

(статья представлена без редакционных сокращений)

**МОРФОЛОГИЯ ЯДРЫШКА И ЯДРЫШКОВЫХ ОРГАНИЗАТОРОВ В КЛЕТКАХ
САРКОМЫ ШТИККЕРА - ИНТАКТНЫХ И ПРИ ЛЕЧЕНИИ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ПРЕПАРАТОМ ВИНКРИСТИН.
(Международный вестник ветеринарии. № 1. Санкт-Петербург -2009 г. Стр. 59 – 62.)**

¹Бокарев А.В., Лаковников Е.А., Дашаев И.В.

Санкт-петербургская академии ветеринарной
медицины;

¹электронный адрес: bok@onego.ru

Методом серебрения исследовали качественные и количественные признаки ядрышка и ядрышковых организаторов в клетках метастазирующих (n=4) и неметастазирующих (n=21) сарком «Штиккера». Выяснили что, площадь ядра, площадь ядрышка и количество AgЯОР в клетках метастазирующей саркомы больше чем аналогичные параметры в неметастазирующем варианте опухоли и составляют: $130.17 \pm 12.75 \text{ мкм}^2$, $23.52 \pm 3.87 \text{ мкм}^2$ и 13.00 ± 2.63 соответственно. В неметастазирующем варианте саркомы «Штиккера» величина тех же параметров составляет: $79.99 \pm 8.71 \text{ мкм}^2$, $12.80 \pm 3.41 \text{ мкм}^2$ и 9.19 ± 1.90 соответственно. Однако процент клеток, находящихся непосредственно в состоянии деления (клетки с невизуализируемым ядрышком и ЯОР) в метастазирующем варианте меньше и составляет $4.00 \pm 0.08\%$. В неметастазирующем варианте опухоли процент клеток находящихся в стадии деления составил $20 \pm 3.43\%$. Исследования биоптатов опухоли взятых у животных находящихся на разной стадии лечения показали, что экспрессия аргентофильных белков уменьшается и, соответственно, морфология ядрышка и ЯОР в опухолевых клетках изменяется, если она (опухоль) оказывается чувствительной к цитостатическому действию химиопрепарата. Однако, скорость изменения морфологии ядрышка и ЯОР, в процессе лечения, у отдельных пациентов различается, что проявляется в различной скорости накопления в опухолевой популяции, клеток с сегрегированным аргентофильным материалом и клеток с микроядрышками.

Ключевые слова и сокращения: опухоль, саркома «Штиккера», клетка, ядро, ядрышко, организаторы ядрышка (ЯОР), импрегнация серебром, химиотерапия, винкристин.

ВВЕДЕНИЕ.

Венерическая саркома или саркома «Штиккера» распространенная патология среди как бродячих так и домашних собак. Однако в связи с тем, что эта патология, относительно успешно излечивается цитостатическими химиопрепаратами (13, 19), интерес к ней со стороны ветеринарных врачей и ветеринарных биологов как к объекту исследования невысок. Тем не менее, следует отметить, что наши знания о данной патологии страдают серьезными, но широко не озвучиваемыми, пробелами. Так если брать теоретическую сторону вопроса, не всех специалистов устраивает версия об имплантации аллогенных опухолевых клеток в слизистую оболочку реципиента, которому эти клетки попадают от донора во время коитуса. Этот вопрос (или версия) тем более дискуссионен так как имеют место случаи заболевания венерической саркомой кастрированных сук не имеющих коитуса уже в течении нескольких лет. И даже, если принять версию о трансмиссии данной опухоли путем пересева опухолевых клеток во время коитуса, это не противоречит возможности спонтанного возникновения аналогичного неопластического процесса у некоторых индивидуумов, так как и исходная опухоль когда то, где то, у кого то, и в силу каких то причин должна была образоваться спонтанно, а не способом пересева. Кроме этого, до сих пор дискуссионен и вопрос о гистогенезе опухоли, так как исследования с использованием методов гистохимии и иммуногистохимии не дали, пока, однозначного ответа (25).

Если абстрагироваться от чистой теории и вернуться к клинической практике, то следует обратить внимание на следующие артефакты:

1 – Хотя и редко, но имеют место клинические случаи устойчивости саркомы Штиккера к химиотерапии (13, 16, 21, 30).

