

UDK 636.7.09:618.19-006:577.2:57.083(043.3)

Mojca Cerovšek, dr. vet. med.

**PROGNOSTIČNA VREDNOST MOLEKULARNEGA RAZVRŠČANJA
MALIGNIH TUMORJEV MLEČNE ŽLEZE PRI PSICAH Z UPORABO
IMUНОHISTOKEMIJE TER RAVEN IZRAŽANJA VASKULARNEGA
ENDOTELIJSKEGA RASTNEGA FAKTORJA V RAZLIČNIH
MOLEKULARNIH PODTIPIH**

Doktorska disertacija

**PROGNOSTIC VALUE OF MOLECULAR CLASSIFICATION OF CANINE
MAMMARY CARCINOMAS USING IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND
VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR EXPRESSION
LEVEL IN DIFFERENT MOLECULAR SUBTYPES**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2013

Mojca Cerovšek

Prognostična vrednost molekularnega razvrščanja malignih tumorjev mlečne žleze pri psicah z uporabo imunohistokemije ter raven izražanja vaskularnega endotelijskega rastnega dejavnika v različnih molekularnih podtipih

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo, Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani in na Oddelku za patologijo živali Veterinarske fakultete v Pisi, Italija.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: prof. dr. Milan Pogačnik, dr. vet. med.

Somentorica: izr. prof. dr. Jelka Zabavnik Piano, dr. vet. med.

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Nataša Tozon, dr. vet. med.

Članica: prof. dr. Milka Vrecl, dr. vet. med.

Članica: izr. prof. dr. Maja Čemažar, univ. dipl. biol.

»If you know nothing of the making of the universe it is indeed complicated, however when you begin to understand, it is merely complex.«

Albert Einstein

IZVLEČEK

Ključne besede: pes, bolezni; mlečna žleza, novotvorbe – patologija – klasifikacija; prognoza; molekularne diagnostične metode; imunohistokemija; žilni endotelijski rastni faktorji – genetika; gensko izražanje, regulacija; psi; samica.

Tumorji mlečne žleze so najpogosteji tip tumorja, ki se pojavlja pri nesteriliziranih psicah. Na podlagi ravni izražanja posameznih celičnih označevalcev, določene z imunohistokemijo (ang. immunohistochemistry – IHC), karcinome mlečne žleze pri psicah razvrstimo na luminalni podtip A, luminalni podtip B, podtip HER-2 in basalni podtip. V naši raziskavi smo žeeli preveriti prognostično vrednost takšnega načina razvrščanja. V raziskavo smo vključili 81 malignih tumorjev mlečne žleze (TMŽ) 72 psic, katerim so tumorje kirurško odstranili med leti 2003 in 2010 na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani (KKMŽ VF UL). Iz kliničnih kartotek psic smo zbrali podatke o pasmi, starosti, steriliziranosti psic, mestu tumorjev, kliničnem stadiju in morebitni zgodovini navidezne brejosti psic. Poleg patohistološke diagnostike smo za vsak tumor določili stopnjo diferenciacije po metodi Elstona in Ellisa. Z imunohistokemičnim označevanjem smo določili raven izražanja estrogenkskega (ER) in progesteronskega receptorja (PR), receptorja za humani epidermalni rastni dejavnik 2 (ang. human epidermal growth factor receptor 2 – HER-2) in vaskularnega endotelijskega rastnega dejavnika (ang. vascular endothelial growth factor – VEGF). S testom Pearsonovega Hi-kvadrata smo ugotavljali povezave med posameznimi parametri. Tumorji, ki šibko izražajo ali ne izražajo ER in PR (tumorji ER⁻ in tumorji PR⁻) so pogosteji pri psicah starih 10 let ali več in so največkrat slabše diferencirani anaplastični karcinomi, ki močno izražajo VEGF. VEGF se močneje izraža v karcinomih enostavnega patohistološkega tipa in anaplastičnih karcinomih. Večji delež karcinomov luminalnega podtipa A in B so karcinomi kompleksnega tipa in karcinomi *in situ*. Karcinomi basalnega podtipa so največkrat slabo diferencirani tumorji enostavnega tipa, ki močno izražajo VEGF. Primerjavo preživetja psic z različnimi oblikami tumorjev smo prikazali s krivuljami po Kaplan - Meierju. Starost, klinični stadij, patohistološka diagnostika, stopnja diferenciacije tumorja, raven izražanja ER, PR in

VEGF ter IHC razvrščanje so statistično značilno povezani s preživetjem psic z malignimi TMŽ.

Rezultati multivariatne analize kažejo, da raven izražanja PR (tumorji PR^{+/PR⁻}), IHC razvrščanje in klinični stadij predstavljajo najpomembnejše prognostične dejavnike psic z malignimi TMŽ.

Pri psicah kliničnega stadija IV je tveganje za pogin 4,5 in 3,7-krat večje kot pri psicah kliničnega stadija I in II. Pri psicah s tumorji PR⁻ je tveganje 3,1-krat večje v primerjavi s psicami s tumorji PR⁺. Relativno tveganje za pogin je pri psicah s karcinomi bazalnega podtipa 3,1 in 3,7-krat višje kot pri psicah s karcinomi luminalnega podtipa A in luminalnega podtipa B. Z rezultati naše raziskave smo potrdili prognostično vrednost IHC razvrščanja in odprli pot za nadaljnje raziskave.

ABSTRACT

Keywords: dog diseases; mammary neoplasms – pathology – classification; prognosis; molecular diagnostic techniques; immunohistochemistry; vascular endothelial growth factor – genetics; gene expression regulation; dogs; female.

Mammary gland tumours are the most frequent class of neoplasm seen in female dogs. Depending on the level of expression of some cell markers using immunohistochemistry mammary gland carcinomas can be divided into luminal A, luminal B, HER-2 and basal subtypes. This study aimed to evaluate the prognostic value of this type of classification. 81 malignant mammary gland tumours from 72 bitches that underwent surgery between 2003 and 2010 at the Clinic for small animal medicine and surgery at the Veterinary Faculty of the University of Ljubljana were included in the study. Data on breed, age, spaying, tumour location, clinical stage and history of pseudo-pregnancy were collected from the medical records of the bitches. In addition to histopathological diagnoses, histological grading was evaluated according to Elston and Ellis. The expression levels of oestrogen (ER) and progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were assessed with immunohistochemical staining. ER⁻ and PR⁻ tumours, which are more common in bitches age 10 or older, are frequently poorly differentiated anaplastic carcinomas with strong VEGF expression. The VEGF expression is stronger in simple type carcinomas and anaplastic carcinomas. A large proportion of carcinomas of luminal A and B subtype are complex type carcinomas and carcinomas *in situ*. Basal subtype carcinomas are predominantly poorly differentiated carcinomas of simple type with strong VEGF expression. We used the Pearson's chi-square test to test the differences between different variables. Survival curves were generated using the Kaplan-Meier method. Age, clinical stage, histopathologic classification, histological grade, levels of expression of ER, PR and VEGF and IHC classification were statistically significantly associated with survival. According to the results of the multivariate analysis, the expression level of PR (tumours PR⁺/PR⁻), IHC classification and clinical stage represent the strongest prognostic factors for

bitches with malignant mammary gland tumours. Bitches with clinical stage IV tumours have a 4.5 and 3.7 fold higher relative risk of death than bitches with clinical stages I and II, respectively. In bitches with PR⁻ tumours the risk of death is 3.1 times higher than in bitches with tumours PR⁺. Relative risk in bitches with basal subtype carcinomas is 3.1 and 3.7 fold higher than in bitches with luminal A and B subtype carcinomas. The results of our study confirmed the prognostic value of IHC classification and paved the way for future research.

KAZALO

IZVLEČEK	5
ABSTRACT	7
KAZALO	9
KAZALO SLIK.....	11
KAZALO TABEL.....	12
LIST OF TABLES	14
TABLE OF FIGURES	15
SEZNAM OKRAJŠAV	18
1 UVOD	19
1.1 HIPOTEZE	20
2 PREGLED LITERATURE	21
2.1 MORFOLOGIJA MLEČNE ŽLEZE PRI PSICI	21
2.1.1 Limfne in krvne žile v mlečni žlezi	22
2.1.2 Spolno dozorevanje in brejost	23
2.2 ETIOLOGIJA TUMORJEV MLEČNE ŽLEZE PRI PSICAH	23
2.3 RAZVRŠČANJE TUMORJEV MLEČNE ŽLEZE PRI PSICAH	24
2.3.1 Klinična ocena bolezni.....	25
2.3.1.1 <i>Klinični stadij</i>	25
2.3.2 Patohistološko razvrščanje	26
2.3.2.1 <i>Ocena stopnje diferenciacije tumorja</i>	30
2.4 RAZVRŠČANJE NA PODLAGI RAVNI IZRAŽANJA POSAMEZNIH CELIČNIH OZNAČEVALCEV.....	31
2.4.1 Prognostična vrednost imunohistokemičnega razvrščanja	32
2.5 ESTROGENSKI IN PROGESTERONSKI RECEPTORJI	33
2.5.1 Zgradba in delovanje estrogenskih receptorjev.....	33
2.5.2 Zgradba in delovanje progesteronskih receptorjev	34
2.5.3 Vpliv na razvoj tumorjev mlečne žleze	34
2.5.4 Izražanje v tumorjih mlečne žleze	35
2.6 RECEPTOR ZA HUMANI EPIDERMALNI RASTNI DEJAVNIK 2	35
2.6.1 Zgradba in delovanje	36
2.6.2 Vpliv na razvoj tumorjev mlečne žleze	36
2.6.3 Izražanje v tumorjih mlečne žleze	37
2.7 BAZALNI KERATINI IN VIMENTIN	37
2.7.1 Pomen izražanja keratina 5/6, keratina 14 in vimentina v tumorjih mlečne žleze	38
2.8 VASKULARNI ENDOTELIJSKI RASTNI DEJAVNIK.....	38
2.8.1 Zgradba in delovanje	39
2.8.2 Izražanje v tumorjih mlečne žleze	39
3 MATERIALI IN METODE	40
3.1 IZBOR ŽIVALI IN ZBIRANJE KLINIČNIH PODATKOV	40
3.2 OBDELAVA TKIV IN PATOHISTOLOŠKA PREISKAVA.....	41

3.3 IMUNOHISTOKEMIČNE PREISKAVE.....	42
3.3.1 Celični označevalci	44
3.3.2 Nadzori pri imunohistokemičnem označevanju.....	45
3.4 MERILA ZA OCENJEVANJE IMUNOHISTOKEMIČNIH REAKCIJ.....	46
3.5 UGOTAVLJANJE DELEŽA POZITIVNIH TUMORSKIH CELIC.....	46
3.5.1 Imunohistokemično razvrščanje tumorjev.....	47
3.6 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV.....	49
4 REZULTATI.....	51
4.1 KLINIČNI PODATKI PSIC	51
4.1.1 Pasemska porazdelitev	51
4.1.2 Starostna razvrstitev.....	53
4.1.4 Pogostost tumorjev glede na položaj v mlečnem kompleksu.....	53
4.1.5 Razvrstitev psic v posamezne skupine kliničnega stadija.....	54
4.2 PATOHISTOLOŠKO RAZVRŠČANJE	54
4.3 REZULTATI IMUNOHISTOKEMIČNE PREISKAVE	59
4.3.1 Vpliv časa fiksacije tkiva tumorja v formalinu na izražanje celičnih označevalcev ...	59
4.3.2 Rezultati imunohistokemične preiskave za estrogenske in progesteronske receptorje ter receptor za humani epidermalni rastni dejavnik 2.....	60
4.3.3 Rezultati imunohistokemične preiskave za bazalne celične označevalce	64
4.3.4 Rezultati imunohistokemične preiskave za vaskularni endotelijski rastni dejavnik ..	65
4.3.5 Imunohistokemično razvrščanje	68
4.4 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE	69
4.4.1 Preverjanje soodvisnosti posameznih spremenljivk	69
4.4.2 Preverjanje soodvisnosti patohistološkega razvrščanja in stopnje diferenciacije.....	79
4.4.3 Preverjanje korelacij med ravnimi izražanja celičnih označevalcev.....	80
4.4.4 Preverjanje povezanosti posameznih spremenljivk s preživetjem psic	81
4.4.5 Preverjanje najmočnejših prognostičnih dejavnikov	88
4.4.5.1 <i>Preverjanje uporabnosti kombinirane ocene najmočnejših prognostičnih dejavnikov</i>	<i>89</i>
5 RAZPRAVA	93
5.1 Klinični parametri	93
5.1.1. Klinični stadij	96
5.2 Patohistološki parametri.....	97
5.3 Celični označevalci	100
5.3.1 Celična označevalca ER in PR	100
5.3.1.1 <i>Tumorji ER-/PR⁺</i>	<i>102</i>
5.3.2 Celični označevalec HER-2.....	102
5.3.3 Celični označevalec VEGF	103
5.4 Imunohistokemično razvrščanje	104
5.5 Kombinirana ocena najmočnejših prognostičnih dejavnikov	105
5.6 Prednosti in slabosti proučevanja tumorjev mlečne žleze pri psicah.....	106
6 ZAKLJUČKI	109
7 POVZETEK.....	111
8 SUMMARY.....	114
9 ZAHVALE.....	117

10 LITERATURA.....	119
11 PRILOGE.....	136

KAZALO SLIK

Slika 1: Razvrščanje karcinomov mlečne žleze na posamezne imunohistokemične podtipe (delno povzeto po Sassi in sod., 2010)	48
Slika 2: A karcinom in situ, B karcinom kompleksnega tipa (HE, 40-kratna povečava)	55
Slika 3: A tubulopapilaren karcinom, B soliden karcinom, C anaplastičen karcinom in D ploščatoceličen karcinom (HE, 100-kratna povečava)	56
Slika 4: Primeri malignih mezenhimskih tumorjev mlečne žleze: A maligni mešani tumor, B maligni mioepiteliom, C karcinosarkom in D fibrosarkom (HE, 100-kratna povečava)	57
Slika 5: Primeri karcinomov mlečne žleze ocenjenih s stopnjo diferenciacije I (A), II (B) in III (C) (HE, na zgornjih slikah 40-kratna in na spodnjih 400-kratna povečava)	58
Slika 6: Število malignih tumorjev mlečne žleze ER ⁺ , ER ⁻ , PR ⁺ , PR ⁻ , HER-2 ⁺ in HER-2 ⁻ (n = 79).	60
Slika 7: Različne ravni izražanja estrogenskega receptorja v malignih tumorjih mlečne žleze: A močno, B zmerno, C šibko, D negativno, E pozitivna kontrola in F negativna kontrola (IHC označevanje, 400-kratna povečava)	61
Slika 8: Različne ravni izražanja progesteronskega receptorja v malignih tumorjih mlečne žleze: A močno, B zmerno, C šibko, D negativno, E pozitivna kontrola in F negativna kontrola (IHC označevanje, 400-kratna povečava)	62
Slika 9: Različne ravni izražanja receptorja za humani epidermalni rastni dejavnik 2 v malignih tumorjih mlečne žleze: A močno, B zmerno, C šibko, D negativno, E pozitivna kontrola in F negativna kontrola (IHC označevanje, 400-kratna povečava)	63
Slika 10: Različne ravni izražanja bazalnih celičnih označevalcev v tumorjih mlečne žleze: a–c keratin 5/6, d–f keratin 14, g–i vimentin - od leve proti desni z močno, zmerno in šibko ravnijo izražanja (IHC označevanje, 400-kratna povečava)	64
Slika 11: Pozitivne (levo) in negativne kontrole (desno) za basalne celične označevalce: a–b keratin 5/6, c–d keratin 14, e–f vimentin (IHC označevanje, 200-kratna povečava)	65
Slika 12: Razpon rezultatov imunohistokemične analize izražanja vaskularnega endoteljskega	

M. Cerovšek: Prognostična vrednost ... razvrščanja malignih tumorjev mlečne žleze pri psicah ... Ljubljana: UL, Veterinarska fakulteta, 2013. Doktorska disertacija	12
rastnega dejavnika v malignih tumorjih mlečne žleze (n = 79)	66
Slika 13: Različne ravni izražanja vaskularnega endotelijskega rastnega dejavnika v malignih tumorjih mlečne žleze: A močno, B zmerno, C šibko, D negativno, E pozitivna kontrola in F negativna kontrola (IHC označevanje, 200-kratna povečava)	67
Slika 14: Število karcinomov mlečne žleze različnih IHC podtipov (n = 75)	68
Slika 15: Krivulje preživetja, po Kaplan - Meierju, psic starih manj kot 10 let in 10 let ali več (A) in psic kliničnega stadija I, II, III in IV (B)	83
Slika 16: Krivulje preživetja, po Kaplan - Meierju, psic s tumorji različnih patohistoloških značilnosti: A stopnja diferenciacije, B histološki tip, C patohistološko razvrščanje	84
Slika 17: Krivulje preživetja, po Kaplan – Meierju, psic s tumorji ER ⁺ /ER ⁻ (A) in tumorji PR ⁺ /PR ⁻ (B).....	86
Slika 18: Krivulje preživetja, po Kaplan - Meierju, psic s tumorji različne ravni izražanja vaskularnega endotelijskega rastnega dejavnika (A) in tumorji različnih IHC podtipov (B)	87
Slika 19: Krivulje preživetja po Kaplan - Meierju psic z malignimi tumorji mlečne žleze glede na kombinirano oceno kliničnega stadija/IHC razvrščanja (A) in kliničnega stadija/PR (B).....	91

