grudkowy układ komórek), nie można mieć pewności rozlanego charakteru nacieku, dlatego określenie w badaniu cytologicznym DLBCL nie jest uzasadnione.

Zastosowanie cytologii w ocenie stopnia zaawansowania klinicznego chłoniaków u psów

Badanie cytologiczne służy też do określenia, czy doszło do zajęcia innych lokalizacji przez chłoniaka (ryc. 8). Decyzje o wykonaniu takiego badania podejmuje się w oparciu o badania obrazowe (cechy zajęcia płuc w obrazie RTG, cechy zajęcia trzewi w badaniu USG jamy brzusznej; badanie płynu mózgowo-rdzeniowego w oparciu o badanie MRI). Nie ma niestety jednoznacznych danych na temat wpływu zajęcia narządów wewnętrznych (poza ośrodkowym układem nerwowym) na rokowanie i wybór schematu leczenia u psów z chłoniakiem.

Biopsja cienkoigłowa węzłów chłonnych – wskazówki praktyczne

- W przypadku uogólnionego powiększenia węzłów chłonnych do badania cytologicznego należy pobrać kilka biopłatów (2–3 biopłaty) z kilku węzłów chłonnych (2–3 węzły), a jeżeli planuje się wykonanie barwienia immunocytochemicznego – biopłaty dodatkowe (minimum 2).
- Z doświadczeń własnych wynika, że bez problemów można pobrać 10 biopłatów od jednego pacjenta.
- Z uwagi na to, że populacja komórek w węźle chłonnym jest zazwyczaj bardzo bogata, autor nie poleca stosowania aspiracji (stosowania strzykawki) w trakcie biopsji powiększonych węzłów – biopsja nieaspiracyjna jest zazwyczaj wystarczająca do pozyskania bogatokomórkowych biopłatów dobrej jakości.



Ryc. 8. Rycina prezentuje zastosowanie cytodiagnostyki w określaniu stopnia zaawansowania klinicznego chłoniaków u psów; preparaty barwione odczynnikiem Giemsy; powiększenie 100× (ryc. A), 200× (ryc. B, C i D). Ryc. A – rozmaz krwi obwodowej psa z DLBCL – we krwi obwodowej widoczne duże blastyczne komórki chłoniaka (niektóre oznaczone strzałkami; obraz białaczkowy chłoniaka). Ryc. B – obraz cytologiczny szpiku kostnego psa z DLBCL – oprócz komórek hematopoezy widoczne blastyczne limfocyty (niektóre oznaczono strzałkami). Ryc. C – obraz cytologiczny biopsatu cienkoigłowego wątroby psa z DLBCL – oprócz krwi pełnej i hepatocytów widoczny jeden immunoblast (oznaczony strzałką). Ryc. D – obraz cytologiczny biopsatu śledziony psa z DLBCL – oprócz innych komórek widoczne duże blastyczne limfocyty (niektóre oznaczono strzałkami)

- Z uwagi na to, że komórki limfoidalne, szczególnie blastyczne są bardzo kruche i łatwo pękają w trakcie wykonywania rozmazów, należy postępować bardzo delikatnie.
- Należy unikać pobierania materiału z węzłów największych i o miękkiej, chęłbocącej konsystencji.

Cytometria przepływowa

Badanie cytometryczne (flow cytometry; FC) umożliwia szybkie określenie immunofenotypu komórek w zawiesinie sporządzonej z materiału pobranego z węzła chłonnego, krwi obwodowej lub szpiku kostnego (w warunkach krajowych takie badanie nie jest jeszcze dostępne komercyjnie, można je wykonać w ośrodkach akademickich). W oparciu o wyniki cytometrii przepływowej, w kontekście wyników badania histologicznego/cytologicznego możliwe jest precyzyjne rozpoznanie chłoniaka i jego podtypu histologicznego/cytologicznego. Ponadto, wykazano też, że FC pozwala na sprecyzowanie stopnia zaawansowania klinicznego, np. poprzez wykrycie zajęcia krwi i szpiku (badania takie przeprowadzono u psów w przebiegu chłoniaka DLBCL i węzłowego chłoniaka ze strefy brzeżnej) w przypadkach, gdy badanie cytologiczne nie wykazało obecności komórek nowotworowych, a także ma potencjał rokowniczy (4, 7). FC jest przydatne w określaniu choroby resztkowej po osiągnięciu całkowitej remisji klinicznej po chemioterapii i – co