2 - Редко, но имеют место клинические случаи саркомы Штиккера быстро метастазирующей в регионарные лимфатические узлы (14, 18, 21, 23, 27, 29).

3 - Редко, но имеют место случаи рецидива саркомы Штикера через некоторое время после окончания химиотерапии, вследствие ее слишком раннего прекращения (16, 30).

Из всего выше сказанного, очевидно, что дальнейшее изучение саркомы Штикера объективно необходимо как с клинической, так и с общебиологической точек зрения. В этой связи может быть интересным исследование уровня экспрессии аргентофильных белков ядрышковых организаторов (AgЯОР) в клетках опухоли.

Район ядрышкового организатора (ЯОР) – это участок хромосомной ДНК, кодирующей рибосомную РНК (цистроны рДНК) и представленный множественными (несколько сотен) копиями генов рРНК: на каждом из которых синтезируются высокомолекулярные РНК-предшественники, которые превращаются в короткие молекулы РНК, входящие в состав субъединиц рибосом (1, 2, 4). В рутинных гистологических и цитологических исследованиях применяется метод серебрения, который визуализирует материал белковой или липопротеидной природы ассоциированный с ЯОР и принимающий участие в их функционировании. Техника окрашивания коллоидным серебром для выявления белков, ассоциированных с ЯОР, высоко специфична и данный метод получила общепринятое название AgЯОР (1, 4, 9).

Морфология ядрышка и число Ag-позитивных ЯОР в клетках, в нормальных условиях, генетически обусловлены и зависят от типа изучаемой ткани, уровня ее дифференцировки, уровня ее пролиферативной активности и фазы клеточного цикла (1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11), но могут изменяться при адаптивной или патологической трансформации клеток или действии на клетки ряда биологически активных веществ (4, 6, 11, 12).

Известно, что при трансформации нормальных клеток в опухолевые уровень экспрессии аргентофильных белков в них, меняется в сторону увеличения (5, 7, 22, 24). Изменение уровня экспрессии ядрышковых аргентофильных белков обуславливает, в свою очередь, появление специфической морфологической картины, как самих ядрышковых организаторов так и ядрышка в целом. Данная морфологическая картина, во первых, индивидуальна для опухолей определенного гистогенеза (6, 15, 17, 22, 24) и, во вторых, может служить маркером злокачественности и пролиферативной активности опухолевых клеток (4, 6, 8, 15, 28). С другой стороны, при нарушении в клетках синтеза рибосомальной РНК (рРНК), что происходит, в том числе, и при обработке клеток цитостатическими препаратами, уровень экспрессии аргентофильных белков уменьшается и, соответственно, морфологическая картина ядрышковых организаторов и ядрышка специфична для опухолевых клеток данного гистогенеза изменяется (2, 3, 9, 10).

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.

- 1 - Исследовать морфологические особенности ядрышка и ядрышковых организаторов в клетках саркомы «Штикера» в зависимости от ее пролиферативной активности.
- 2 - Исследовать морфологические и морфометрические особенности ядрышка и ядрышковых организаторов в клетках саркомы «Штикера» в зависимости от ее способности к метастазированию.
- 3 - Исследовать морфологические особенности ядрышка и ядрышковых организаторов в клетках саркомы «Штикера» до, и во время, лечения собак противоопухолевым цитостатическим препаратом «Винкристин».

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

25 собак (4 собаки имели метастазы в регионарные лимфатические узлы) больных венерической саркомой, различного возраста, пола и породы лечили препаратом «ВИНКРИСТИН» (0.5 мг/м², 1 раз в неделю в/в). Биоптаты с участка поражения брали до лечения, и затем через каждые 7 дней после очередного введения цитостатика. Из биоптатов готовили мазки отпечатки, которые фиксировали в метаноле 10 минут. Окраску препаратов проводили 25% раствором AgNO₃, содержащим желатин (1 мг/мл) и муравьиную кислоту (0.5 мг/мл) в течении 40 минут при комнатной температуре. После