KAZALO TABEL

Tabela 1: Merila za določanje kliničnega stadija po Lana in sod. (2007).....	26
Tabela 2: Primerjava patohistološkega razvrščanja tumorjev mlečne žleze pri psicah po Misdorpu in sod. (1999) in Goldschmittu in sod. (2011).....	29
Tabela 3: Merila za ocenjevanje stopnje diferenciacije malignih tumorjev mlečne žleze po Elstonu in Ellisu (1991) Table 3: Criteria for assessing the histological grade of malignant mammary gland tumours in accordance with Elston and Ellis (1991)	30
Tabela 4: Število in delež psic s tumorji mlečne žleze, katerim so tumorje kirurško odstranili na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani med leti 2003 in 2010 in številčnost te pasme v Sloveniji (podatki Veterinarske uprave Republike Slovenije, december 2011)	52
Tabela 5: Razvrstitev psic s tumorji mlečne žleze glede na starost	53

Tabela 6: Razvrstitev tumorjev glede na mesto (mlečni kompleks)	54
Tabela 7: Časovni intervali razkrivanja antigenov, uporabljeni redčenja posameznih protiteles in čas inkubacije s posameznimi primarnimi protitelesi.....	59
Tabela 8: Razporeditev tumorjev ER ⁻ /ER ⁺ znotraj skupin kliničnih, patohistoloških in imunohistokemičnih parametrov	70
Tabela 9: Razporeditev tumorjev PR ⁻ /PR ⁺ znotraj skupin kliničnih, patohistoloških in imunohistokemičnih parametrov	72
Tabela 10: Razporeditev tumorjev HER-2 ⁻ /HER-2 ⁺ znotraj skupin kliničnih, patohistoloških in imunohistokemičnih parametrov	74
Tabela 11: Razporeditev tumorjev VEGF 0/VEGF 1/VEGF 2 in VEGF 3 znotraj skupin kliničnih, patohistoloških in imunohistokemičnih parametrov.....	75
Tabela 12: Razporeditev tumorjev A/luminalnega podtipa B/podtipa HER-2/bazalnega podtipa znotraj skupin kliničnih, patohistoloških in imunohistokemičnih parametrov	77
Tabela 13: Razporeditev karcinomov enostavnega/kompleksnega tipa znotraj skupin stopnje diferenciacije.....	79
Tabela 14: Razporeditev tumorjev različnih patohistoloških tipov znotraj skupin stopnje diferenciacije.....	79
Tabela 15: Spearmanov koeficient korelacije izražanja VEGF, ER, PR in HER-2	80
Tabela 16: Analiza povezave preživetja po testu log-rank s spremenljivkami, ki bi lahko vplivale na preživetje psic dve leti po kirurški odstranitvi tumorjev mlečne žleze.....	82
Tabela 17: Rezultati multivariatne analize prvega modela – klinični stadij in PR kot najmočnejša prognostična dejavnika za preživetje psic z malignimi tumorji mlečne žleze	88
Tabela 18: Rezultati multivariantne analize drugega modela – klinični stadij in IHC razvrščanje kot najmočnejša prognostična dejavnika za preživetje psic z malignimi tumorji mlečne žleze	89
Tabela 19: Število okrnjenih podatkov o preživetju in preživelih psicah z malignimi tumorji mlečne žleze v podskupinah kombinirane ocene kliničnega stadija in imunohistokemičnega razvrščanja (n = 62)	90
Tabela 20: Število okrnjenih podatkov o preživetju in preživelih psicah z malignimi tumorji mlečne žleze v podskupinah kombinirane ocene kliničnega stadija in PR (n = 66)	90

LIST OF TABLES

Table 1: Criteria for assessing the clinical stage in accordance with Lana et al (2007)	26
Table 2: Comparison of histopathological classification of canine mammary gland tumours according to Misdorp et al (1999) and Goldschmidt et al (2011)	29
Table 3: Criteria for assessing the histological grade of malignant mammary gland tumours in accordance with Elston and Ellis (1991)	30
Table 4: The number and percentage of bitches with mammary gland tumours that underwent surgery between 2003 and 2010 at the Clinic for small animals medicine and surgery at the Veterinary Faculty of the University of Ljubljana and the breed's size in Slovenia (data from the Veterinary administration of the Republic of Slovenia, December 2011).....	52
Table 5: Age distribution of the bitches with mammary gland tumours.....	53
Table 6: Classification of the tumours by their location (mammary complex)	54
Table 7: Time intervals of antigen unmasking, antibody dilutions used and the primary antibody incubation time	59
Table 8: The distribution of ER ⁻ /ER ⁺ tumours by the clinical, pathohistological and immunohistochemical parameters.....	70
Table 9: The distribution of PR ⁻ /PR ⁺ tumours by the clinical, pathohistological and immunohistochemical parameter	72
Table 10: The distribution of HER-2 ⁻ /HER-2 ⁺ tumours by the clinical, pathohistological and immunohistochemical parameters.....	74
Table 11: The distribution of VEGF 0/VEGF 1/VEGF 2 in VEGF 3 tumours by the clinical, pathohistological and immunohistochemical parameters ..	75
Table 12: The distribution of luminal subtype A/luminal subtype B/subtype HER-2/basal subtype tumours by the clinical, pathohistological and immunohistochemical parameters ..	77
Table 13: The distribution of simple/complex type carcinomas by the histological grade groups	79
Table 14: The distribution of tumours of different histopathological subtype by the	

histological grade groups.....	79
Table 15: Spearman's rank correlation coefficient between VEGF, ER, PR and HER-2 expression.....	80
Table 16: Log-rank test for variables possibly associated with the survival of bitches two years after surgical removal of mammary gland tumours.....	82
Table 17: Results of multivariate analysis of the first model – clinical stage and PR as the strongest prognostic factors for the survival of bitches with malignant mammary gland tumours	88
Table 18: Results of multivariate analysis of the second model – clinical stage and IHC classification as the strongest prognostic factors for the survival of bitches with malignant mammary gland tumours	89
Table 19: Number of surviving and censored bitches with malignant mammary gland tumours in subgroups with different clinical stage and immunohistochemical classification (n = 62) ..	90
Table 20: Number of survived and censored bitches with malignant mammary gland tumours in subgroups with different clinical stage and PR (n = 66)	90

TABLE OF FIGURES

Figure 1: Sorting of the mammary gland carcinomas regarding immunohistochemical subtypes (partially adapted from Sassi et al., 2010).....	48
Figure 2: A carcinoma in situ, B complex type carcinoma (HE, 40-fold magnification)	55
Figure 3: A simple tubulopapillary carcinoma, B solid carcinoma, C anaplastic carcinoma and D squamous cell carcinoma (HE, 100-fold magnification).....	56
Figure 4: Examples of malignant mesenchymal mammary gland tumours: A malignant mixed tumour, B malignant myoepithelioma, C carcinosarcoma and D fibrosarcoma (HE, 100-fold magnification).....	57
Figure 5: Examples of carcinomas of the mammary gland estimated with the histological grade I (A), II (B) and III (C) (HE, the above figures with 40-fold and the figures below with 400-fold magnification)	58
Figure 6: The number of ER ⁺ , ER ⁻ , PR ⁺ , PR ⁻ , HER-2 ⁺ in HER-2 ⁻ malignant mammary gland	

tumours (n = 79)	60
Figure 7: Different levels of estrogen receptor expression in malignant mammary gland tumours: A strong, B moderate, C weak, D negative, E positive control, F negative control (IHC staining, 400-fold magnification).....	61
Figure 8: Different levels of progesteron receptor expression in malignant mammary gland tumours: A strong, B moderate, C weak, D negative, E positive control, F negative control (IHC staining, 400-fold magnification).....	62
Figure 9: Different levels of human epidermal growth factor receptor 2 expression in malignant mammary gland tumours: A strong, B moderate, C weak, D negative, E positive control, F negative control (IHC staining, 400-fold magnification).....	63
Figure 10: Different levels of basal cell markers expression in malignant mammary gland tumours: a–c keratin 5/6, d–f keratin 14, g–i vimentin – from left to the right with strong, moderate and weak expression (IHC staining, 400-fold magnification).....	64
Figure 11: Positive (left) and negative controls (right) for basal cell markers. a–b keratin 5/6, c–d keratin 14, e–f vimentin (IHC staining, 200-fold magnification).....	65
Figure 12: The range of immunohistochemical analysis results of vascular endothelial growth factor expression in malignant mammary gland tumours (n = 79)	66
Figure 13: Different levels of vascular endothelial growth factor expression in malignant mammary gland tumours: A strong, B moderate, C weak, D negative, E positive control, F negative control (IHC staining, 200-fold magnification)	67
Figure 14: The number of mammary gland carcinomas of different IHC subtypes (n = 75)....	68
Figure 15: Kaplan - Meier survival curve for bitches aged less than 10 years and 10 years or more (A), and for bitches with clinical stages I, II, III and IV (B)	83
Figure 16: Kaplan - Meier survival curves for bitches with tumours of different histopathological characteristics: A histological grade, B histopathological type, C histopathological classification.....	84
Figure 17: Kaplan - Meier survival curves for bitches with ER ⁺ /ER ⁻ tumours (A) and PR ⁺ /PR ⁻ tumours (B)	86
Figure 18: Kaplan - Meier survival curves for bitches with tumours with different levels of vascular endothelial growth factor expression (A) and tumours of different IHC subtypes (B)	

.....87

Figure 19: Kaplan - Meier survival curve for bitches with malignant mammary gland tumours
with a combined estimation of clinical stage/IHC classification (A) and clinical stage/PR (B) 91

SEZNAM OKRAJŠAV

ER – estrogenski receptor

HE – hematoksilin in eozin

HER – receptor za humani epidermalni rastni dejavnik

HER-1 – receptor za humani epidermalni rastni dejavnik 1

HER-2 – receptor za humani epidermalni rastni dejavnik 2

IPSVU – Inštitut za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo

IHC – imunohistokemija; immunohistochemistry

KKMŽ – Klinika za kirurgijo in male živali

PBS – fosfatni pufer z NaCl; phosphate buffer saline

PR – progesteronski receptor

sistem **TNM** – T – tumor, N – bezgavke; nodes, M – zasevki; metastases

TBST – Tris-pufer z dodatkom tween(a); Tris-buffered-saline-tween

TMŽ – tumor mlečne žleze

tumorji⁺ – povečano ali močno izražanje celičnega označevalca

tumorji⁻ – šibko izražanje ali brez izražanja celičnega označevalca

UL – Univerza v Ljubljani

VEGF – vaskularni endoteljski rastni dejavnik; vascular endothelial growth factor

VF – Veterinarska fakulteta

WHO – Svetovna zdravstvena organizacija; World Health Organisation

1 UVOD

Tumorji mlečne žleze (TMŽ) pri psicah so najpogostejši tip tumorjev pri nesteriliziranih psicah. V Italijanski raziskavi (Merlo in sod., 2008), kjer so vrednotili deleže različnih tipov tumorjev pri psih, so TMŽ predstavljali 70 % vseh tumorjev, medtem ko je bil v dansi raziskavi (Bronden in sod., 2010) delež 28 % in so bili pogostejši kožni tumorji (43 %). Po poročilu Slegeckx in sod. (2011) v povprečju letno oboli 200 na 100 000 psov.

Opravljene so bile posamezne raziskave prognostičnih dejavnikov za TMŽ pri psicah, medtem ko je področje zdravljenja še precej neraziskano. Ker je bolezen heterogena, se proučujejo povezave med kliničnimi, patohistološkimi in molekularnimi dejavniki, s pomočjo katerih bi lahko napovedali potek ozioroma izid bolezni.

Zadnja leta je pozornost v veliki meri usmerjena k molekularnemu razvrščanju določenemu z metodo DNA-mikromrež. V skupine molekularnega razvrščanja je TMŽ mogoče razvrstiti tudi z določanjem ravni izražanja določenih celičnih označevalcev z imunohistokemičnim označevanjem (ang. immunohistochemistry – IHC). Na podlagi ravni izražanja estrogenkih receptorjev (ER), progesteronskih receptorjev (PR), receptorja za humani epidermalni rastni dejavnik 2 (ang. human epidermal growth factor receptor 2 – HER-2) in bazalnih celičnih označevalcev, je TMŽ pri psicah moč razdeliti na vsaj štiri IHC podtipe; luminalni podtip A, luminalni podtip B, podtip HER-2 in basalni podtip. Tumorji posameznih podtipov se razlikujejo patohistološko in glede na izid bolezni.

O uporabnosti IHC razvrščanja TMŽ pri psicah za napoved prognoze bolezni sta bili opravljeni le dve raziskavi in ugotovitve avtorjev so različne. Redke so tudi raziskave povezav med ravnijo izražanja posameznih celičnih označevalcev ter prognozo bolezni psic s TMŽ. Osnovni namen našega raziskovalnega dela je bil oceniti uporabnost IHC razvrščanja malignih TMŽ pri psicah za napoved prognoze bolezni. Želeli smo preveriti tudi prognostično vrednost posameznih celičnih označevalcev. Preverili smo soodvisnost med različnimi parametri patohistološkega, kliničnega in IHC razvrščanja ter ravnimi izražanja posameznih celičnih označevalcev v malignih TMŽ pri psicah. Ugotavliali smo morebitno povezanost posameznih

parametrov z izidom bolezni in preverili uporabnost kombinirane ocene najmočnejših prognostičnih dejavnikov.

1.1 HIPOTEZE

Z raziskovalno nalogo smo oblikovali naslednje hipoteze:

1. karcinomi bazalnega podtipa TMŽ pri psicah so klinično agresivni in povezani s slabšo prognozo,
2. med karcinomi luminalnega podtipa A je večji delež karcinomov kompleksnega tipa, v skupini karcinomov bazalnega podtipa pa večji delež slabo diferenciranih tumorjev stopnje diferenciacije III,
3. raven izražanja VEGF je v posameznih skupinah imunohistokemičnih podtipov karcinomov mlečne žleze pri psicah različna.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 MORFOLOGIJA MLEČNE ŽLEZE PRI PSICI

Mlečna žleza (*glandula mammae*), pri mesojedih imenovana sesci, je modificirana žleza znojnica. Pri psici je sestavljena iz osem do deset mlečnih kompleksov, ki so parno porazdeljeni vzdolž leve in desne strani spodnjega dela telesa. Sprednja prva para predstavljajo prednji in zadnji prsní mlečni kompleksi, sledijo prednji in zadnji trebušni mlečni kompleksi in en par dimeljskih mlečnih kompleksov (Silver, 1966; Sorenmo in sod., 2011).

K vsakemu mlečnemu kompleksu sodita dva dela: žlezno telo in njegov bradavičasti privesek, sesek (*papilla mammae*). Žlezno telo (*corpus mammae*) sestavljata žlezni parenhim in pripadajoče interparenhimatozno vezivno tkivo (*stroma glandulae mammariae*). Žlezni parenhim je z interlobularnim veznim tkivom razdeljen na režnje (*lobi glandulae mammariae*), z intralobularnim veznim tkivom pa na režnjiče (*lobuli glandulae mammariae*). Intralobularno vezivno tkivo je nežno, z obilo medceličnine in obsežnim spletom (*plexus*) krvnih in limfnih kapilar. Pogosto so prisotne plazmatke in limfociti. Interlobularno vezivno tkivo je obsežno in sestavljeno iz številnih kolagenih vlaken, skozenj potekajo večje krvne in limfne žile (Dellmann in Carithers, 1996; Monteiro – Riviere, 2006; Sorenmo in sod., 2011; Sleeckx in sod., 2011).

Anatomsko je mlečna žleza sestavljena cevasto-mešičkasta (tubulo-alveolarna) žleza. V alveolah (mlečni mešički) (*alveola lactiferi*) poteka izločanje mleka. Združujejo se v grozdaste strukture, ki so med seboj povezane z razvejanim sistemom izvodil (duktov) (*ductus lactiferi*). Alveole pokriva enoskladni enostavni epitelij, katerega višina se skozi spolni ciklus spreminja. Na meji z bazalno membrano je plast mioepitelijskih celic, ki vsebujejo kontraktilne elemente in vplivajo na iztiskanje mleka. Sistem izvodil tvorijo intralobularna izvodila, ki se naprej izlivajo v lobularna izvodila in ti naprej v večje mlekovode režnjev. Intralobularna izvodila pokriva enoskladni enostavni izoprizmatski epitelij, lahko so prisotne mioepitelijske celice. Lobularna izvodila proksimalno pokriva enoskladni enostavni izoprizmatski epitelij, bolj

distalno pa je epitelij sestavljen iz dveh plasti izoprizmatskih celic. V mlekovodih režnjev se dvoskladni izoprizmatski epitelij nadaljuje, obdajajo ga mioepitelijske celice. Na bazi seska se mlekovodi režnjev združijo v mlečno cisterno (*sinus lactiferus*), ki jo pokriva dvoskladni izoprizmatski do visokoprizmatski epitelij. Ločimo seskov del mlečne cisterne (*pars papillaris*) in žlezni del (*pars glandularis*). Seskov del mlečne cisterne se nadaljuje v seskov kanal (*ductus papillaris*), ki prek seskovega ustja (*ostium papillare*) komunicira s površino kože. Seskov kanal pokriva poroženevajoči večskladni ploščati epitelij. Sistemi obročkastih vlaken gladke mišičnine v sluznici tvorijo sfinkter, ki omogoča nadzor nad izločanjem mleka. Pri psici je na konici vsakega seska mogočih osem do dvanajst točkastih odprtin, ki vodijo v prav tako številne seskove kanale in cisterne (Silver, 1966; Rigler, 1992; Dellmann in Carithers, 1996; Monteiro – Riviere, 2006; Sleeckx in sod., 2011; Sorenmo in sod., 2011).