istotne – pozwala u takich pacjentów przewidywać czas do wznowy chłoniaka (8). U psów z chłoniakiem z dużych komórek B badanie cytometryczne szpiku kostnego ma znaczenie rokownicze i według Marconato i wsp. (7) powinno być ono wykonywane rutynowo u psów z tym typem chłoniaka. Podobne zalecenia (badanie FC krwi obwodowej i szpiku kostnego) sugerowane są w przypadku węzłowych chłoniaków ze strefy brzeżnej – w tym przypadku ocena cytometryczna naciekania szpiku ma znaczenie rokownicze, o dużej przydatności prognostycznej (4). Szczególnie przydatne diagnostycznie jest użycie cytometrii z zastosowaniem kilku fluorochromów o różnych barwach w czasie badania tej samej próbki, zwłaszcza w przypadku chłoniaków o aberrantnym immunofenotypie lub chłoniakach z komórek małych, których komórki są morfologicznie nie do odróżnienia od prawidłowych limfocytów (1). Badanie cytometryczne z zastosowaniem przeciwciał anti-CD34 umożliwia różnicowanie pomiędzy zajęciem szpiku przez chłoniaka (komórki CD34 ujemne) od ostrej białaczki limfoblastycznej/ chłoniaka limfoblastycznego (komórki CD34 dodatnie).

Badanie szpiku kostnego

Aktualnie brak jest konsensusu odnośnie konieczności badania szpiku kostnego u psów z chłoniakiem, wydaje się jednak, że to badanie powinno być wykonane u każdego pacjenta, chociaż z drugiej strony brak jednoznacznych dowodów na to, by wyniki oceny zajęcia

szpiku kostnego miały znaczący wpływ na rokowanie lub też pozwalały na zmianę schematu chemioterapii (2, 4). Dostępne metody badania to: cytologia aspiratów szpiku, badanie histopatologiczne bioptatów rdzeniowych oraz badanie cytometryczne. W czasie pobierania materiału należy dołożyć starań, żeby pobrać próbkę dobrej jakości, co umożliwi wykonanie nie tylko badania mikroskopowego, ale także immunofenotypowanie i ewentualne badanie PARR. Wyniki oceny morfologicznej krwi obwodowej nie zawsze korespondują z zajęciem szpiku w przebiegu chłoniaka (nacieki nowotworowe mogą być obecne w szpiku przy prawidłowym obrazie krwi obwodowej). Dostępne są doniesienia wskazujące na potencjalną przydatność rokowniczą badania szpiku kostnego metodą cytometrii przepływowej, w przypadku DLBCL (7) i węzłowego chłoniaka ze strefy brzeżnej (4).

Badanie PARR

Zastosowanie metod biologii molekularnej może być pomocne w określeniu rozpoznania, odróżnianiu chłoniaków od niektórych form rozrostu odczynowego tkanki limfatycznej, gdy badanie mikroskopowe nie jest do tego celu wystarczające, ale także do określania stopnia zaawansowania klinicznego oraz w ocenie choroby resztkowej. Metoda ta nie jest niestety doskonała, z możliwymi wynikami fałszywie dodatnimi i fałszywie ujemnymi, co więcej nie została poddana walidacji. W badaniach Hammer i wsp. (1) dokonano oceny klonalności rozrostów limfoidalnych węzłów chłonnych pobranych za pomocą biopsji cienkoigłowej od 838 psów. Skuteczność analizy PARR w rozpoznawaniu chłoniaków u psów w tym badaniu waha się na poziomie 85%, przy czym w prawie 20% przypadków ocena klonalności nie była możliwa ze względu na niską koncentrację DNA lub złą jakość próbki. Co nie zaskakuje, autorzy konkludują, że wyniki oceny klonalności muszą być interpretowane w oparciu o całościowy obraz choroby, łącznie z wynikami badania mikroskopowego (1). Zaletą metody PARR jest jej zastosowanie do wykrywania choroby resztkowej w węzłach chłonnych lub oceny zajęcia krwi obwodowej lub szpiku kostnego w sytuacji, gdy metody rutynowe nie pozwalają na jednoznaczne wykluczenie/potwierdzenie takiej możliwości. Dodatkowo, badanie PARR (szczególnie w połączeniu z cytometrią) pozwalało na określenie czasu do pojawienia się wznowy po chemioterapii oraz okresu przeżycia. Wyniki fałszywie dodatnie (stwierdzenie monoklonalności lub oligoklonalności) obserwuje się najczęściej w przebiegu innych nowotworów (najczęściej białaczki ostre) lub niektórych zakażeniach i inwazjach (erlichioza, leiszmanioza).