окраски, промывания и сушки, препараты микроскопировали при увеличении $\times 1450$ с иммерсионным объективом. Оценку параметров проводили в 100 клетках каждого препарата. Исследование полученных препаратов проводили методом светооптической микроскопии на микроскопе «ЛЮМАМ И1» с цифровой камерой «Micrometrics 300 CU». «Захват» полученных изображений их архивирование и последующую обработку проводили на персональном компьютере при помощи программы «ScopPhoto 2.04.». Морфометрические исследования проводили при помощи программы «IMAGE TOOL» for windows version 2. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы «PRIMER OF BIOSTATISTICS» версия 4.03.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Проведенные исследования показали, что клетки неметастазирующей саркомы «ШТИККЕРА» имеют площадь ядрышка и ядра $12.80 \pm 3.41 \text{ мкм}^2$ и $79.99 \pm 8.71 \text{ мкм}^2$ соответственно. Аналогичные параметры клеток метастазирующего варианта опухоли составляют $23.52 \pm 3.87 \text{ мкм}^2$ и $130.17 \pm 12.75 \text{ мкм}^2$ (Таблица 1).

В $20 \pm 3.43\%$ клеток неметастазирующей саркомы «ШТИККЕРА» слабо или совсем не визуализируются ядрышки и AgЯОР, что свидетельствует о том что эти клетки находятся в промежутке от поздней профазы до ранней телофазы, т.е., непосредственно в стадии деления (Рис. 1 - г, д, ж). Остальные клетки опухоли имеют в ядре одно или два нуклеонемных и (или) компактных ядрышка (т.е. находятся в интерфазе), образованных дисперсным аргентофильным материалом, в которых отчетливо видны дискретно расположенные или объединенные в группы гранулы черного цвета представляющие AgЯОР (Рис. 1 – а, б, в).