2.1.1 Limfne in krvne žile v mlečni žlezi

V vsakem mlečnem kompleksu se splet limfnih žilic v podkožju združuje v mreže in veče limfne žile, ki vodijo v regionalne bezgavke (*lymphonoduli mammarii*). Limfa prsnih mlečnih kompleksov se steka v podpazdušne bezgavke (*lymphonoduli axillares*); lahko pa se steka tudi v prsne bezgavke (*lymphonoduli pectorales*). Limfa zadnjih trebušnih in dimeljskih mlečnih kompleksov se steka v površinske dimeljske bezgavke (*lymphonoduli inguinales superficiales*), lahko pa se steka tudi v sredinske črevnične in podkolenske bezgavke (*lymphonoduli iliacaies mediales* in *lymphonoduli popliteales*). Limfa sprednjih trebušnih mlečnih kompleksov se steka v podpazdušne in dimeljske bezgavke. Razvejan limfatični in venski sistem mlečnega kompleksa je pomemben pri zasejanju malignih tumorskih celic. Tumorske celice pospešujejo proces nastajanja novih limfnih žil in povezav med njimi, kar spremeni vzorec pretakanja limfe (Pereira in sod., 2003).

Podobno kot limfne žile so za zasejanje malignih TMŽ pomembne krvne žile, predvsem vene. Arterije mlečne žleze potekajo iz zunanje sramne arterije (*arteria pudenda externa*) in iz notranje prsne arterije (*arteria thoracica interna*) ter stranske prsne arterije (*arteria thoracica lateralis*). Istoimenske vene potekajo vzporedno z arterijami. V primerjavi z arterijami manjše vene pogosteje prehajajo iz ene strani telesa na drugo in tvorijo številne prednje-zadnje povezave, kar omogoči zasejanje malignih tumorskih celic v sosednje in nasprotno-stranske

mlečne komplekse (Silver, 1966; Pereira in sod., 2003).

2.1.2 Spolno dozorevanje in brejost

Do prve brejosti ostaja mlečna žleza v infantilnem stanju, s prvo mlečnostjo po skotitvi mladiča pa doseže polno velikost in funkcijo. V času spolnih ciklusov delovanje spolnih hormonov povzroči številne spremembe v zgradbi mlečne žleze (Rehm in sod., 2007). Pri vsakem spolnem ciklu poteka menjavanje proliferacije in apoptoze epitelijskih celic (Santos in sod., 2010b). Iz jajčnikov se sprošča estrogen, ki pospešuje proliferacijo epitelijskih celic v končnih delih izvodil. Z nastopom gravidnosti se zviša koncentracija progesterona, sistem izvodil se močneje razveja in oblikujejo se številne alveole. Prolaktin pospešuje dozorevanje epitelijskih celic v alveolah za proces izločanja mleka. Pri navidezni brejosti so morfološke spremembe v mlečni žlezi podobne, vendar s to razliko, da epitelijске celice v alveolah izločajo manjše količine mleka. Po skotitvi mladičev in končani mlečnosti se mlečna žleza postopoma zmanjša do velikosti pred brejostjo, (Silver, 1966; Sorenmo in sod., 2011). Značilnost involirane (zmanjšane) žleze so izolirani skupki razvejanih izvodil s posameznimi majhnimi alveolami. Vezivnega tkiva je več kot žleznega, pogosto so prisotne maščobne celice, limfociti, plazmatke in majhna, temno obarvana kazeinska telesca (*corpora amylacea*). Vrstna specifičnost psic je dolgo delajoče rumeno telo, ki neodvisno od brejosti sintetizira visoke koncentracije progesterona (Manee-in in sod., 2010; Santos in sod., 2010b; Papa in Hoffmann, 2011).

2.2 ETIOLOGIJA TUMORJEV MLEČNE ŽLEZE PRI PSICAH

Različni dejavniki vplivajo na pojav TMŽ, med drugim so pomembni starost, pasemska in genetska nagnjenost, delovanje spolnih hormonov ter prehrana. Kot najpomembnejša dejavnika tveganja pri psicah se v literaturi navajata starost in vpliv spolnih hormonov (Sorenmo in sod., 2011). Čeprav se TMŽ lahko pojavi pri kateri koli starosti, so najpogostejši pri srednje starih in starejših psicah. Povprečna starost je med 10 in 11 leti (Gobello in Corrada, 2001; Murphy, 2008; Sleeckx in sod. 2011) in je višja pri psicah z malignimi tumorji v primerjavi s psicami z benignimi. Maligni TMŽ se redko pojavijo pri psicah mlajših od pet let.

(Sleecckx in sod., 2011). Starejše psice s TMŽ imajo slabšo prognozo (Sorenmo in sod., 2009).

Ni še povsem jasno, ali so TMŽ pogostejši pri psicah z navidezno brejostjo, čeprav rezultati raziskav nakazujejo, da navidezna brejost ne vpliva na pojav TMŽ (Veronesi in sod., 2003; Sleecckx in sod., 2011). Spol je pomemben dejavnik tveganja, saj se TMŽ zelo redko pojavijo pri samcih (Saba in sod., 2007). Sterilizacija psice predstavlja pomembno preventivo pred nastankom te vrste tumorjev (Martin de las Mulas in sod., 2004; Millanta in sod., 2005; Illera in sod., 2006), vendar je ključno, da se opravi dovolj zgodaj. Če se sterilizacija opravi pred prvim estrusom, je tveganje za nastanek TMŽ le 0,5 %, če se sterilizacija opravi po drugem estrusu, tveganje naraste na 26 % (Gobello in Corrada, 2001; Sleecckx in sod., 2011).

TMŽ se pogosteje pojavljajo pri čistokrvnih psicah kot pri mešancih (Hellmen in sod., 1993; Moe in sod., 2001; Richards in sod., 2001; Sarli in sod., 2002; Itoh in sod., 2005). Posamezne pasme psov; med njimi pudlji, španjeli, setri, poenterji, terierji, maltežani in nemški ovčarji, so bolj nagnjene k nastanku TMŽ (Gobello in Corrada, 2001; Sorenmo, 2003).

Pravilna prehrana prav tako predstavlja pomemben dejavnik pri preprečevanju nastanka TMŽ. Previsoka telesna masa pri enoletnih psicah, ki se ne uravna, je povezana z nepravilnim razvojem mlečne žleze in z večjim tveganjem za pojav TMŽ (Perez Alenza in sod., 1998; Murphy, 2008).

2.3 RAZVRŠČANJE TUMORJEV MLEČNE ŽLEZE PRI PSICAH

Okrog 50 % vseh TMŽ je malignih (Munson in Moresco, 2007; Murphy, 2008). V skoraj 70 % primerov se pri eni psici pojavi več TMŽ (multipli tumorji), ki so v rasti neodvisni drug od drugega in različni v celični zgradbi (Sorenmo in sod., 2009). Vzporedno se lahko pojavijo benigni in maligni tumorji (Misdorp in sod., 1999; Munson in Moresco, 2007; Lopuszynski in sod., 2009). Zaradi zapletenega patohistološkega razvrščanja ter nepredvidljive rasti in razraščanja TMŽ predstavljajo izliv za klinike in patologe. Za postavitev pravilne diagnoze in prognoze bolezni je potrebno dobro sodelovanje klinika in patologa.

2.3.1 Klinična ocena bolezni

TMŽ se najpogosteje pojavljajo na predzadnjih (četrtih) mlečnih kompleksih (zadnji trebušni mlečni kompleksi) in zadnjih (petih) mlečnih kompleksih (dimeljski mlečni kompleksi) (Sorenmo in sod., 2009). Ob hitro rastočih TMŽ pri psicah, ki ulcerirajo in invazivno vraščajo, je prognoza slaba (Hellmen in sod., 1993; Murphy, 2008). Pri zdravljenju TMŽ pri psicah prevladuje kirurška odstranitev tumorjev, medtem ko so ostale oblike zdravljenja redke (Lana in sod., 2007; Murphy, 2008).

2.3.1.1 Klinični stadij

Velikost tumorja je eden najpomembnejših prognostičnih dejavnikov. TMŽ pri psicah, z večim premerom kot pet cm, pogosto zasevajo, medtem ko je prognoza psic s tumorji z manjšim premerom kot tri cm, boljša (Hellmen in sod., 1993; Gobello in Corrada, 2001; Philibert in sod., 2003; Ferreira in sod., 2009; Sleenckx in sod., 2011). Poleg velikosti tumorja ima pomembno prognostično vrednost morebitna prisotnost zasevkov v regionalnih bezgavkah in vraščanje tumorja v limfne ali krvne žile (Yamagami in sod., 1996; Karayannopoulou in sod., 2005).

Klinična ocena bolezni vključuje oceno kliničnega stadija, ki se določi na podlagi podatkov o velikosti tumorja in morebitni prisotnosti zasevkov v regionalnih bezgavkah ali prisotnosti zasevkov v drugih organih (oddaljeni zasevki). Klinični stadij se psicam s TMŽ določi po sistemu TNM (T – tumor; N – bezgavke, ang. nodes; M – zasevki, ang. metastases) na podlagi merit Owen-a (1980) ali spremenjeni različici Lana in sod. (2007). Izvirno razvrščanje po Owen-u (1980) je zahtevnejše; kategoriji T in N sta razdeljeni na podkategorije, ki ocenjujejo stopnjo priraščenosti tumorja oziroma bezgavk na okoliško tkivo. Psice s TMŽ se razdelijo v štiri skupine. Sistem po Lana in sod. (2007) nima podkategorij in loči pet skupin kliničnega stadija. Psice s tumorji brez prisotnih zasevkov razvrsti glede na velikost tumorja od kliničnega stadija I do III. Ob potrjeni prisotnosti zasevkov v regionalnih bezgavkah se psicam določi klinični stadij IV, ob oddaljenih zasevkih se določi klinični stadij V, in sicer ne glede na velikost tumorja (Tabela 1). Pri psicah z multiplih tumorjih se klinični stadij določi na osnovi ocene največjega tumorja oziroma morebitne prisotnosti zasevkov (Lana in sod., 2007).

Tabela 1: Merila za določanje kliničnega stadija po Lana in sod. (2007)

Table 1: Criteria for assessing the clinical stage in accordance with Lana et al (2007)

Merila za določanje kliničnega stadija po Lana in sod. (2007)			
velikost tumorja	zasevki v bezgavkah	oddaljeni zasevki	klinični stadij
< 3 cm	odsotni	odsotni	I
3–5 cm	odsotni	odsotni	II
> 5	odsotni	odsotni	III
katerakoli velikost	prisotni	odsotni	IV
katerakoli velikost	prisotni/odsotni	prisotni	V

2.3.2 Patohistološko razvrščanje

TMŽ pri psicah se patohistološko razvrščajo po sistemu, ki ga je predlagal Misdorp in sod. (1999) in ga je potrdila Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization – WHO) (Tabela 2, levo). Način razvrščanja temelji na načinu, povztem iz humane medicine (Morris, 2010).

90 % vseh TMŽ pri psicah so epitelijski tumorji. Če so epitelijski tumorji benigne narave, jih imenujemo adenomi, če so maligne narave pa karcinomi. Karcinomi invazivno vraščajo v okoliško tkivo; izjema so karcinomi *in situ*. Pri karcinomih *in situ* tumorske celice še niso prebile bazalne membrane in tumorji rastejo ekspanzivno znotraj vezivne kapsule ter pritiskajo na okoliško tkivo. Patohistološko so karcinomi lahko sestavljeni iz enega tipa celic (karcinomi enostavnega tipa) ali iz epitelijskih in mioepitelijskih celic (karcinomi kompleksnega tipa). Karcinomi enostavnega tipa se razraščajo v tubulopapilarnem, solidnem ali anaplastičnem vzorcu rasti. Za enostavne tubulopapilarne karcinome je značilna navzočnost tubulov, v katerih proliferirajoče epitelijske celice oblikujejo prstaste podaljške, ki segajo v svetlico tubulov. Pri solidnem vzorcu rasti je vezivnega tkiva malo. Enostavni solidni karcinomi so gostocelični, tumorske celice rastejo v pasovih ali vozličih. Enostavni anaplastični karcinomi difuzno infiltrativno vraščajo, sestavljajo jih močno pleomorfne tumorske celice. Epitelijske celice karcinomov kompleksnega tipa se razraščajo v tubulopapilarnem ali solidnem vzorcu rasti, medtem ko mioepitelijske celice oblikujejo vrtinčaste ali mrežaste vzorce. Poleg karcinomov *in situ*, karcinomov enostavnega in karcinomov kompleksnega tipa, so poznane nekatere posebne oblike karcinomov.

Vretenastocelični karcinomi so sestavljeni iz epiteljskih tumorskih celic vretenaste oblike. Za ploščatocelične karcinome so značilna področja diferenciacije epiteljskih tumorskih celic v poroženevajoči večskladni ploščati epitelij. V mucinoznih karcinomih je izrazita produkcija mucina. Karcinome, bogate z lipidi, sestavljajo epiteljske tumorske celice z mnogo citoplazme, v kateri so številne vakuole, polne nevtralnih maščobnih kislin (Misdorp in sod., 1999).

V primerjavi z visoko pojavnostjo malignih epiteljskih TMŽ pri psicah, so čisti maligni mezenhimski tumorji (t. i. sarkomi) redki. Pojavljata se fibrosarkom in osteosarkom, medtem ko sta hondrosarkom in liposarkom zelo redka. Fibrosarkom je sestavljen iz fibroblastov in kolagena. Tumorske celice osteosarkoma tvorijo osteoid in/ali pravo kostnino. Pogosteje kot sarkomi se pri psicah pojavlja kombinacija malignih epiteljskih in malignih mezenhimskih celic v t. i. mešanih malignih tumorjih in karcinosarkomih (Misdorp in sod., 1999).

Vnetni karcinom je poseben podtip TMŽ. Pojavlja se redko in je agresiven, hitro rastoč tumor, ki zelo pogosto zaseva. Patohistološko se pojavlja v različnih oblikah, najpogosteje kot anaplastičen karcinom. Označuje ga prisotnost številnih vnetnih in tumorskih celic v razširjenih limfnih žilah kože (Perez Alenza in sod., 2001; Pena in sod., 2003). Klinični znaki prizadetih psic so podobni kot pri mastitisu. Prizadeti mlečni kompleksi so topli in otekli, tumor se navadno difuzno razrašča (Murphy, 2008).

Sarkomi, v primerjavi s karcinomi, pogosteje tvorijo zasevke. Sarkomi navadno zasevajo prek krvožilja, karcinomi prek limfnega obtoka v regionalne bezgavke in naprej v pljuča (Hellmen, 2005). Manj pogosta mesta tvorjenja zasevkov so jetra, kosti, možgani, vranica, ledvice, koža, oko, nadledvični žlezi, maternica, srce, skeletne mišice in trebušna slinavka (Sleeckx in sod., 2011). Najagresivnejše in prognostično najmanj ugodne patohistološke oblike TMŽ psic predstavljajo anaplastični karcinomi, karcinosarkomi in vnetni karcinomi (Hellmen, 2005; Murphy, 2008; Millanta in sod.; 2010).

Po objavljenem patohistološkem razvrščanju TMŽ po Misdorpu in sod. (1999) so bili opisani številni novi patohistološki tipi TMŽ pri psicah. Goldschmidt in sod. (2011) so predlagali nov sistem razvrščanja TMŽ pri psicah (Tabela 2, desno). Oblikovali so štiri skupine: epiteljski karcinomi, karcinomi posebnega tipa, sarkomi in karcinosarkomi. Prvotno skupino

karcinomov enostavnega tipa različnih vzorcev rasti so preoblikovali v tri samostojne skupine. V razvrščanje so vpeljali nove podtipe: kribriforment karcinom enostavnega tipa, komedokarcinom, duktalen karcinom, intraduktalen papilaren karcinom, invaziven mikropapilaren karcinom in maligni mioepiteliom (Goldschmidt in sod., 2011). Pena in sod. (2013) in Rasotto in sod. (2012) so v svojih raziskavah uporabili sistem razvrščanja TMŽ pri psicah po Goldschidtu in sod. (2011). Kljub novo predlaganem razvrščanju je veljaven standard za patohistološko razvrščanje po Misdorpu in sod. (1999).