Obecnie metoda PARR nie jest rekomendowana w rutynowej procedurze diagnostycznej, w związku z tym, że nie wykazano, aby określenie stopnia zaawansowania określone metodami molekularnymi miało przewagę nad oceną kliniczną (5). Co więcej, wydaje się, że lepszą metodą oceny immunofenotypu komórek nowotworowych są techniki oparte o specyficzne przeciwciała (immunocyto[histo]chemia, cytometria przepływowa), a PARR powinno się stosować wtedy, gdy nie ma wystarczającego materiału do wykonania tych

pierwszych testów (dla przypomnienia PARR można wykonać na materiale pobranym z błočka parafinowego lub z rozmazu cytologicznego; 2, 9).

Ocena stopnia zaawansowania klinicznego po zakończonym leczeniu (end-staging)

Oprócz badania klinicznego, które powinno zakończyć leczenie pacjenta z chłoniakiem, celowe jest podjęcie próby określenia choroby resztkowej (minimal residual disease – MRD). Fakt, że u pacjenta rozmiar węzłów chłonnych powrócił do stanu określanego jako norma, a widoczne w badaniach obrazowych nieprawidłowości narządów wewnętrznych nie są już wykrywalne, nie oznacza, że choroba ustąpiła całkowicie. Niewykryte pozostałości komórek nowotworowych są potencjalnym źródłem wznowy chłoniaka po okresie remisji. Do metod oceny choroby resztkowej należy cytometria przepływowa i badanie metodą PARR, a badanie można wykonać, badając zawiesinę komórek z węzłów chłonnych, szpiku kostnego i krwi obwodowej. Wykrycie choroby resztkowej może też być wskazaniem do kontynuacji chemioterapii lub włączenia do protokołu dodatkowych leków pomimo uzyskania klinicznej remisji chłoniaka (4, 9). W przypadku zakończenia chemioterapii (2–4 tygodnie od podania ostatniej dawki) sugeruje się wykonanie badania morfologicznego krwi, łącznie z oceną rozmazu, badań obrazowych (w zależności od pierwotnych wskazań), badania cytologicznego śledziony, wątroby i szpiku, z oceną występowania choroby resztkowej (2).

Piśmiennictwo

1. Marconato L., Polton G.A., Sabattini S., Dacasto M., Garden O.A., Grant I., Hendrickx T., Henriques J., Lubas G., Morello E., Stefanello D., Comazzi S., and on behalf of the European Canine Lymphoma Network: Conformity and controversies in the diagnosis, staging and follow-up evaluation of canine nodal lymphoma: a systemic review of the last 15 years of published literature. *Vet. Comp. Oncol.* 2016, 15, 1029–1040.
2. Zandvliet M.: Canine lymphoma: a review. *Vet. Q.* 2016, 36, 76–104.
3. European Canine Lymphoma Network (EU-CAN-LYMPH.NET). Fourth Meeting of the European Canine Lymphoma Group, CH-Lugano, June 22nd 2019. *How to stage Canine Lymphoma in 2019. Workshop Proceedings.*
4. Marconato L., Comazzi S., Aresu L., Riondato F., Stefanello D., Ferrari R., Martini V.: Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow infiltration in newly-diagnosed canine nodal marginal zone lymphoma. *Vet. J.* 2019, 246, 78–84.
5. Flory AB, Rassnick KM, Stokol T, Scrivani PV, Erb HN.: Stage migration in dogs with lymphoma. *J. Vet. Intern. Med.* 2007, 21, 1041–1047.
6. Kliczkowska-Klarowicz K.: *Analiza epidemiologiczne, morfologiczna oraz kliniczna chłoniaków centroblastycznych u psów.* Praca doktorska. SGGW, Warszawa 2020.
7. Marconato L., Martini V., Aresu L., Sampaolo M., Valentini F., Rinaldi V., Comazzi S.: Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: Prognostic significance and proposal of a cut-off value. *Vet. J.* 2013, 197, 776–781.
8. Chalfon C., Martini V., Comazzi S., Aresu L., Stefanello D., Riondato F., Ferrari R., Marconato L.: Minimal residual disease in lymph nodes after achievement of complete remission predicts time to relapse in dogs with large B-cell lymphoma. *Vet. Comp. Oncol.* 2019, 17, 139–146.
9. Thalheim L, Williams LE, Borst LB, Fogle JE, Suter SE.: Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *J. Vet. Intern. Med.* 2013, 27, 1509–1516.

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