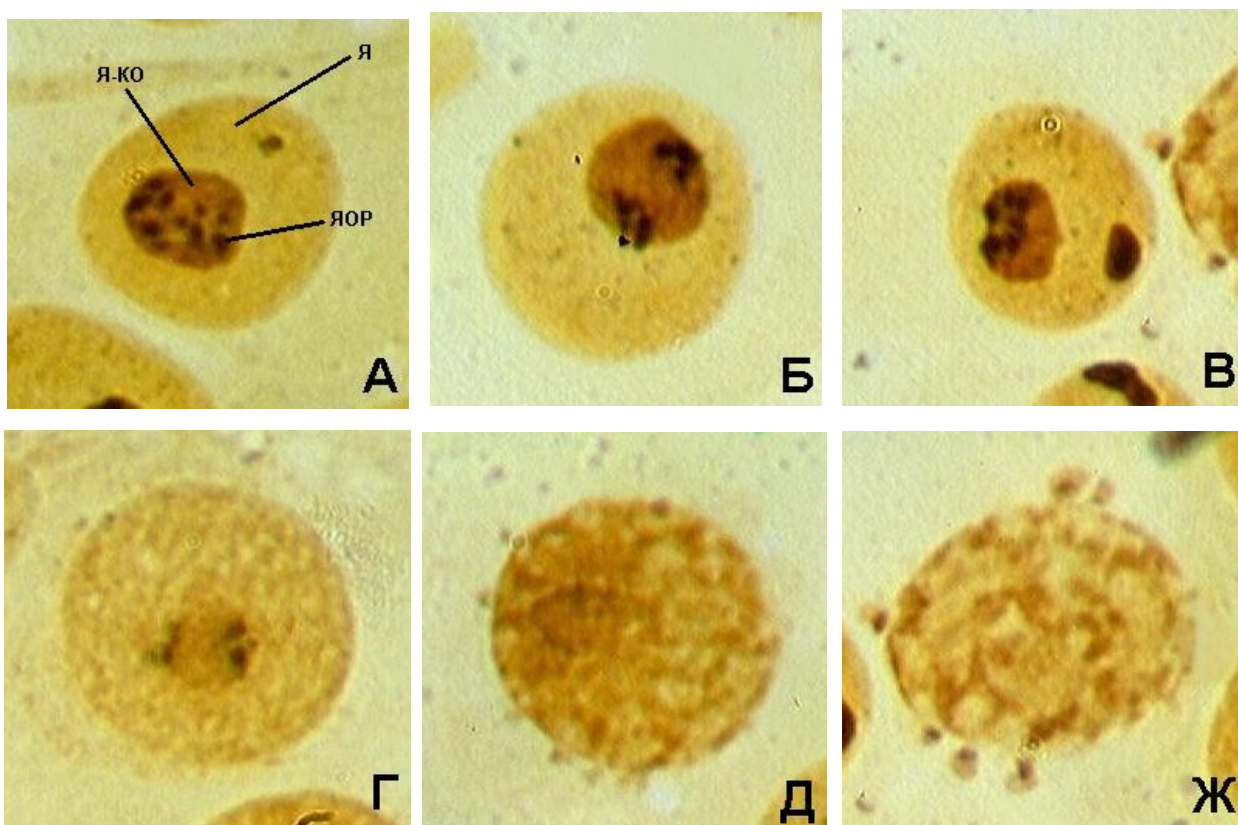


Рис. 1 Морфология клеток саркомы «Штиккера» при окраске серебром. А, Б, В – морфология клеток находящихся в интерфазе. Г, Д, Ж – морфология клеток находящихся в состоянии деления. Я – ядро. Я-КО – ядрышко. ЯОР – ядрышковые организаторы. (импрегнация серебром ($\times 1450$ иммерсия)).

Количество AgЯОР на одну интерфазную клетку неметастазирующей саркомы составило 9.19 ± 0.33 (Табл. 1).

Количество клеток без четко выраженного ядрышка (находящихся в состоянии деления) в рано метастазирующих саркомах «ШТИККЕРА» по отношению к общей клеточной популяции составляет не более 4.00 ± 0.08 %, а число AgЯОР на одну интерфазную клетку саркомы составило 13.00 ± 0.39 (Табл. 1), (Рис. 2 - б).

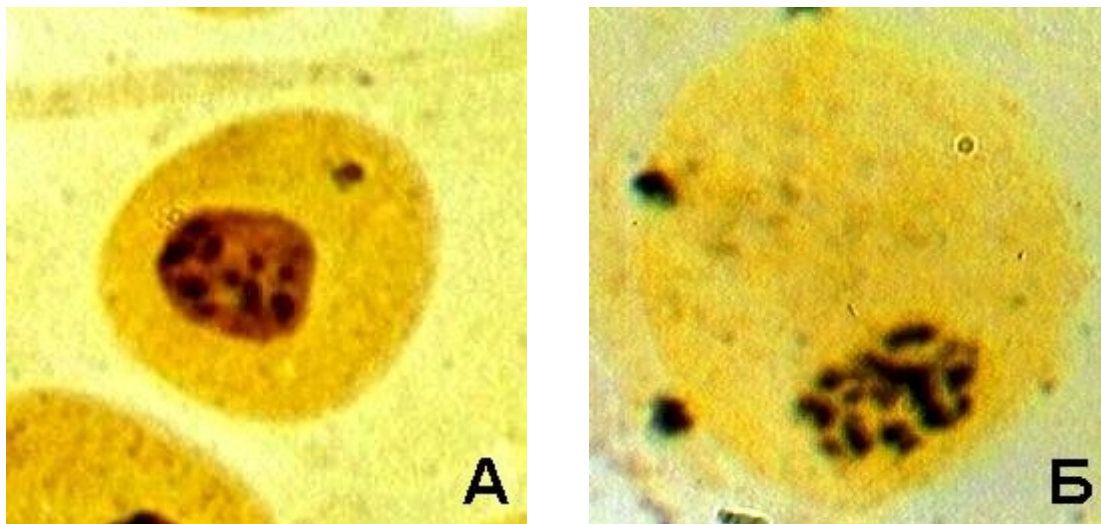


Рис. 2 Морфология клеток неметастазирующей (А) и метастазирующей (Б) саркомы «Штиккера». (импрегнация серебром (X1450 иммерсия)).

Исследования по влиянию цитостатического препарата ВИНКРИСТИН на клетки саркомы «Штиккера» *in vivo* показали, что на начальных этапах лечения в клетках опухоли происходят морфологические изменения характеризующиеся сегрегацией дисперсного аргентофильного материала и уменьшением количества AgЯОР (Рис. 3 - б). На более поздних этапах лечения в клетках биоптата полностью исчезает дисперсный аргентофильный материал, а количество ЯОР уменьшается до 4 и менее (Рис. 3 - в).



Рис. 3 Морфологические изменения ядрышка и ЯОР клеток саркомы «Штиккера» в процессе химиотерапии. А – до лечения. Б – начальные изменения характеризующиеся сегрегацией аргентофильного материала ядрышка. В – появление в клетках микроядрышек что характерно для полной остановки пролиферации и синтеза рРНК. (импрегнация серебром (X1450 иммерсия)).