Tabela 2: Primerjava patohistološkega razvrščanja tumorjev mlečne žleze pri psicah po Misdorpu in sod. (1999) in Goldschmittu in sod. (2011)

Table 2: Comparison of histopathological classification of canine mammary gland tumours according to Misdorp et al (1999) and Goldschmidt et al (2011)

Patohistološko razvrščanje malignih TMŽ pri psicah po Misdorpu in sod. (1999)	Patohistološko razvrščanje malignih TMŽ pri psicah po Goldschmidtu in sod. (2011)
<ol style="list-style-type: none">1. karcinom <i>in situ</i>2. karcinom kompleksnega tipa3. karcinom enostavnega tipa<ol style="list-style-type: none">3.1. tubulopapilaren3.2. soliden3.3. anaplastičen4. poseben tip<ol style="list-style-type: none">4.1. vretenastoceličen4.2. ploščatoceličen4.3. mucinozen4.4. bogati z lipidi5. sarkomi<ol style="list-style-type: none">5.1. fibrosarkom5.2. osteosarkom5.3. ostali sarkomi (hondrosarkomi, liposarkomi)6. karcinosarkom7. karcinom ali sarkom v benignem tumorju	<ol style="list-style-type: none">1. maligni epiteljski tumorji<ol style="list-style-type: none">1.1. karcinom <i>in situ</i>1.2. karcinom enostavnega tipa<ol style="list-style-type: none">1.2.1. tubularen1.2.2. tubulopapilaren1.2.3. cistično-papilaren1.2.4. kribiformen1.3. karcinom – invaziven mikropapilaren1.4. karcinom – soliden1.5. komedokarcinom1.6. anaplastičen karcinom1.7. karcinom v adenomu kompleksnega tipa/mešanem tumorju1.8. karcinom kompleksnega tipa (epiteljski sestavni del je malign, mioepiteljski malign)1.9. karcinom in maligni mioepiteliom (epiteljski in mioepiteljski sestavni del sta maligna)1.10. karcinom – mešani tip (epiteljski sestavni del je malign; mioepiteljski sestavni del je benign; mezenhimski sestavni del tvori hrustanec ali kostnina)1.11. duktalen karcinom1.12. intraduktalen papilaren karcinom2. maligni epiteljski tumorji posebnega tipa<ol style="list-style-type: none">2.1. ploščatoceličen karcinom2.2. žlezni ploščatoceličen karcinom2.3. mucinozen karcinom2.4. z lipidi bogat karcinom2.5. vretenastoceličen karcinom<ol style="list-style-type: none">2.5.1. maligni mioepiteliom2.5.2. ploščatoceličen karcinom – vretenastoceličen2.5.3. karcinom – vretenastoceličen2.6. vneten karcinom3. maligni mezenhimski tumorji – sarkomi<ol style="list-style-type: none">3.1. osteosarkom3.2. hondrosarkom3.3. fibrosarkom3.4. hemangiosarkom3.5. ostali sarkomi4. karcinosarkomi – maligni mešani tumorji

2.3.2.1 Ocena stopnje diferenciacije tumorja

Z uporabo običajnih patohistoloških meril je posamezne primere TMŽ pri psicah težko razvrstiti, saj so mogoče kombinacije različnih tipov celic znotraj istega tumorja (Misdorp in sod., 1999; Hellmen, 2005; Munson in Moresco, 2007). Rezaie in sod. (2009) priporočajo, da se pri patohistološki diagnozi upošteva ocena stopnje diferenciacije tumorja (ang. histological grade). Pri TMŽ pri ženskah se za oceno stopnje diferenciacije tumorjev najpogosteje uporablja modificirana metoda po Nottinghamu, avtorjev Elston in Ellis (1991) (Rakha in sod., 2008). Metoda združuje oceno stopnje navzočnosti tubulov, pleomorfnosti tumorskih celic in njihovih jader ter oceno stopnje proliferacije z določanjem števila mitoz. Tumorji se ocenijo s stopnjo diferenciacije od I do III (Tabela 3). Tumorji stopnje diferenciacije I so dobro diferencirani, tumorji stopnje diferenciacije II zmerno, medtem ko je diferenciranost tumorjev stopnje diferenciacije III slaba. Metodo Elstona in Ellisa so uporabili mnogi avtorji za ocenjevanje TMŽ pri psicah (Karayannopoulou in sod., 2005; Rezaie in sod., 2009; Clemente in sod., 2010; Santos in sod., 2010a; Manuali in sod., 2012). Karayannopoulou in sod. (2005) in Pena in sod. (2013) so dokazali prognostično vrednost ocene.

Tabela 3: Merila za ocenjevanje stopnje diferenciacije malignih tumorjev mlečne žleze po Elstonu in Ellisu (1991)

Table 3: Criteria for assessing the histological grade of malignant mammary gland tumours in accordance with Elston and Ellis (1991)

Merila za ocenjevanje stopnje diferenciacije po Elstonu in Ellisu (1991)	
Navzočnost tubulov	Točkovanje
> 75 %	1
10 do 75 %	2
< 10 %	3
Pleomorfizem jader	
majhna jedra, enakih oblik	1
zmerna odstopanja v velikosti in obliki jader	2
močna odstopanja v velikosti in obliki jader	3
Število mitoz	
0 – 9	1
10 – 19	2
> 20	3
stopnja diferenciacije	skupno št. točk
I	3 – 5
II	6 – 7
III	8 – 9

2.4 RAZVRŠČANJE NA PODLAGI RAVNI IZRAŽANJA POSAMEZNIH CELIČNIH OZNAČEVALCEV

Z določanjem ravni izražanja celičnih označevalcev ER, PR in HER-2 lahko TMŽ razdelimo na tri različne IHC podtipe; luminalni podtip A, luminalni podtip B in podtip HER-2. Tumorji luminalnega podtipa A povečano ali močno izražajo ER (tumorji ER⁺) in/ali PR (tumorji PR⁺) ter šibko izražajo ali ne izražajo HER-2 (tumorji HER-2⁻). Tumorji luminalnega podtipa B so ER⁺ in/ali PR⁺ ter povečano ali močno izražajo (tumorji HER-2⁺). Tumorji podtipa HER-2 šibko izražajo ali ne izražajo ER (tumorji ER⁻) in PR (tumorji PR⁻) ter so HER-2⁺ (Sassi in sod., 2010). Tumorje ER⁻, PR⁻ in HER-2⁻ imenujemo trojno negativni tumorji (Rakha in Ellis, 2009). Z določanjem izražanja ravni celičnih označevalcev bazalnih keratinov lahko v skupini trojno negativnih tumorjev določimo tiste z bazalnim fenotipom. Od 50 do 80 % trojno negativnih tumorjev izraža bazalne keratine in so bazalnega podtipa (Carey in sod., 2006; Bertucci in sod., 2008; Cheang in sod., 2008). V tumorskih celicah bazalnega podtipa se najpogosteje izražajo keratin 5/6, keratin 14 in keratin 17 (Kim in sod., 2006; Livasy in sod., 2006; Haupt in sod., 2010). Poleg bazalnih keratinov se vimentin ocenjuje kot uporaben celični označevalec za tumorje bazalnega podtipa (Rodriguez - Pinilla, 2006; Chen in sod., 2008; Kusinska in sod., 2009; Sousa in sod., 2010).

Razvrščanje TMŽ z določanjem ravni izražanja celičnih označevalcev ER, PR, HER-2 in bazalnih celičnih označevalcev izhaja iz molekularnega razvrščanja TMŽ pri ženskah z metodo DNAmikromrež. Pionirji na tem področju so Perou in sod. (2000), sledile so številne podobne raziskave, ki so na molekularni ravni potrdile raznolikost TMŽ pri ženskah (Sorlie in sod., 2001; Sorlie in sod., 2003; Hu in sod., 2006; Reis - Filho in sod., 2006; Parker in sod., 2009). Molekularni podtipi TMŽ pri ženskah se poimenujejo glede na različne vzorce izražanja genov v tumorjih. Vzorec izražanja genov bazalnega podtipa tumorjev je podoben vzorcu izražanja genov bazalne mioepitelijske celice mlečne žleze, medtem ko je vzorec izražanja genov luminalnega podtipa tumorjev podoben vzorcu izražanja genov luminalne epitelijske celice mlečne žleze (Wetzel in sod., 1989; Sorlie in sod., 2003; Sotiriou in sod., 2003; Rakha in sod., 2007).

2.4.1 Prognostična vrednost imunohistokemičnega razvrščanja

Na malignih TMŽ pri psicah sta bili do sedaj opravljeni dve raziskavi, kjer so proučevali prognostično vrednost razvrščanja tumorjev, določenega na podlagi ravni izražanja celičnih označevalcev (IHC razvrščanje) (Gama in sod., 2008; Sassi in sod. 2010). Velikost vzorca preiskanih tumorjev je bila v obeh raziskavah različna; Gama in sod. (2008) so v raziskavi obravnavali 102 maligna TMŽ, Sassi in sod. (2010) pa 45 malignih TMŽ. Avtorji so uporabili različen nabor celičnih označevalcev. Gama in sod. (2008) so za določanje luminalnih podtipov uporabili ER in HER-2, medtem ko so Sassi in sod. (2010) uporabili tudi PR. Različen je bil tudi nabor celičnih označevalcev za določanje bazalnega podtipa tumorjev. Gama in sod. (2008) so uporabili keratin 5, p63 in P-kadherin, Sassi in sod. (2010) pa keratin 5/6 in keratin 14. Gama in sod. (2008) so na podlagi ravni izražanja posameznih celičnih označevalcev tumorje razdelili na luminalni podtip A, luminalni podtip B, podtip HER-2 in basalni podtip. V raziskavi Sassi in sod. (2010) niso dokazali podtipa HER-2. V obeh raziskavah so bili tumorji luminalnega podtipa A dobro diferencirani, čeprav so bili v raziskavi Sassi in sod. (2010) dobro diferencirani tudi tumorji bazalnega podtipa. Gama in sod. (2008) so ugotovili močno statistično značilno povezavo med IHC podtipi tumorjev in stopnjo diferenciacije. Vsi tumorji stopnje diferenciacije I so bili luminalnega podtipa A. Nasprotno je bilo v raziskavi Sassi in sod. (2010) 60 % vseh tumorjev bazalnega podtipa dobro diferenciranih s stopnjo diferenciacije I. Podobno nasprotuječ so si rezultati o prognostični vrednosti IHC razvrščanja TMŽ pri psicah. Gama in sod. (2008) so ugotovili statistično značilno krajše preživetje psic s tumorji bazalnega podtipa. Sassi in sod. (2010) niso ugotovili statistično značilne povezave med preživetjem psic z različnimi IHC podtipi tumorjev, rezultati njihove raziskave pa nakazujejo na najboljši izid bolezni pri psicah s tumorji bazalnega podtipa.

Beha in sod. (2012a) so iskali povezave med IHC podtipi primarnih TMŽ pri psicah in IHC podtipi njihovih zasevkov. Zaradi nizkega števila podatkov o preživetju, povezave med IHC podtipi in prognozo bolezni niso statistično ovrednotili. TMŽ vseh petih psic, ki so preživele obdobje dveh let po kirurški odstranitvi tumorjev, so bili luminalnega podtipa A in B, medtem ko so bili TMŽ piginulih psic podtipa HER-2 oziroma basalnega podtipa.

IHC razvrščanje je bilo uporabljeno tudi v raziskavi Ribeiro in sod. (2012), kjer so proučevali morfološke značilnosti in IHC profil karcinomov v benignih mešanih TMŽ pri psicah. Avtorji niso dokazali povezave med patohistološkimi značilnostmi in IHC podtipi tumorjev.

2.5 ESTROGENSKI IN PROGESTERONSKI RECEPTORJI

Estrogen in progesteron sta nujno potrebna za normalen razvoj mlečne žleze (Watson in Khaled, 2008; Chandra in sod., 2010). V celicah mlečne žleze, ki izražajo ER oziroma PR, estrogen in progesteron pospešujejo njihovo proliferacijo (Rosen, 2003; Stingl, 2011; Platet in sod., 2004). Estrogen pospešuje razvoj in oblikovanje izvodil mlečne žleze (Anderson in Clarke, 2004; Basu in Rowan, 2005), medtem ko progesteron uravnava razvoj alveol (Manee-in in sod., 2010).

2.5.1 Zgradba in delovanje estrogenskih receptorjev

ER spadajo v družino jedrnih receptorjev, ki delujejo kot transkripcijski dejavniki. Aktivirajo se ob vezavi estrogena in z vezavo na DNA urejajo prepisovanje tarčnih genov, ki imajo v svojem zaporedju na estrogen odzivne elemente (Kumar in sod., 2011). Ločimo dva tipa ER; ER α in ER β , ki ju kodirata dva različna gena. Estrogen se z enako afiniteto veže na oba receptorja. Razporeditev in signalizacija ER α in ER β je tkivno specifična (Weihua in sod., 2003; Kumar in sod., 2011). Domene molekule ER označujemo od A do F. Mesto vezave na DNA je na centralni domeni C. Domena E vsebuje mesto, kamor se veže estrogen in koregulatorni proteini (Lovšin Barle, 2004; Hall in McDonnell, 2005; Heldring in sod., 2007).

Ločimo dve poti aktivacije ER; klasično in alternativno. Pri klasični poti estrogen prehaja prek membrane celic, vstopi v jedro in se veže na jedrni ER. Vezava povzroči dimerizacijo receptorja in ER postane dovezetnejši za vezavo koregulatornih proteinov (koaktivatorji ali korepresorji) na promotorsko mesto in za vezavo na DNA (Basu in Rowan, 2005; Kumar in sod., 2011). V primerjavi z daljšo klasično potjo aktivacije so učinki alternativne poti aktivacije hipni. Alternativna pot je vezana na membranski ER, ki predstavlja na amino koncu molekule krajšo obliko jedrnega ER (Heldring in sod., 2007; Levin, 2009; Kim in sod., 2011b). Alternativna pot je kompleksna (Barton, 2012).

2.5.2 Zgradba in delovanje progesteronskih receptorjev

Pri sesalcih sta poznani dve izobliki PR; PRA in PRB, ki ju kodira isti gen. Dve različni obliki PR sta posledica prepisovanja gena iz različnih promotorjev in začetnih kodonov. Razlikujeta se v tem, da PR-B vsebuje dodatno zaporedje aminokiselin na amino koncu molekule (Connely in sod., 2003; Gadkar - Sable in sod., 2005). Molekula PR je sestavljena iz različnih domen. Regija C predstavlja mesto vezave na DNA (Connely in sod., 2003).

Klasična pot aktivacije PR je podobna klasični poti aktivacije ER. Ob vezavi progesterona na jedrni PR pride do dimerizacije receptorja, kar omogoči vezavo na DNA. Veže se na progesteron odzivne elemente znotraj promotorskega mesta tarčnih genov. Poleg klasične poti aktivacije lahko signalizacija PR, podobno kot pri ER, poteka prek alternativnih poti aktivacije (Connely in sod., 2003; Gellersen in sod., 2009).

2.5.3 Vpliv na razvoj tumorjev mlečne žleze

Estrogen pomembno vpliva na nastanek in napredovanje TMŽ. ER α predstavlja ključni dejavnik prepisovanja, medtem ko vloga ER β še ni povsem razjasnjena (Mann in sod., 2011; Murphy in Leygue, 2012). V TMŽ estrogen prek ER pospešuje prepisovanje proteinov, ki delujejo kot rastni dejavniki (Mady in sod., 2000; Platet in sod., 2004). Estrogen kot pospeševalec proliferacije zviša število celic, ki so hkrati v fazi delitve. Poveča se tveganje za nastanek napak v času podvojevanja DNA in s tem mutacij, ki lahko povzročijo motnje v celičnem ciklusu, apoptozi in popravilu DNA. V tumorskih celicah je v primerjavi s fiziološkimi celicami mlečne žleze signalizacija ER in občutljivost celic na delovanje estrogena spremenjena. V začetni fazi je rast tumorja odvisna od prisotnosti spolnih hormonov. Z napredovanjem tumorske celice ne izražajo več ER in njihova rast postane neodvisna od delovanja spolnih hormonov (Rosen, 2003; Clarke in sod., 2004; Basu in Rowan, 2005).

Ob pospeševanju proliferacije ER in PR sodelujejo tudi v nekaterih drugih procesih rasti tumorja; med drugim pri procesu razraščanja novih krvnih žil in gibljivosti celic (Platet in sod., 2004). Estrogen in progesteron vplivata na proces angiogeneze direktno s pospeševanjem proliferacije endotelijskih celic ali pa indirektno z uravnavanjem izražanja VEGF (Dabrosin in sod., 2005; Liang in Hyder, 2005; Hyder, 2006; Applanat in sod., 2008). Estrogen in

progesteron s skupnim delovanjem intenzivneje pospešuje proces angiogeneze (Dabrosin in sod., 2005). PR v TMŽ pospešuje gibljivost in invazivnost tumorskih celic (Xiao-Dong in sod., 2010). ER pospešujejo gibljivost celic prek uravnavanja delovanja različnih proteinov, ki povzročijo hitro preoblikovanje aktinskih filamentov (Giretti in Simoncini, 2008).