Кроме того, эти AgЯОР не объединены в ядрышко, а рассеяны по ядру и классифицируются как микроядрышки или сателитные ядрышки. Как показали дополнительно проведенные исследования, данные морфологические изменения ядрышка и AgЯОР коррелируют с неспособностью клеток опухоли к дальнейшей пролиферации. Однако исследования показали, что у разных пациентов морфологические признаки ядрышка и AgЯОР свидетельствующие о подавлении их пролиферативной активности, наступали в различные сроки от начала проведения химиотерапии и накопление перечисленных морфологических изменений протекало с разной скоростью.

Таблица 1. Площадь ядра, ядрышка и количество AgЯОР в клетках неметастазирующих и метастазирующих вариантов саркомы Штиккера.

	Площадь ядрышка (мкм ²)	Площадь ядра (мкм ²)	Ядрышко- ядерное отношение	Количество AgЯОР на клетку
	$M \pm \sigma$	$M \pm \sigma$	$M \pm \sigma$	$M \pm \sigma$
Не метастазирующая опухоль (N=21)	12.80 ± 3.41	79.99 ± 8.71	0.19 ± 0.05	9.19 ± 1.90
Раннее метастазирование (N=4)	23.52 ± 3.87	130.17 ± 12.75	0.22 ± 0.05	13.00 ± 2.63
Достоверность различия	$P < 0.005$	$P < 0.005$	$P < 0.005$	$P < 0.005$

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ.

Таким образом, как показали исследования, клетки саркомы «ШТИККЕРА» имеют характерную, отличную от новообразований сходной локализации и гистогенеза, морфологию ядрышка и ЯОР при окраске серебром, что может быть использовано с целью дифференциальной диагностики при обнаружении опухоли вне зоны специфичной локализации (17, 18, 20, 27). Качественные и количественные характеристики ядрышка и AgЯОР не зависят от возраста, пола и породы пациента, но варьируют в зависимости от пролиферативной активности популяции опухолевых клеток, а так же в зависимости от степени злокачественности.

Как показано выше, клетки неметастазирующей саркомы «ШТИККЕРА» имеют средние площади ядрышка и ядра 12.80 ± 3.41 мкм² и 79.99 ± 8.71 мкм² соответственно. Указанные параметры значительно превышают в клетках метастазирующего варианта опухоли и составляют 23.52 ± 3.87 мкм² и 130.17 ± 12.75 мкм² (Таблица 1). Относительная площадь ядрышка к площади ядра, в клетках метастазирующего варианта опухоли так же выше по сравнению с аналогичным параметром неметастазирующей опухоли.

Количество AgЯОР на одну интерфазную клетку рано метастазирующей саркомы «ШТИККЕРА» так же превышают аналогичный параметр неметастазирующей опухоли и составляет 13.00 ± 0.39 по сравнению с 9.19 ± 0.33 последней (Табл. 1).

Данные исследования AgЯОР подтверждают общий принцип, что увеличение количества AgЯОР в интерфазных клетках является фактором повышенного риска развития регионарных и отдаленных метастазов (8).

Как показали результаты исследования количество клеток неметастазирующей опухоли, находящееся, непосредственно в состоянии деления (клетки с неопределяемым ядрышком и AgЯОР) составляет $20 \pm 3.43\%$ от всей опухолевой популяции. Эти результаты близки с результатами по определению пролиферативной активности саркомы

Штиккера полученными методом маркирования антигена пролиферации Ki-67 и согласно которым популяция клеток находящихся в состоянии деления составила $17 \pm 2.18 \%$ (20). В то же время доля пролиферирующих клеток в метастазирующей опухоли оказалась значительно ниже и составила не более 4%.

Исследования биоптатов опухоли взятых у животных находящихся на разной стадии лечения показали, что экспрессия аргентофильных белков уменьшается и, соответственно, морфология ядрышка и ЯОР в опухолевых клетках изменяется, если она (опухоль) оказывается чувствительной к цитостатическому действию химиопрепарата. Однако, скорость изменения морфологии ядрышка и ЯОР, в процессе лечения, у отдельных пациентов различается. Это проявляется в различной скорости накопления в опухолевой популяции, клеток с сегрегированным аргентофильным материалом и клеток с микроядрышками.

Поскольку, как показала клиническая практика, данные морфологические изменения отражают чувствительность клеток опухоли к химиотерапевтическому средству это, в конечном итоге, сказывается на продолжительности лечения. Следует отметить, что проведенные исследования не выявили различий (указанных в некоторых работах (21) в качественных и количественных характеристиках ядрышка и AgЯОР между вариантами опухолей быстро и медленно реагирующих на химиотерапию.

Поскольку изменение морфологии ядрышка и ЯОР в опухолевых клетках коррелирует с подавлением их пролиферативной активности, то данный морфологический признак можно использовать:

а - для мониторинга эффективности подавления опухолевого роста в процессе лечения,

б – планирования продолжительности курса химиотерапии,

в - для цитологического подтверждения полной редукции опухоли.

Трансмиссивная венерическая саркома собак может быть использована для фундаментальных исследований процессов онкогенеза (22, 26).

MORPHOLOGY NUCLEOLUS AND NUCLEOLAR ORGANIZERS (Ag-NOR) IN CELLS SPONTANTOUS CANINE TRANSMISSIBLE VENERAL TUMOUR IN VIVO (INFLUENCE OF ANTINEOPLASTIC PREPARATION VINCRISTIN)

Bokarev A.V¹, Lakovnikov E.A.,
St.-Petersburg academy of veterinary medicine;
¹ e-mail: bok@onego.ru

Investigated morphological features nucleolus and nucleolar organizers (Ag-NOR) in cells of a sarcoma "Shticcer" up to, and during time, treatments of dogs by an antineoplastic preparation "VINCRISTIN". Caused cytostatic morphological changes nucleolus and Ag-NOR correlate with inability of cells of a tumour to the further proliferation. At different patients morphological attributes nucleolus and Ag-NOR testifying about inability of cells of a tumour to the further proliferation came in various terms from the beginning of carrying out of chemotherapy. Monitoring of morphology nucleolus and Ag-NOR in cytologic preparations of a ssarcoma "Shticcer" can be used for definition of duration of treatment of disease.

Key words and reductions: tumor, canine transmissible venereal tumour, cells, nucleus, nucleolus, impregnation silver, argyrophil nucleolar organizer regions (AgNORs), chemotherapy, vincristine.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демин С. Ю., Стефанова В. Н. Дифференциация интерфазных ядрышковых организаторов в клетках эмбриональной почки свиньи (линия СПЭВ). Цитология. 2006. Том 48. № 4., стр 320 – 331.
2. Елисеев В.Г., Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология. Москва. Медицина. 1983., 590 стр.
3. Жарская О.О., Зацепина О.В. ДИНАМИКА И МЕХАНИЗМЫ РЕОРГАНИЗАЦИИ ЯДРЫШКА В МИТОЗЕ. ЦИТОЛОГИЯ. Том 49, №5. 2007. стр. 355 – 369.
4. Крокер Джен. Районы ядрышкового организатора и фибриллярные центры. Молекулярная клиническая диагностика (Методы). Под редакцией С. Херрингстона и Дж. Макги. Москва. Мир. 1999 год. Стр. 260-279.
5. Лазарев А.Ф., Климачев В.В., Кобяков Д.С. Субъективный количественный анализ активности ядрышковых организаторов в аденомах толстой кишки. МАТЕРИАЛЫ 8-го Международного Славяно-Балтийского научного форума “Санкт-Петербург – Гастро-2006” Гастроэнтерология Санкт-Петербурга № 1–2 / 2006/ стр. 81 – 82.
6. Мамаев Н.Н., Мамаева С.Е. Структура и функция ядрышкообразующих районов хромосом: молекулярные, цитологические и клинические аспекты. Цитология. Том 34, № 10, 1992, стр – 3 – 25.
7. Поликар А. Элементы физиологии клетки. Ленинград. Издательство «Наука». 1976 г. 389 стр.
8. Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Пробатова Н.А., Смирнова Е.А. Аргирофильные белки областей ядрышковых организаторов – маркеры скорости клеточной пролиферации. Архив патологии. № 3. Том 68. 2006 год. Стр. 47 – 51.
9. Робертис Э., Новинский В., Саэс Ф. Биология клетки. Москва. Мир. 1973 год. 488 стр.
10. Челидзе П.В., Зацепина О.В. Морфофункциональная классификация ядрышек. Успехи современной биологии. 1988., том 105., Вып. 2., Стр. 252 – 267.
11. Юрко А.С., Кавцевич Н.Н. Районы организаторов ядрышка лимфоцитов гренландских тюленей (*Pagophilus groenlandicus* Erxleben, 1777) разного возраста. Морские млекопитающие Голарктики. 2006. стр 576 – 580.
12. Bauer NB, Zervos D, Moritz A. Argyrophilic nucleolar organizing regions and Ki67 equally reflect proliferation in fine needle aspirates of normal, hyperplastic, inflamed, and neoplastic canine lymph nodes (n = 101). Journal of veterinary internal medicine (American college of Veterinary Internal Medicine). 2007 Sep-Oct;21(5):928-35.
13. Calvert CA, Leifer CE, MacEwen EG. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. JAVMA 1982; 181:163-164.
14. Cohen. D. (1973) The biological behaviour of the transmissible venereal tumour in immunosuppressed dogs. Eur. J. Cancer 9, 253-258.
15. David Vail , Laura Kravis , William Kisseberth , Gregory Ogilvie , Lynn Volk. Application of rapid CD3 immunophenotype analysis and argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) frequency to fine needle aspirate specimens from dogs with lymphoma. Veterinary Clinical Pathology. Vet Clin Pathol. 1997 ;26 (2):66-69.
16. Den Otter, W., Cadée, J., Gavhumende, R., De Groot, C.J., Hennink, W.E. and Stewart, R. (1999) Effective cancer therapy with a single injection of interleukin-2 at the site of the tumour. Cancer Immunol. Immunother. 48, 419-420.
17. Duncan JR, Prasse KW. Cytology of canine cutaneous round cell tumors. Vet Pathol 1979; 16:673-679.