2.5.4 Izražanje v tumorjih mlečne žleze

Številne raziskave so dokazale, da se ER v posameznih patohistoloških tipih TMŽ pri psicah različno izražajo (Martin de las Mulas in sod., 2005; Millanta in sod., 2005; Manee-in in sod., 2009). V primerjavi z normalnim tkivom in tumorji je raven izražanja ER najvišja v hiperplastičnem tkivu (Millanta in sod., 2005). V malignih TMŽ pri psicah so ER pogosteje izraženi v karcinomih kompleksnega tipa in v tubulopapilarnih karcinomih, nizke stopnje diferenciacije in pri psicah brez prisotnih zasevkov v regionalnih bezgavkah ali oddaljenih zasevkov, nižjega kliničnega stadija (Martin de las Mulas in sod., 2005; Millanta in sod., 2005; Chang in sod., 2009). Pri psicah s tumorji ER⁻ obstaja večja verjetnost pojava zasevkov v regionalnih bezgavkah in višja je tudi smrtnost (Martin de las Mulas in sod., 2005; Millanta in sod., 2005). Nieto in sod. (2000) so v svoji raziskavi ugotovili, da je raven izražanja ER v malignih TMŽ višja pri psicah, pri katerih je bila v preteklosti diagnosticirana navidezna brejost. Dokazana je povezava med starostjo in ravnijo izražanja ER; ER so pogosteje izraženi v TMŽ pri mlajših psicah (Martin de las Mulas in sod., 2005).

Zaradi podobnih mehanizmov delovanja je vzorec izražanja ER in PR v tkivu mlečne žleze pri psicah podoben (Manee-in in sod., 2010). Podoben je tudi njun vzorec izražanja v TMŽ. PR je v malignih TMŽ pri psicah prav tako pogosteje izražen v karcinomih kompleksnega tipa nizke stopnje diferenciacije in v tumorjih psic nižjega kliničnega stadija (Martin de las Mulas in sod., 2005). Chang s sod. (2009) in Millanta s sod. (2005) so ugotovili krajše preživetje psic s tumorji PR⁻ v primerjavi s psicami s tumorji PR⁺.

2.6 RECEPTOR ZA HUMANI EPIDERMALNI RASTNI DEJAVNIK 2

HER-2 deluje v procesih proliferacije celic mlečne žleze v času spolnega dozorevanja in poznejši diferenciaciji. V času spolnega dozorevanja je HER-2 najintenzivneje izražen v celicah

izvodil in alveol mlečne žleze. Tam uravnava proces vejičenja izvodil in oblikovanje alveol. V pozni brejosti in v obdobju mlečnosti je raven izražanja HER-2 v mlečni žlezi nizka (Jones in Stern, 1999; Andrechek in sod., 2005). Signalizacijske poti ER in HER receptorjev so povezane. V času spolnega dozorevanja spolni hormoni uravnavajo sintezo in aktivacijo HER-2 (Stern, 2008).

2.6.1 Zgradba in delovanje

HER-2 spada med receptorje za epidermalne rastne dejavnike (ang. Human Epidermal growth factor Receptor – HER), ki so membranski receptorji s tirozin-kinazno aktivnostjo. Ločimo štiri tipe HER, ki jih označujemo od 1 do 4. Molekulo HER-2 sestavlja izvencelična domena na amino koncu, enojna transmembranska vijačnica, tirozin-kinazna domena in znotrajcelična regulatorna domena (Park in sod., 2008; Gutierrez in Schiff, 2011).

Poznanih je več kot deset različnih ligandov, ki se vežejo na HER. Na HER-2 se ligandi ne vežejo in protein se aktivira tako, da tvori homodimere ali heterodimere z drugimi HER. Kompleks HER-2/HER-3 predstavlja heterodimer z največjo katalitično aktivnostjo. Poleg vezave s predstavniki HER, HER-2 lahko tvori komplekse z nekaterimi drugimi membranskimi receptorji (Park in sod., 2008; Gutierrez in Schiff, 2011). Vezava liganda na izvencelično domeno povzroči dimerizacijo HER in transfosforilacijo znotrajcelične domene. Fosforilacija privlači specifične signalne molekule, ki se vežejo na tirozin-kinazno domeno. Aktivirajo se kinaze v celici, ki signaliziranje HER-2 prenesejo v jedro. V jedru signalizacija uravnavata prepisovanje genov, ki uravnavajo proliferacijo in diferenciacijo celic in proces razraščanja novih krvnih žil (Park in sod., 2008; Gutierrez in Schiff, 2011).

2.6.2 Vpliv na razvoj tumorjev mlečne žleze

Vpliv HER-2 na rast in zasejanje tumorja je odvisen od tvorjenja homo- ali hetero-dimerov ob aktivaciji proteina in katere signalizacijske poti se posledično sprožijo (Hardy in sod., 2010). HER-2 z uravnavanjem kontrolnih točk celičnega ciklusa v TMŽ pospešuje proliferacijo in zavira apoptozo. Motnje v nadzoru celičnega ciklusa, še posebej kontrolne točke G1/S (faza rasti celice/faza podvajanja DNA), vodijo v nenadzorovano proliferacijo celic (Moasser, 2007;

Park in sod., 2009). S pospeševanjem izražanja VEGF HER-2 vpliva na procese razraščanja novih krvnih žil (Pietras, 2003; Menard, 2004; Park in sod., 2009). Z uravnavanjem signalizacije integrinov, fokalne adhezije celic in delovanja aktinskega citoskeleta HER-2 pomembno vpliva na gibljivost in širjenje tumorskih celic v druge organe (Moasser, 2007; Browne in sod., 2009).

Onkogeno delovanje HER-2 v TMŽ pri psicah še ni povsem razjasnjeno. Murua Escobar in sod. (2001) so ugotovili, da gen, ki kodira HER-2, leži na delu kromosoma, kjer so pogoste mutacije. Martin de las Mulas in sod. (2003) tega niso potrdili, medtem ko rezultati njihove raziskave kažejo, da se v posameznih TMŽ pri psicah HER-2 povečano ali močno izraža brez prisotnosti več kopij gena. Hsu in sod. (2009) so na delu kromosoma, ki kodira HER-2 potrdili le tihe mutacije.

2.6.3 Izražanje v tumorjih mlečne žleze

Tumorji HER-2⁺ predstavljajo 18 do 30 % vseh malignih TMŽ pri psicah (Kim in sod., 2011). Rezultati raziskav izražanja HER-2 v TMŽ pri psicah si nasprotujejo. Martin de las Mulas in sod. (2003) so ugotovili močnejše izražanje HER-2 v malignih TMŽ psic in nasprotno so Rungsipipat in sod. (2008) ugotovili močnejše izražanje HER-2 v benignih tumorjih. Dutra in sod. (2004) so ugotovili različno raven izražanja HER-2 v TMŽ pri psicah različnih stopenj diferenciacije. Hsu in sod. (2009) so ugotovili, da je preživetje psic z malignimi TMŽ HER-2⁺ v dveh letih po kirurški odstranitvi tumorjev daljše, kot pa pri psicah s tumorji HER-2⁻.

2.7 BAZALNI KERATINI IN VIMENTIN

Ločimo tri tipe nitastih struktur; aktinske filamente, mikrotubule in intermediarne filamente. Intermediarni filamenti so po obliki gladke, dolge, nerazvezjane niti, ki se razpostrirajo po vsej citoplazmi (Jezernik in sod., 2012). Keratini sestavljajo intermedirane filamente specifične za epiteljske celice. V različnih epitelijskih celicah so različni keratini, njihova pojavnost odraža stopnjo diferenciranosti in funkcionalno specifičnost celice. Keratini omogočajo mehansko oporo in pomembno sodelujejo pri številnih drugih procesih v celici; med drugim pri prenosu različnih snovi znotraj celičnih organel, gibljivosti celice, signalizaciji, imunskemu odzivu in

preživetju celice. Ločimo keratine tipa I ali kisle keratine in keratine tipa II, ki so nevtralni ali bazični. Keratin 14 sodi med keratine tipa I, keratina 5 in 6 pa med keratine tipa II (Schweizer in sod., 2006; Windoffer in sod., 2011; Jezernik in sod., 2012).

V skupino III sodijo vimentin in njemu sorodni polipeptidi. Vimentin je med vrstami najbolj ohranjen intermediaren filament tipa III. Izraža se v fibroblastih, gladkih mišičnih celicah in levkocitih. Tako kot intermediarni filamenti tipa I in II vimentin vzdržuje strukturo celice in sodeluje v mnogih drugih procesih (Satelli in Li, 2011).

2.7.1 Pomen izražanja keratina 5/6, keratina 14 in vimentina v tumorjih mlečne žleze

V mlečni žlezi pri psicah se keratin 14 izraža v bazalni mioepitelijski celici (Beha in sod., 2012b). Vimentin se izraža v fibroblastih in endotelijskih celicah vezivnega tkiva mlečne žleze, medtem ko so rezultati raziskav izražanja vimentina v bazalni mioepitelijski celici nasprotujejo (Hellmen in Lindgren, 1989; Vos in sod., 1993).

Raziskave ravni izražanja keratina 5/6, keratina 14 in vimentina v TMŽ pri psicah so maloštevilne. V dveh starejših raziskavah so avtorji ugotovili, da se vimentin v malignih TMŽ pri psicah izraža tudi v določenem deležu epitelijskih tumorskih celic (Hellmen in Lindgren, 1989; Vos in sod. 1993). Ramalho in sod. (2005) so proučevali izvor mešanih TMŽ pri psicah in keratin 5 se je izražal v mioepitelijskih in bazalnih epitelijskih celicah. Avtorji menijo, da to nakazuje na izvor epitelijске in mioepitelijске komponente mešanih TMŽ pri psicah iz skupne bipotentne prednike celice, ki izraža keratin 5. Beha in sod. (2012b) so ugotovili, da se keratin 5/6 in 14 slabše izražata v proliferirajočih mioepitelijskih celicah, medtem ko je njuno izražanje povsem odsotno v mioepitelijskih celicah vretenaste in zvezdaste oblike, ki pa izražajo vimentin.

2.8 VASKULARNI ENDOTELIJSKI RASTNI DEJAVNIK

Aktivacija vaskularnega endotelijskega rastnega dejavnika (ang. vascular endothelial growth factor – VEGF) predstavlja mejni korak v procesu angiogeneze (Ferrara, 2002; Bergers in Benjamin, 2003). Angiogeneza je proces brstenja novih kapilar iz že obstoječih krvnih žil in

njihovo vraščanje v predhodno neožiljena tkiva (Carmeliet, 2005; Raica in sod., 2009). Angiogeneza pripomore k napredovanju in zasejanju tumorja, saj rast tumorskih celic postane neodvisna od oskrbe prek okoliškega tkiva, iz katerega tumor izvira (Ferrara, 2002; Carmeliet, 2005). Tkivo tumorja je neožiljeno vse dokler ne doseže velikosti premera ena do dva mm. Do te velikosti se tumorske celice oskrbujejo prek difuzije iz okoliškega tkiva (Correa de Sampaio in sod., 2012). Maligne celice z izločanjem angiogenih dejavnikov nenehno stimulirajo celice vezivnega tkiva in celice krvnih žil okoliškega tkiva, kar povzroči intenzivno brstenje okoliškega žilja in vraščanje novo nastalih brstov v tkivo tumorja (Bergers in Benjamin, 2003; Bhat in Singh, 2008; Rapisarda in Melillo, 2012).

2.8.1 Zgradba in delovanje

Gen za VEGF je dobro ohranjen med posameznimi živalskimi vrstami. Pri sesalcih ločimo pet predstavnikov VEGF: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD in rastni dejavnik placente. Vsi so polipeptidi, sestavljeni iz dveh homolognih dimerov. Dejavnički so si različni v molekularni zgradbi; različici VEGFA in VEGFB nastajata v procesu alternativnega spenjanja eksonov, različice VEGFC, VEGFD in rastni dejavnik placente pa pri procesiranju (Yamazaki in Morita, 2006; Grunewald in sod., 2010). VEGF delujejo prek treh receptorjev; VEGFR1, VEGFR2 in VEGFR3, na katere se vežejo z različno afiniteto (Koch in Claesson - Welsh, 2012).

VEGFA predstavlja dejavnik z najmočnejšo angiogeno aktivnostjo. Sintetizira se v celicah parenhimskih organov in je nujen za normalen razvoj krvožilja. Ob vezavi na VEGFR2 pospešuje proliferacijo, gibljivost in propustnost endotelijskih celic. VEGFR1 deluje kot zaviralec angiogenih učinkov. Ob vezavi VEGFA na VEGFR1 se zmanjša razpoložljivost tega dejavnika za VEGFR2 (Lee in sod., 2007; Koch in Claesson - Welsh, 2012).

2.8.2 Izražanje v tumorjih mlečne žleze

Pri psicah je izražanje VEGF močnejše v malignih, slabo diferenciranih TMŽ (Restucci in sod. 2002; Qiu in sod., 2008; Queiroga in sod., 2011a; Al - Dissi in sod., 2010; Millanta in sod., 2010). Qiu in sod. (2008) menijo, da raven izražanja VEGF v TMŽ pri psicah predstavlja pomemben prognostičen dejavnik.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZBOR ŽIVALI IN ZBIRANJE KLINIČNIH PODATKOV

V raziskavo smo vključili 72 psic, katerim so med leti 2003 in 2010 na Kliniki za kirurgijo in male živali (KKMŽ) Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani (VF UL) odstranili TMŽ. Vzorce tumorjev smo izbrali med arhivskimi vzorci Inštituta za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo (IPSVU) VF UL.

Na podlagi podatkov o velikosti tumorjev ter morebitni prisotnosti zasevkov so kirurji tumorje razvrstili po sistemu TNM in psicam določili klinični stadij od I – V (Lana in sod., 2007) (Tabela 1). Pri multiplih tumorjih so psicam klinični stadij določili na podlagi tumorja z največjim premerom oziroma na podlagi prisotnih zasevkov (Sorenmo in sod., 2011). Psice so bile zdravljene le kirurško, brez dodatnega zdravljenja.

Na KKMŽ VF smo iz kliničnih kartotek zbrali klinične podatke o pasmi, starosti, steriliziranosti psic, mestu tumorjev in morebitni zgodovini navidezne brejosti psic. Če so podatki manjkali, smo opravili telefonski pogovor z lastniki psov ali jim po pošti poslali vprašalnik (Priloga 1). Zanimalo nas je preživetje psic v času dveh let (730 dni) po kirurški odstranitvi tumorjev. Ugotavljalni smo preživetje, pigin zaradi TMŽ, pigin zaradi drugega vzroka in ponoven pojav bolezni.

Pri psicah s TMŽ je bil pred kirurškim posegom opravljen rentgenski pregled prsnega koša (dve laterolateralni projekciji in dorzoventralna) zaradi ugotavljanja morebitne prisotnosti zasevkov v pljučih. Lastnikom psov je bil priporočen kontrolni rentgenski pregled tri mesece in šest mesecev po opravljenem kirurškem posegu in nato enkrat na leto. Ob potrjenih zasevkih v regionalnih bezgavkah se je kontrolni rentgenski pregled priporočal en mesec po opravljenem kirurškem posegu. Ugotovitve ob opravljenem rentgenskem pregledu so bile zapisane v klinično kartoteko psic.

3.2 OBDELAVA TKIV IN PATHOHISTOLOŠKA PREISKAVA

TMŽ so bili takoj po kirurški odstranitvi prenešeni v 10 % puferiran formalin. Čas fiksacije v formalinu se je razlikoval med posameznimi tumorji. Fiksacija je potekala od 24 ur do nekaj dni. Vzorci so bili impregnirani s parafinom z aparaturo HypercenterXP (Shandon[®]), manjši tumorji so bili impregnirani v celoti, pri večjih tumorjih so bili izbrani reprezentativni vzorci tkiva. Parafinski bloki so bili izdelani na aparaturi HistoCenter (Shandon[®]). Z drsnim mikrotomom (Leica[®]) so bile narezane tkivne rezine debeline 4 µm. Barvanje s hematoksilinom in eozinom (HE) je bilo izvedeno po standardnem postopku IPSUV VF UL. V aparaturi Varistain (Shandon[®]) so se tkivne rezine deparafinizirale v ksilolu in padajoči vrsti alkoholov, pobarvale s HE in končno dehidrirale v naraščajoči vrsti alkoholov. Postopek barvanja se je končal z bistrenjem v ksilolu. Pobarvane tkivne rezine so bile pokrite s sintetično smolo in pokravnim stekelcem.

Za vsak tumor je bila v okviru redne diagnostike na IPSUV VF UL opravljena patohistološka diagnostika na osnovi merit WHO (Misdorp in sod., 1999) (Tabela 2, levo). Patohistološko diagnozo je dodatno potrdil drugi patohistolog. V raziskavo smo vključili le maligne TMŽ, ki so bili psicam kirurško odstranjeni na KKMŽ VF UL med leti 2003 in 2010.