18. Ferreira, A.J., Jaggy, A., Varejro, A.P., Ferreira, M.L.P., Correia, J.M.J., Mulas, J.M., Almeida, O., Oliveira, P. and Prada, J. (2000) Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. *J. Small Anim. Pract.* 41, 165-168.
19. Gonzalez, Carlos.; Flores, Estefania; Cattaneo, Gino; Cepeda, Raquel*, Lombardi, Cesar* *. EFFECT OF VINCRISTINE CHEMOTHERAPY ON LOCAL LEUKOCYTE RESPONSE TO CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR. *AVANCES EN CIENCIAS VETERINARIAS - VOL. 15, N.1 y N.2 (enero - diciembre), 2000* p.45 – 53.
20. Guvenc T. *, Haligur M., Orman M. N. and Hazirolu R. MITOSIS AND APOPTOSIS IN CANINE CUTANEOUS HISTIOCYTOMA AND TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOUR. *Acta Veterinaria Hungarica* 50 (3), pp. 315–321 (2002).
21. Harmelin A, Zuckerman A, Nyska A. Correlation of Ag-NOR protein measurements with prognosis in canine transmissible venereal tumour. *J Comp Pathol.* 1995 May;112(4):429-33.
22. JELESJEVI T, JOVANOVI M. QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ANALYSIS OF AgNOR IN BENIGN AND MALIGNANT CANINE MAMMARY GLAND TUMORS. *Acta Veterinaria (Belgrade)*, Vol. 53. No. 5-6, 353-360, 2003.
23. Josй Pйreza *, Michael J. Dayb and Elena Mozosa. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* Volume 64, Issue 2, 8 July 1998, Pages 133-147.
24. Kravis LD, Vail DM, Kisseberth WC, Ogilvie GK, Volk LM. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1996 Oct 15;209(8):1418-20.
25. Marchala T., Chabanneb L., Kaplanskib C., Rigalc D. and Magnola J.P. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Vol. 57 (1-2) (1997) pp. 7-17.
26. Mary Bate. The Dog as an Experimental Animal. *ANZCCART News* Vol 10 No 1 March 1997. pp. 1 – 8/
27. Meleo KA. Tumors of the skin and associated structures. *Vet Clin N Amer* 1997; 27:73-94.
28. Pascal Roussel and Danièle Hernandez-Verdun. Identification of Ag-NOR Proteins, Markers of Proliferation Related to Ribosomal Gene Activity. *Experimental Cell Research.* Volume 214, Issue 2, October 1994, Pages 465-472.
29. Rogers KS. Transmissible venereal tumor. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1997; 19:1036-1045.
30. Yang, T.J. (1987) Parvovirus-induced regression of canine transmissible venereal sarcoma. *Am. J. Vet. Res.* 48, 799-800.