Poleg patohistološke diagnostike smo vsem karcinomom enostavnega, kompleksnega in posebnega tipa določili stopnjo diferenciacije. Na osnovi merit, ki sta jih opredelila Elston in Ellis (1991), smo tumorje razdelili na dobro diferencirane (stopnja diferenciacije I), zmerno diferencirane (stopnja diferenciacije II) in slabo diferencirane (stopnja diferenciacije III). S točkami od ena do tri smo ocenjevali navzočnost tubulov, pleomorfizem jeder in število mitoz. Navzočnost tubulov smo ocenili z 1 v primeru, ko je tumor sestavljal manj kot 10 % tubulov, z 2 v primeru, ko je bilo tubulov 10 do 75 % in z 3 v primeru, ko je bilo tubulov več kot 75 %. Pri tumorjih kompleksnega tipa smo navzočnost tubulov ocenjevali le v področjih z epiteljskimi celicami. Pleomorfizem jeder smo glede na intenzivnost ocenili z 1 ob blagem pleomorfizmu, z 2 ob zmernem pleomorfizmu in z 3 ob močnem pleomorfizmu. Mitoze smo šteli na desetih izbranih poljih pod 400-kratno povečavo in tumorje ocenili z 1 v primeru 0–9 mitoz, z 2 v primeru 10–19 mitoz in z 3 v primeru, ko je bilo preštetih mitoz več kot 20. Točke ocenjevanja posameznega merila smo med seboj sešteli in glede na doseženo vsoto določili

stopnjo diferenciacije; stopnjo diferenciacije I smo določili ob 3–5 skupnih točkah, stopnjo diferenciacije II ob 6–7 skupnih točkah in stopnjo diferenciacije III ob 8–9 skupnih točkah (Tabela 3). Stopnjo diferenciacije je dodatno potrdil še drugi patohistolog.

3.3 IMUНОHISTОKЕMIČNE PREISKAVE

Vse IHC preiskave smo izvedli na parafinskih tkivnih rezinah debeline 4 µm, ki smo jih prenesli na objektna stekelca, prevlečena s 3-aminopropiltretoksilanom (APTES) in jih nato skozi noč sušili v termostatu pri temperaturi 50° C. Tkvne rezine smo pred IHC označevanjem deparafinizirali v aparaturi Varistain (Shandon®).

Pri IHC preiskavah smo v protokol vključili postopek razkrivanja antiga. Uporabljeni so bili različno dolgi časovni intervali razkrivanja v različnih pufrih (Tabela 7). Vsa IHC označevanja smo izvedli z vizualizacijskim kitom Dako REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako, kat. št. K5007). Vizualizacijski kit vsebuje sekundarna kozja protitelesa proti kunčjim in mišjim imunoglobulinom, konjugirana s polimerom, označenim s hrenovo peroksidazo (steklenička A) ter pufer (Substrate Buffer – steklenička B) in kromogen (3-diaminobenzidin (DAB) + Chromogen – steklenička C) za pripravo raztopine barvnega substrata. Raztopino barvnega substrata smo pripravili pred uporabo tako, da smo v pufer dodali kromogen v razmerju 1 ml pufra in 20 µl kromogena. Kot izpiralni pufer smo uporabili Tris-pufer z dodatkom tween-a (ang. Tris-buffered-saline-tween – TBST) pH 7,5, ki smo ga pripravili tako, da smo osnovno raztopino redčili z destilitrano vodo v razmerju 1 : 9 in na 1 L delovne raztopine dodali 5 ml detergenta Tween 20 (polisorbat 20). Za spiranje in bistrenje s hematoksilinom kontrastiranih rezin smo uporabili fosfatni pufer z NaCl (angl. phosphate buffer saline – PBS) s pH 7,2.

IHC označevanja smo izvedli po naslednjem postopku:

1. Deparafinizacija tkivnih rezin do vode.
2. Razkrivanje antiga.
3. Hlajenje tkivnih rezin najmanj 20 min.
4. Spiranje v izpiralnem pufru.

5. Inhibicija endogene peroksidaze v Peroxidase-Blocking Solution, Dako REAL™ (Dako, kataloška oznaka S2023), 30 min.
6. Spiranje v izpiralnem pufru.
7. Inkubacija s primarnimi protitelesi, redčenimi z redčilom za protitelesa DAKO Cytomatin Antibody Diluent (Dako, kataloška oznaka S2022).
8. Spiranje v izpiralnem pufru.
9. Inkubacija v sekundarnih protitelesih iz vizualizacijskega kita Dako REAL™ (steklenička A).
10. Spiranje v izpiralnem pufru.
11. Inkubacija v delovni raztopini barvnega substrata z DAB na sobni temperaturi.
12. Spiranje s tekočo vodo.
13. Spiranje z destilirano vodo.
14. Kontrastiranje z Mayerjevim hematoksilinom 30 sekund.
15. Spiranje in bistrenje v PBS 1 min.
16. Spiranje pod tekočo vodo 5 min.
17. Dehidracija v naraščajoči vrsti alkoholov, bistrenje v ksilolu in pokrivanje s sintetično smolo.

Postopek IHC označevanja za posamezna primarna protitelesa je bil enak v večini navedenih točk. Razlike so bile v različnih časovnih intervalih in uporabljenih pufrih za razkrivanje antiga (točka 2), različnih časovnih intervalih inkubacije z različno redčenimi primarnimi protitelesi (točka 7) in različnih časovnih intervalih inkubacije v delovni raztopini barvnega substrata z DAB (točka 11) (Tabela 7). Za vsa v raziskavo vključena protitelesa smo postopek razkrivanja antiga izvedli v mikrovalovni pečici. Razen pri ER in keratinu 5/6, je bila pri vseh drugih protitelesih moč mikrovalov na začetku 1100 W, ob vretju smo moč postopoma zmanjševali vse do 220 W. Pri ER in keratinu 5/6 je bila moč valov skozi celoten postopek razkrivanja antiga 770 W (Tabela 7).

Tabela 7 v rezultatih prikazuje optimizirane postopke IHC preiskav za posamezno protitelo.

Pri postopku IHC preiskave izražanja ER, PR in VEGF smo poskusili pred nanosom primarnega protitelesa tkivne rezine eno uro inkubirati z redčenim kozjim ali prašičjim serumom ali mlekom v prahu za blokado nespecifične reakcije. Vključitev te točke v IHC postopek ni

bistveno vplivala na rezultat, zato je niso uporabili pri končnem postopku označevanja.

Pozitivna reakcija je pri IHC postopku, kjer uporabimo DAB kot barvni substrat, vidna kot rjav reakcijski produkt. Za kontrastiranje smo jedra obarvali z Mayerjevim hematoksilinom. Pri negativni kontroli ne pride do rjavega reakcijskega produkta. Jedra se po kontrastirjanju s hematoksilinom obarvajo nežno modro.

3.3.1 Celični označevalci

- Za označevanje ER v malignih TMŽ pri psicah smo uporabili mišje monoklonsko protitelo, klon 1D5 (Dako), ki se veže na domeno na amino koncu molekule ER α pri človeku. Protitelo se veže tudi na ER α pri psu (Geraldes in sod., 2000; Martin de las Mallas in sod., 2005; Toniti in sod., 2009; Beha in sod., 2012b).
- Za označevanje PR v malignih TMŽ pri psicah smo uporabili kunčje poliklonsko protitelo (PR(c-19): sc-538, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), ki se veže na karboksilni konec molekule PR pri človeku. Protitelo se veže na PRA in PRB obliko. Protitelo se veže tudi na PR pri psu (Toniti in sod., 2009).
- Za označevanje HER-2 v malignih TMŽ pri psicah smo uporabili kunčje poliklonsko protitelo c-erbB-2 Oncoprotein (Dako), ki se veže na znotrajcelično domeno molekule HER-2 pri človeku. Protitelo se veže tudi na HER-2 pri psu (Martin de las Mallas in sod., 2003; Dutra in sod., 2004; Rungsipipat in sod., 2008; Sassi in sod., 2010).
- Za označevanje keratina 5/6 v malignih TMŽ pri psicah smo uporabili mišje monoklonsko protitelo, klon D5/16 (Dako), ki se veže na keratin 5 in 6 pri človeku. Protitelo se veže tudi na keratin 5 in 6 pri psu (Sassi in sod., 2010).
- Za označevanje keratina 14 v malignih TMŽ pri psicah smo uporabili mišje monoklonsko protitelo, klon LL002 (Millipore), ki se veže na zadnjih 15 aminokislinskih ostankov molekule keratina 14 pri človeku. Protitelo se veže tudi na keratin 14 pri psu (Sakuma in sod., 2010; Sassi in sod., 2010; Beha in sod., 2012b).
- Za označevanje vimentina v malignih TMŽ pri psicah smo uporabili mišje monoklonsko protitelo, klon V9 (Dako), ki se veže na molekulo vimentina pri človeku. Protitelo se veže tudi na vimentin pri psu (Sakuma in sod., 2010; Beha in sod., 2012b).
- Za označevanje VEGF v malignih TMŽ pri psicah smo uporabili mišje monoklonsko

protitelo, klon JH121 (Thermo Scientific), ki se veže na molekulo VEGF pri človeku.

Protitelo se veže tudi na VEGF pri psu (Restucci in sod., 2002; Al - Dissi in sod., 2010; Queiroga in sod., 2011a).

3.3.2 Nadzori pri imunohistokemičnem označevanju

V vsakem od IHC postopkov smo uporabili nadzore za preverjanje ustreznosti postopkov. Za pozitivne kontrole smo uporabili:

- pri IHC označevanju ER, PR in HER-2, parafinske tkivne rezine karcinoma mlečne žleze pri ženski s potrjenim izražanjem teh celičnih označevalcev (Onkološki inštitut, Klinični center, Ljubljana),
- pri IHC označevanju ER in PR, v vzorcih tkivnih rezin malignih TMŽ pri psicah, kjer je bilo poleg tumorja hkrati prisotno normalno tkivo mlečne žleze, močno obarvanje posamičnih jader celic mlečne žleze,
- pri IHC označevanju keratina 5/6 in keratina 14, parafinske rezine kože psa izbrane iz arhiva IPSUV VF UL – obarva se bazalna plast celic poroženavajočega večskladnega ploščatega epitelija, ker keratin 5/6 in keratin 14 sestavlja citoskelet teh celic,
- pri IHC označevanju vimentina, ki je celični označevalec za mezenhimske celice, je pozitivno kontrola predstavljal obarvana vezna plast podkožja in obarvano vezivno tkivo tumorjev,
- pri IHC označevanju VEGF, parafinske rezine ledvic psa izbrane iz arhiva IPSUV VF UL – celice ledvičnih tubulov močno izražajo VEGF.

V vseh tkivnih rezinah pozitivnih kontrol smo za posamezne antigene ugotovili specifično reakcijo.

Kot negativno kontrolo smo uporabili tkivne rezine, pri katerih smo v IHC postopku primarno protitelo nadomestili z redčilom za protitelesa DAKO Cytomatin Antibody Diluent (Dako, kataloška oznaka S2022). V negativnih kontrolah nismo ugotovili obarvanja oziroma specifične ali nespecifične IHC reakcije.

Ponovljivost IHC reakcije smo nadzorovali tako, da smo v vsako serijo barvanja vzorcev vključili tkivno rezino vzorca, ki je bil označen v prejšnjih serijah. Ponovljivost reakcije smo ocenili subjektivno. Ocenjevali smo intenzivnost izražanja posameznega celičnega

označevalca in intenzivnost barvne reakcije.

3.4 MERILA ZA OCENJEVANJE IMUНОHISTОKЕMIČNIH REАКCIЈ

Merila za ocenjevanje IHC reakcij so bila naslednja:

- Tumorje smo ocenili kot ER⁺ in PR⁺, ko je bilo jedro zmerno do močno obarvano v vsaj 5 % vseh tumorskih celic (Millanta in sod., 2005; Sassi in sod. 2010).
- Tumorjev smo ocenili kot HER-2⁺, ko je bilo vidno šibko do močno popolno obarvanje celične membrane v vsaj 10 % tumorskih celic (Gama in sod., 2008; Kim in sod., 2011a; HercepTestTM, Dako).
- Tumorje smo ocenili kot keratin 5/6⁺, keratin 14⁺ in vimentin⁺, ko je bilo izrazito močno obarvanje citoplazme vidno v vsaj 1 % epiteljskih tumorskih celic (Kim in sod., 2006; Chen in sod., 2008; Sassi in sod., 2010).

Vzorce smo ocenili s šibkim izražanjem ali brez izražanja, ko je bil delež obarvanih tumorskih celic nižji od mejne vrednosti, določene za posamezen označevalec oziroma v primeru, ko ni bilo IHC obarvanja tumorskih celic.

Rezultat reakcije IHC izražanja VEGF smo ocenjevali z ravnimi od nič do tri. Pri ocenjevanju, smo za pozitivne na izražanje VEGF, šteli epiteljske in mezenhimske tumorske celice z izrazitim zrnatim ali difuznim obarvanjem citoplazme. Tumorje z manj kot 25 % obarvanja citoplazme tumorskih celic smo ocenili z ravnijo nič (VEGF 0), tumorje s 25 do 50 % obarvanih tumorskih celic z ravnijo ena (VEGF 1), tumorje s 50 do 75 % obarvanih tumorskih celic z ravnijo dve (VEGF 2) in tumorje z več kot 75 % obarvanih tumorskih celic z ravnijo tri (VEGF 3) (Santos in sod., 2010a).

3.5 UGOTAVLJANJE DELEŽA POZITIVNIH TUMORSKIH CELIC

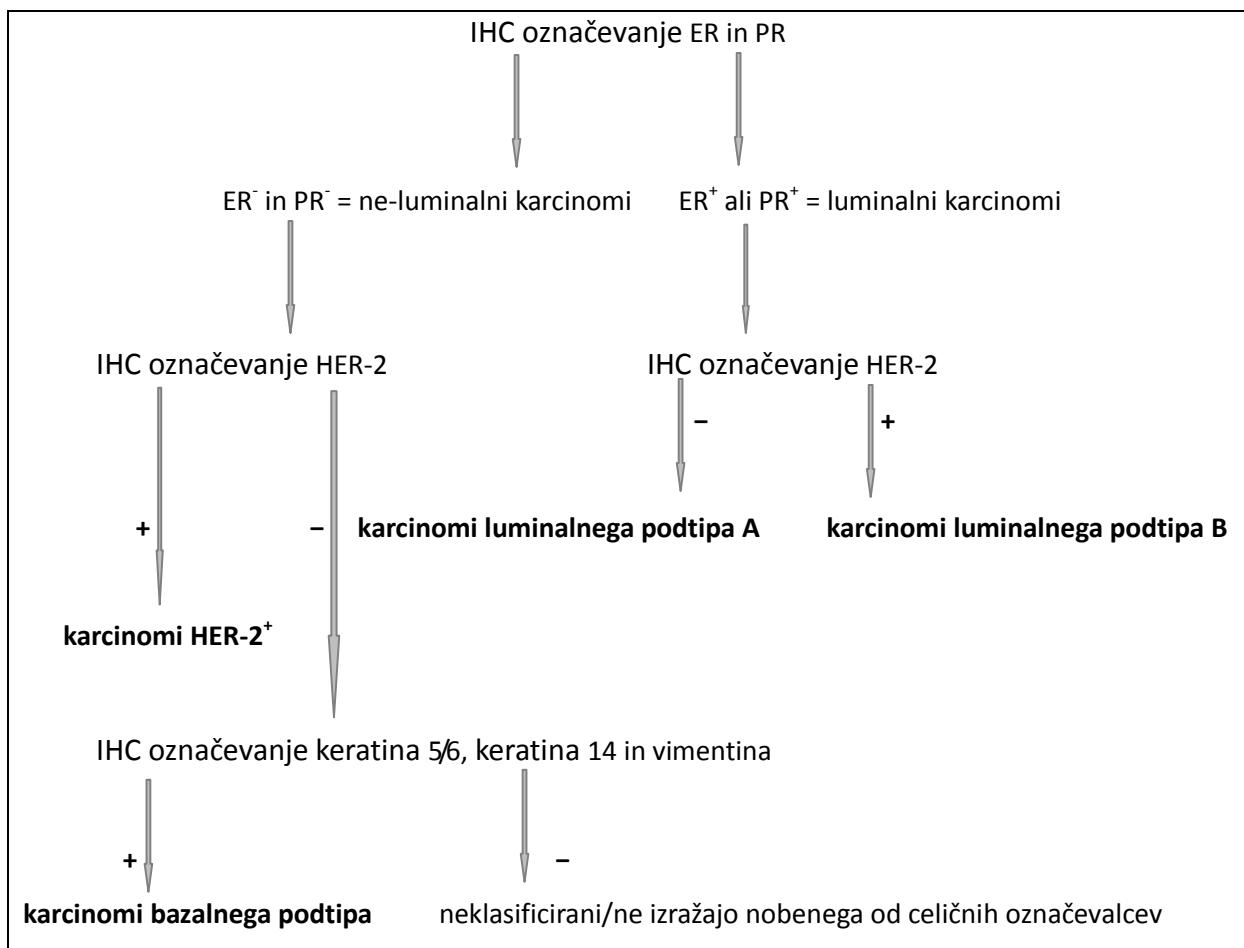
Uporabili smo slike tkivnih rezin, narejene z digitalno kamero DS-U2 (Nikon) in mikroskopom Microphot FXA (Nikon). Štetje pozitivnih tumorskih celic smo izvedli z računalniškim programom NIS-Elements BR (Nikon). Vsak vzorec tkivnih rezin tumorjev, označen s

posameznim protitelesom, smo razdelili na deset enako velikih polj in v vsakem polju naključno izbrali področje, kjer smo pod 400-kratno povečavo prešteli 100 tumorskih celic. Med temi 100 preštetimi tumorskimi celicami smo prešteli celice, ki so izražale posamezen celični označevalec. Iz rezultatov deleža pozitivnih celic na vsakem od desetih polj smo izračunali povprečje za posamezen vzorec in določili skupen delež pozitivnih celic v tumorju.

Pri vzorcih, kjer smo rezultat IHC preiskave ocenili kot neuporaben za oceno, smo to zapisali.

3.5.1 Imunohistokemično razvrščanje tumorjev

IHC smo razvrstili samo karcinome mlečne žleze. Maligne mezenhimske tumorje pri razvrstitvi nismo upoštevali. Na podlagi ocene rezultatov IHC, smo karcinome mlečne žleze psic po modelu Sassi in sod. (2010) razvrstili v štiri skupine: karcinome luminalnega podtipa A, karcinome luminalnega podtipa B, karcinome podtipa HER-2 in karcinome bazalnega podtipa. Tumorje smo razvrstili na podlagi mejnih vrednosti IHC označevanja ER, PR in HER-2. Karcinomi luminalnega podtipa A so ER^+ in/ali PR^+ ter hkrati $HER-2^-$. Karcinomi luminalnega podtipa B so ER^+ in/ali PR^+ ter hkrati $HER-2^+$. Karcinomi podtipa HER-2 so ER^- , PR^- in $HER-2^+$. Karcinomi bazalnega podtipa so ER^- , PR^- in $HER-2^-$ ter keratin $5/6^+$ in keratin 14^+ (Slika 1). Karcinome bazalnega podtipa smo dodatno potrdili kot vimentin $^+$ (Livasy in sod., 2006; Rodriguez - Pinilla in sod., 2007).



Slika 1: Razvrščanje karcinomov mlečne žleze na posamezne imunohistokemične podtipe (delno povzeto po Sassi in sod., 2010)

Figure 1: Sorting of the mammary gland carcinomas regarding immunohistochemical subtypes (partially adapted from Sassi et al., 2010)

3.6 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Želeli smo preveriti ali je razporeditev tumorjev ER⁺/ER⁻, PR⁺/PR⁻, HER-2⁺/HER-2⁻, VEGF 0/VEGF 1/VEGF 2/VEGF 3 in luminalnega podtipa A/luminalnega podtipa B/podtipa HER-2 /bazalnega podtipa statistično značilno različna znotraj skupin kliničnih, patohistoloških in IHC parametrov (starost, sterilizacija, navidezna brejost, prisotnost multiplih tumorjev, mesto tumorjev, klinični stadij, patohistološko razvrščanje, patohistološki tip (enostaven/kompleksen), stopnja diferenciacije). Uporabili smo test Pearsonovega kvadrata. Korelacije med ravnem izražanja ER, PR, HER-2 in VEGF smo preverili z izračunom Spermanovega koeficienta korelacije.

Od napredovanja bolezni odvisno preživetje smo prikazali s krivuljami po Kaplan - Meierju. V analizo smo vključili samo skupine z več kot tremi vzorci, kar je omogočilo statistično obdelavo. Preživetje, značilno za bolezen (ang. disease specific survival) je predstavljalo v dnevih izraženo obdobje od datuma kirurške odstranitve tumorjev do pogina, ponovnega pojava bolezni ali preživetja dveh let. Kot dogodek smo šteli le pogin zaradi TMŽ. Ob poginu zaradi drugega vzroka ali ponovnega pojava bolezni smo ugotovljeni čas šteli kot okrnjen podatek (ang. censored data). Test log-rank enakosti dveh funkcij preživetja je bil uporabljen za testiranje razlik med posameznimi skupinami. Krivulje preživetja smo izdelali za starost, sterilizacijo, navidezno brejost, prisotnost multiplih tumorjev, mesto tumorjev, klinični stadij, patohistološko razvrščanje, patohistološki tip (enostaven/kompleksen), stopnjo diferenciacije, ER, PR, HER-2, VEGF, IHC razvrščanje in kombinirano oceno kliničnega stadija/PR in kliničnega stadija/IHC razvrščanja. Spremenljivke, pri katerih je bila razlika med krivuljami preživetja statistično značilna, smo uporabili pri multivariatni analizi. Multivariatno analizo smo opravili s pomočjo Coxovega regresijskega modela sorazmernega tveganja. Rezultate multivariatne analize smo predstavili kot razmerje ogroženosti (ang. hazard ratio) s 95 % intervali zaupanja (ang. confidence intervals). Razmerje ogroženosti prikaže ogroženost posameznih skupin v primerjavi z referenčno skupino. Če je vrednost razmerja ogroženosti $> 1,0$, ogroženost narašča, če je razmerje ogroženosti $< 1,0$, pa pada.

Pri vseh uporabljenih statističnih metodah smo kot statistično značilne vrednosti imeli ob

$P < 0,05$. Vsi statistični izračuni so bili izpeljani s pomočjo statističnega programa IBM SPSS, različica 20.

4 REZULTATI

4.1 KLINIČNI PODATKI PSIC

V raziskavo smo vključili 81 malignih TMŽ 72 psic, katerim so med leti 2003 in 2010 na KKMŽ VF UL kirurško odstranili tumorje. Pri enaintridesetih psicah (43,1 %) se je hkrati pojavilo večje število TMŽ in v primeru, da so bili maligni, smo vse vključili v raziskavo. Takšnih psic je bilo 8; pri eni so se hkrati pojavili trije maligni TMŽ, pri ostalih sedmih po dva maligna TMŽ. 14 psic (19,7 %) je bilo steriliziranih in 57 (80,3 %) nesteriliziranih, za eno psico nismo imeli podatka. Nobena sterilizacija ni bila opravljena pred nastopom drugega spolnega ciklusa.

Pri 12 psicah (16,7 %) je bila v obdobju do pojava TMŽ diagnosticirana navidezna brejost, pri 6 od teh 12 psic (50 %) se je hkrati pojavilo več TMŽ.

4.1.1 Pasemska porazdelitev

Poleg mešancev so se TMŽ pojavili pri psicah 28 različnih pasem. Največ je bilo kokeršpanjelov (19,4 %) in mešancev (18,1 %). Sledili so srednji kodri (6,9 %), trije primeri pasme maltežan, nemški ovčar, pekinžan in slovaški čuvač in dva primera pasme doberman, zlati prinašalec, pritlikavi šnaucer, saluki, samojed in zahodnovišavski beli terier. Za primerjavo smo število psic s TMŽ posamezne pasme primerjali s številčnostjo te pasme v Sloveniji (register Veterinarske uprave Republike Slovenije, december 2011). Po številčnosti so v Sloveniji najpogostejši mešanci, nemški ovčarji, zlati prinašalci, maltežani in kokeršpanjeli (Tabela 4).

Tabela 4: Število in delež psic s tumorji mlečne žleze, katerim so tumorje kirurško odstranili na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani med leti 2003 in 2010 in številčnost te pasme v Sloveniji (podatki Veterinarske uprave Republike Slovenije, december 2011)

Table 4: The number and percentage of bitches with mammary gland tumours that underwent surgery between 2003 and 2010 at the Clinic for small animals medicine and surgery at the Veterinary Faculty of the University of Ljubljana and the breed's size in Slovenia (data from the Veterinary administration of the Republic of Slovenia, December 2011)

PASMA*	ŠT. PSIC	DELEŽ VSEH PSIC S TMŽ VKLJUČENIH V RAZISKAVO (%)	ŠT. PSIC V SLO
VAL	1	1,4	11
SČ	3	4,1	46
OT	1	1,4	16
SAL	2	2,8	36
AUT	1	1,4	19
JD	1	1,4	131
BM	1	1,4	151
KOS	5	6,9	976
HW	1	1,4	199
BT	1	1,4	224
KŠ	14	19,4	3157
PŠ	2	2,8	459
DO	2	2,8	746
JK	1	1,4	478
SJ	2	2,8	1513
JRT	1	1,4	813
DA	1	1,4	972
PE	3	4,1	3030
KOP	1	1,4	1073
WHT	2	2,8	3030
SH	1	1,4	1505
AST	1	1,4	1717
ML	3	4,1	5231
RW	1	1,4	2144
YT	1	1,4	2202
GR	2	2,8	9093
X	13	18,1	92934
NO	3	4,1	22589
AB	1	1,4	867
SKUPAJ	72	100	155362

***Razlaga okrajšav pasem**

AB = angleški buldog

JD = jazbečar, dolgodlaki

PŠ = šnaucer, pritlikavi

AST = ameriški staffordshirski terier

JK = jazbečar, kratkodlaki

RW = (rottweiler) rotvajler

AUT = avstralski terier

JRT = jack russel terier

SAL = saluki

BM = bulmastif

KOP = koder (pudelj), pritlikavi

SH = sibirski husky

BT = angleški bulterier

KŠ = angleški kokeršpanjel

SJ = samojed

DA = dalmatinec

ML = maltežan

SČ = slovaški čuvač

DO = doberman

NO = nemški ovčar

VAL = švedski ovčji špic

GR = zlati prinašalec

OT = (otterhound) vidrar

WHT = zahodnovišavski beli terier

HW = hovawart

PE = pekinžan

X = mešanec

YT = yorkshirski terier

4.1.2 Starostna razvrstitev

Tabela 5 prikazuje starostno razvrstitev psic s TMŽ. Povprečna starost je bila 10,3 let. Največ psic je bilo starih 11 let (Tabela 5, krepko). 47 psic (65,3 %) je bilo starih 10 let ali več, 9 psic (12,3 %) je bilo starih 7 let ali manj.

Tabela 5: Razvrstitev psic s tumorji mlečne žleze glede na starost

Table 5: Age distribution of the bitches with mammary gland tumours

STAROST	ŠTEVILLO PSOV	DELEŽ (%)
4	1	1,39
5	2	2,78
6	2	2,78
7	4	5,56
8	9	12,50
9	7	9,72
10	10	13,89
11	14	19,44
12	9	12,50
13	6	8,33
14	6	8,33
15	2	2,78
SKUPAJ	72	100

4.1.4 Pogostost tumorjev glede na položaj v mlečnem kompleksu

Med vsemi 81 tumorji vključenimi v raziskavo, za en tumor nismo imeli podatka o mestu. Dva tumorja sta bila vnetnega tipa in difuzno razraščena. Maligni TMŽ so bili pogostejši na zadnjih (petih) mlečnih kompleksih (D5, L5) (27,5 %) in predzadnjih (četrtih) mlečnih kompleksih (D4, L4) (20 %). Tabela 6 prikazuje še ostale podatke.

Tabela 6: Razvrstitev tumorjev glede na mesto (mlečni kompleks)

Table 6: Classification of the tumours by their location (mammary complex)

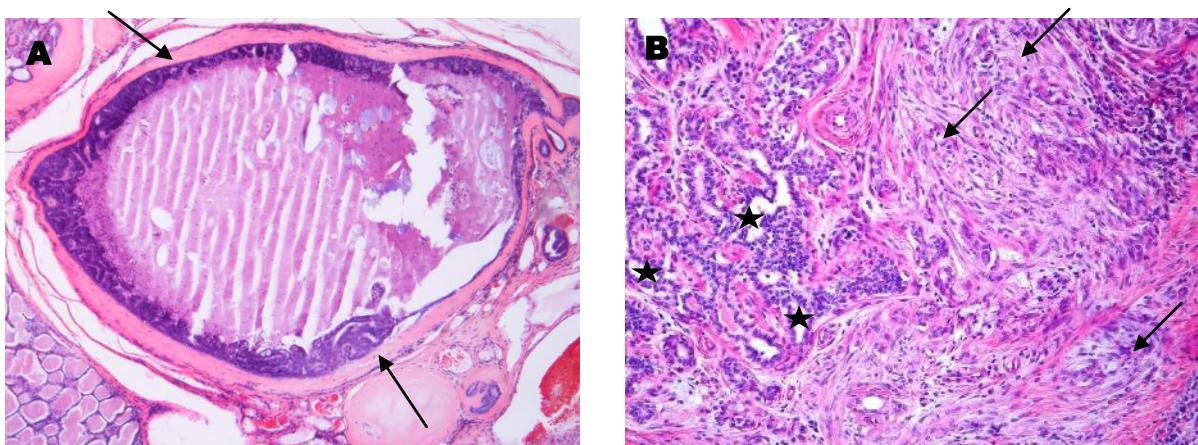
MESTO	ŠTEVilo TUMORJEV	DELEŽ (%)
D1 in L1	5	6,25
med 1 in 2	1	1,25
D2 in L2	8	10,0
D3 in L3	14	17,5
med 3 in 4	4	5,0
D4 in L4	16	20,0
med 4 in 5	8	10,0
D5 in L5	22	27,5
vnetni	2	2,5
SKUPAJ	80	100

4.1.5 Razvrstitev psic v posamezne skupine kliničnega stadija

Kirurgi so psicam s TMŽ ob kirurški odstranitvi tumorjev določili klinični stadij po sistemu TNM (Lana in sod., 2007; Sleenckx in sod., 2011) (Tabela 1). Za test Pearsonovega hi-kvadrata smo v primeru multiplih tumorjev vsakega upoštevali kot samostojno enoto. Podatke smo imeli za 76 tumorjev: v 37 primerih smo določili klinični stadij I, v 14 klinični stadij II, v 10 klinični stadij III in v 15 klinični stadij IV. Pri analizi preživetja po Kaplan - Meierju smo pri psicah z multiplimi tumorji upoštevali klinični stadij, ki so ga kirurgi določili na podlagi ocene največjega tumorja oziroma morebitne prisotnosti zasevkov.

4.2 PATOHISTOLOŠKO RAZVRŠČANJE

Pri psicah s TMŽ so bili diagnosticirani: 3 karcinomi *in situ*, 29 karcinomov kompleksnega tipa, 25 enostavnih tubulopapilarnih karcinomov, 13 enostavnih solidnih karcinomov, 3 enostavni anaplastični karcinomi, 2 ploščatocelična karcinoma (poseben tip) in 6 malignih mezenhimskih TMŽ; sarkom, karcinosarkom, fibrosarkom, maligni mioepiteliom in 2 maligna mešana tumorja.

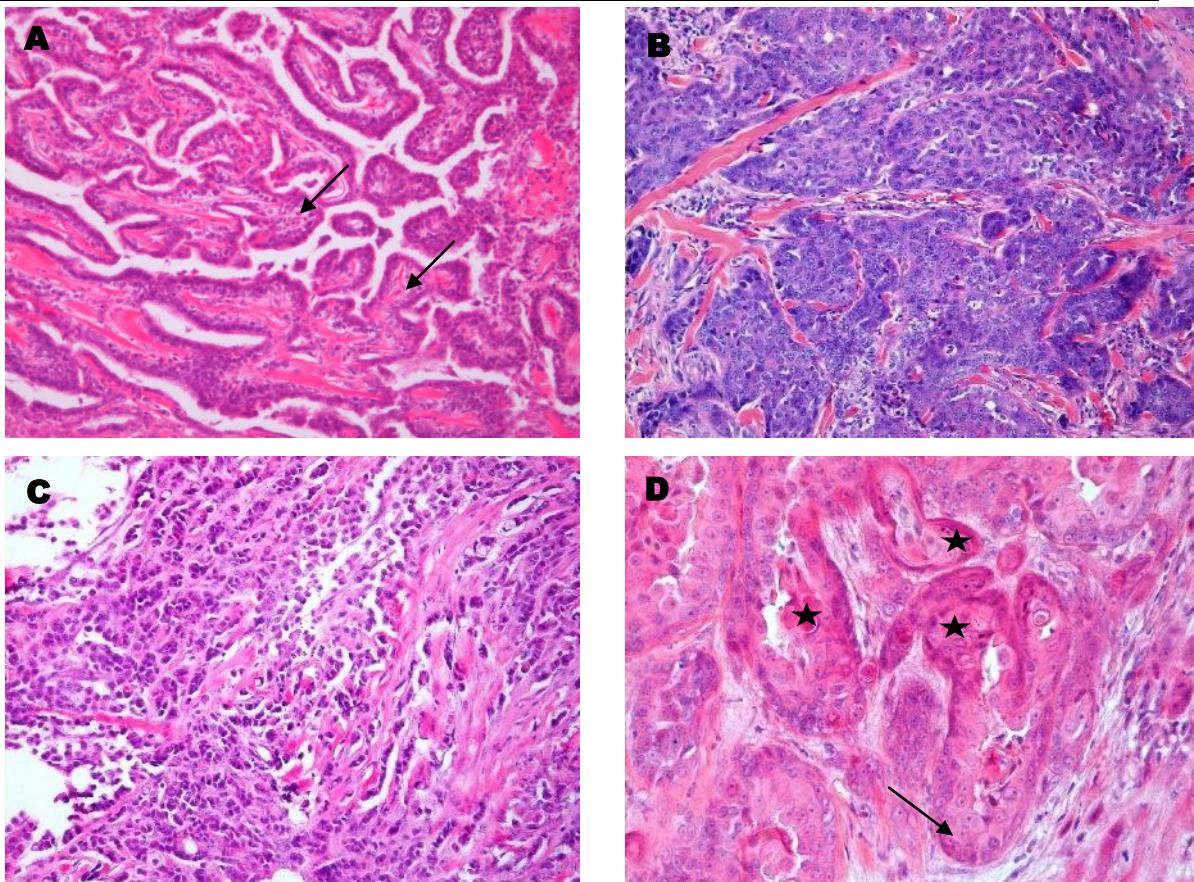


Slika 2: A karcinom in situ, B karcinom kompleksnega tipa (HE, 40-kratna povečava)

Figure 2: A carcinoma in situ, B complex type carcinoma (HE, 40-fold magnification)

Slika 2 prikazuje primer karcinoma in situ (A) z debelo vezivno kapsulo, ki je značilna za ta tip tumorjev (*puščici*) – znak, da tumorske celice še niso prodrle v bazalno membrano; in primer karcinoma kompleksnega tipa (B), kjer so na levi strani slike vidne epitelijске tumorske celice, ki oblikujejo tubule (*zvezdice*) in na desni strani slike vrtinčasti skupki proliferirajočih mioepitelijskih celic (*puščice*).

Figure 2 shows an example of the carcinoma in situ (A) surrounded with a thick capsule of connective tissue which is characteristic of this tumour type – it indicates that tumour cells did not yet invade into the basement membrane yet; and the example of complex type carcinoma (B) with epithelial tumour cells forming tubules seen on the left side (*asterisks*) and with proliferative myoepithelial cells forming a swirling pattern seen on the right side of the image (*arrows*).

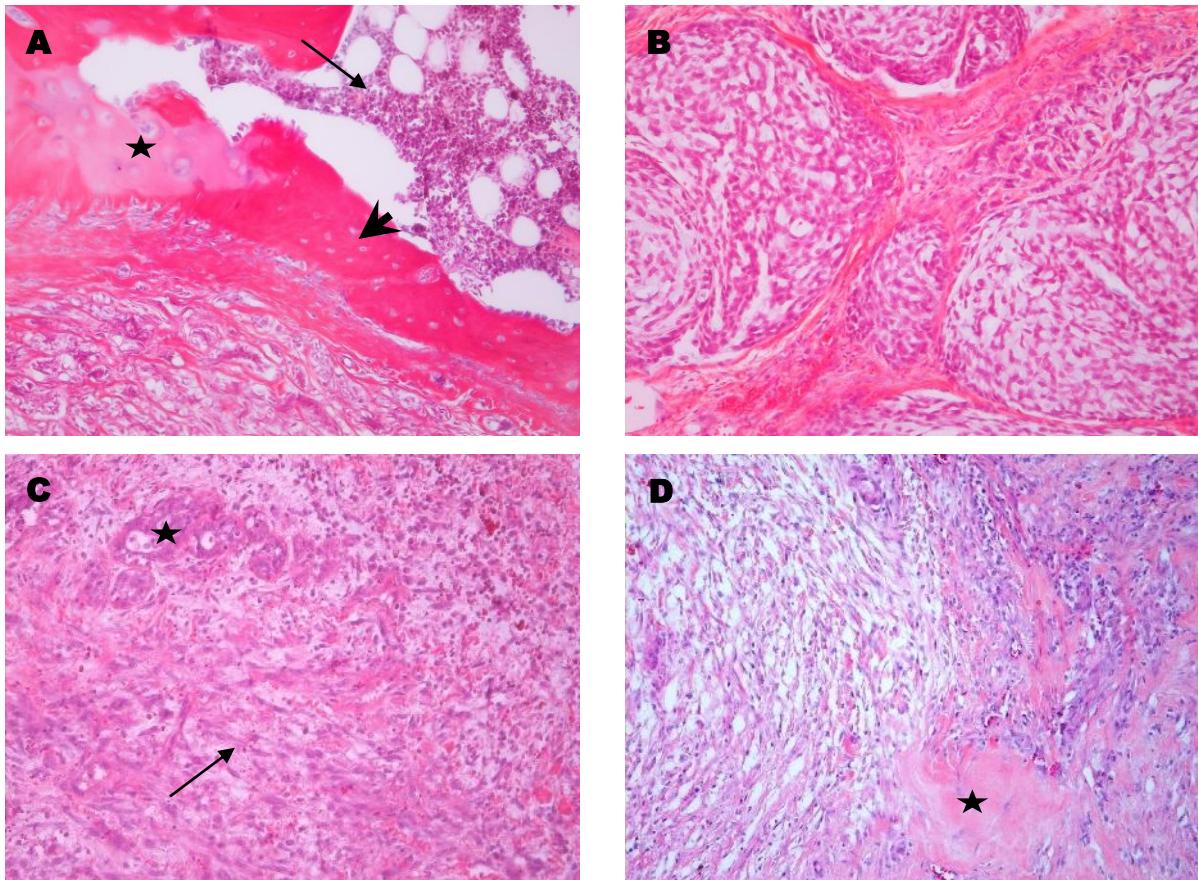


Slika 3: A tubulopapilaren karcinom, B soliden karcinom, C anaplastičen karcinom in D ploščatoceličen karcinom (HE, 100-kratna povečava)

Figure 3: A simple tubulopapillary carcinoma, B solid carcinoma, C anaplastic carcinoma and D squamous cell carcinoma (HE, 100-fold magnification)

Slika 3 prikazuje primer tubulopapilarnega karcinoma (A), solidnega karcinoma (B), anaplastičnega karcinoma (C) in ploščatoceličnega karcinoma (D). Značilnost tubulopapilarnih karcinomov (A) so oblikovani tubuli. Proliferirajoče epiteljske tumorske celice rastejo v plasteh in tvorijo prstaste podaljške, ki segajo v svetlino tubulov (*puščici*). Solidni karcinomi (B) so gostocelični. Epiteljske tumorske celice rastejo strnjeno in tvorijo kompaktne skupke v obliki snopov, listov ali kroglastih struktur. Pri anaplastičnem karcinomu (C) se tumorske celice infiltrativno difuzno razraščajo in posamično ali v skupkah invazivno vraščajo v okoliško tkivo. Tumorje tega patohistološkega tipa sestavljajo velike, pleomorfne celice z netipičnimi jedri. Del epiteljskih tumorskih celic ploščatoceličnega karcinoma (D) poroženeva (diskeratotične celice); znotraj tumorja se tvorijo manjši otočki roževine, ki se po barvanju s HE obarvajo homogeno rožnato (*zvezdice*). Skupki tumorskih celic infiltrativno vraščajo v okoliško tkivo (*puščica*).

Figure 3 shows examples of simple tubulopapillary carcinoma (A), simple solid carcinoma (B), simple anaplastic carcinoma (C), and squamous cell carcinoma (D). Tubule formation is characteristic of tubulopapillary carcinomas (A). Proliferative epithelial cells grow in layers forming fingerlike structures that protrude into the lumina of tubules (arrows). Solid carcinomas (B) are highly cellular. Compact growth of the epithelial tumour cells is seen with cells arranged in sheets, cords or nests. Anaplastic carcinomas (C) are diffusely infiltrating neoplasms with tumours cell invading into the surrounding tissue individually or in clusters. Tumours of this histopathological type consists of large, pleomorphic cells with atypical nuclei. Some of the epithelial tumour cells in the squamous cell carcinoma (D) are keratinized (dyskeratotic cells), forming small islets of squamous differentiation which stains homogeneously pink with hematoxylin and eosin (asterisks). The clusters of tumour cells infiltrate the surrounding tissue (arrow).



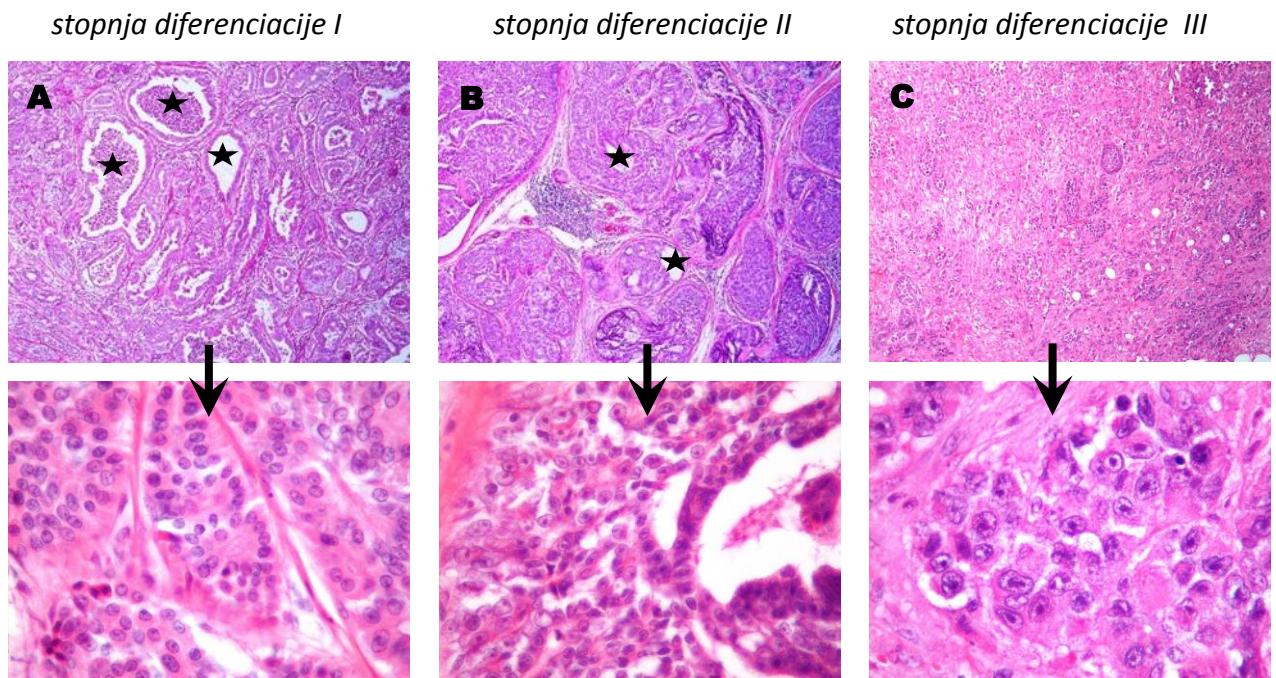
Slika 4: Primeri malignih mezenhimskih tumorjev mlečne žleze: A maligni mešani tumor, B maligni mioepiteliom, C karcinosarkom in D fibrosarkom (HE, 100-kratna povečava)

Figure 4: Examples of malignant mesenchymal mammary gland tumours: A malignant mixed tumour, B malignant myoepithelioma, C carcinosarcoma and D fibrosarcoma (HE, 100-fold magnification)

Slika 4 prikazuje primere malignih mezenhimskih TMŽ: maligni mešani tumor (A), maligni mioepiteliom (B), karcinosarkom (C) in fibrosarkom (D). Maligne mešane tumorje (A) sestavlja mešanica epitelijskih, mioepitelijskih in mezenhimskih celic. Mezenhimske tumorske celice tvorijo hrustančevino (zvezdica) in kostnino (glava puščice) – oblikujejo se votline, kjer nastaja kostni mozeg (puščica). Maligni mioepiteliom (B) večinoma sestavljajo vretenaste mioepitelijске celice, ki tvorijo večje in manjše vrtince (spinocellularen tip rasti). Karcinosarkom (C) sestavljajo nezrele epitelijske (zvezdica) (luminalne in mioepitelijalne) in nezrele mezenhimske celice (puščica). Tumorske celice fibrosarkoma (D) sintetizirajo kolagen – znotraj tumorskega tkiva se oblikujejo homogena področja, ki se po barvanju s HE obarvajo eozinofilno (zvezdica).

Figure 4 shows examples of malignant mesenchymal mammary gland tumours: malignant mixed tumour (A), malignant myoepithelioma (B), carcinosarcoma (C) and fibrosarcoma (D). Malignant mixed tumours (A) are composed of a mixture of malignant epithelial, myoepithelial and mesenchymal cells. The mesenchymal tumour cells produce cartilage (asterisk) and bone (arrow head), forming cavities with bone marrow production (arrow). The malignant myoepithelioma (B) is composed of spindle myoepithelial cells forming larger and smaller swirling patterns (spinocellular type of growth). The carcinosarcoma (C) is composed of immature epithelial (asterisk) (luminal and myoepithelial) and immature mesenchymal cells (arrow). The tumour cells of the fibrosarcoma (D) synthesize collagen – within the tumour tissue homogeneous areas are formed that stain eosinophilic with hematoxylin and eosin (asterisk).

Vsem karcinomom enostavnega, kompleksnega in posebnega tipa smo določili stopnjo diferenciacije po Elstonu in Ellisu (Tabela 3). Med vsemi 72 tumorji smo jih 30 (41,7 %) ocenili kot dobro diferencirane (stopnja diferenciacije I), 25 (34,7 %) kot zmerno diferencirane (stopnja diferenciacije II) in 17 (23,6 %) kot slabo diferencirane (stopnja diferenciacije III).



Slika 5: Primeri karcinomov mlečne žleze ocenjenih s stopnjo diferenciacije I (A), II (B) in III (C) (HE, na zgornjih slikah 40-kratna in na spodnjih 400-kratna povečava)

Figure 5: Examples of carcinomas of the mammary gland estimated with the histological grade I (A), II (B) and III (C) (HE, the above figures with 40-fold and the figures below with 400-fold magnification)

Slika 5 prikazuje karcinome mlečne žleze, ki so ocenjeni s stopnjo diferenciacije od I do III. Na sliki A so vidne številne svetline (zvezdice) – tubuli so navzoči v več kot 75 % tumorskega tkiva. Jedra tumorskih celic so majhna in podobnih oblik. Na sliki B je delež tubulov manjši (zvezdice). Jedra tumorskih celic zmerno odstopajo glede na velikost in obliko. Na sliki C se tumorske celice razraščajo neurejeno. Njihova jedra so različnih oblik in velikosti (močno pleomorfna) z izrazitimi jedrci.

Figure 5 shows examples of the carcinomas of the mammary gland estimated with histological grades from I to III. On image A numerous lumina are seen (asterisks) – tubules are visible in more than 75 % of the tumour tissue. The tumour cell nuclei are small and equal in size. On image B the proportion of visible tubules is smaller (asterisks). There is moderate variance in the size and shape of the tumour cell nuclei. On image C the tumour cells exhibit disordered growth; their nuclei are of different shapes and sizes (highly pleomorphic) with apparent nucleoli.

4.3 REZULTATI IMUNOHISTOKEMIČNE PREISKAVE

Za vsak celični označevalc, ki smo ga uporabili v raziskavi, smo optimizirali postopek IHC preiskave. Tabela 7 prikazuje rezultate optimizacije.

Tabela 7: Časovni intervali razkrivanja antigenov, uporabljeni redčenja posameznih protiteles in čas inkubacije s posameznimi primarnimi protitelesi

Table 7: Time intervals of antigen unmasking, antibody dilutions used and the primary antibody incubation time

primarno protitelo	čas razkrivanja antiga / pufer	redčina protitelesa	čas inkubacije pri sobni temperaturi (ure)
ER	770W 15 min / EDTA pufer	1 : 80	24
PR	220 W 15 min / citratni pufer	1 : 150	1
HER-2	220W 20 min / citratni pufer	1 : 100	1
keratin 5/6	770 W 60 min / EDTA pufer	1 : 50	24
keratin 14	220 W 15 min / citratni pufer	1 : 50	1
vimentin	220 W 15 min / citratni pufer	1 : 100	1
VEGF	220 W 10 min / EDTA pufer	1 : 50	1

4.3.1 Vpliv časa fiksacije tkiva tumorja v formalinu na izražanje celičnih označevalcev

Da bi preverili, kako čas fiksacije tkiva tumorja v formalinu vpliva na izražanje celičnih označevalcev, smo svež malign TMŽ psice fiksirali v formalinu, pri čemer smo spremenjali čas fiksiranja. Tkivo izbranega tumorja smo v kosih različnih velikosti fiksirali: 8 ur, 24 ur in 8 dni. Za kose tumorjev različnih velikosti smo preizkusili vse časovne intervale. Uporabili smo jih za preizkušanje IHC preiskav izražanja ER, PR in VEGF.

Glede na izražanje celičnih označevalcev ER, PR in VEGF v tkivu tumorja, različno dolgo fiksiranega v formalinu, smo o vplivu časa fiksacije ugotovili:

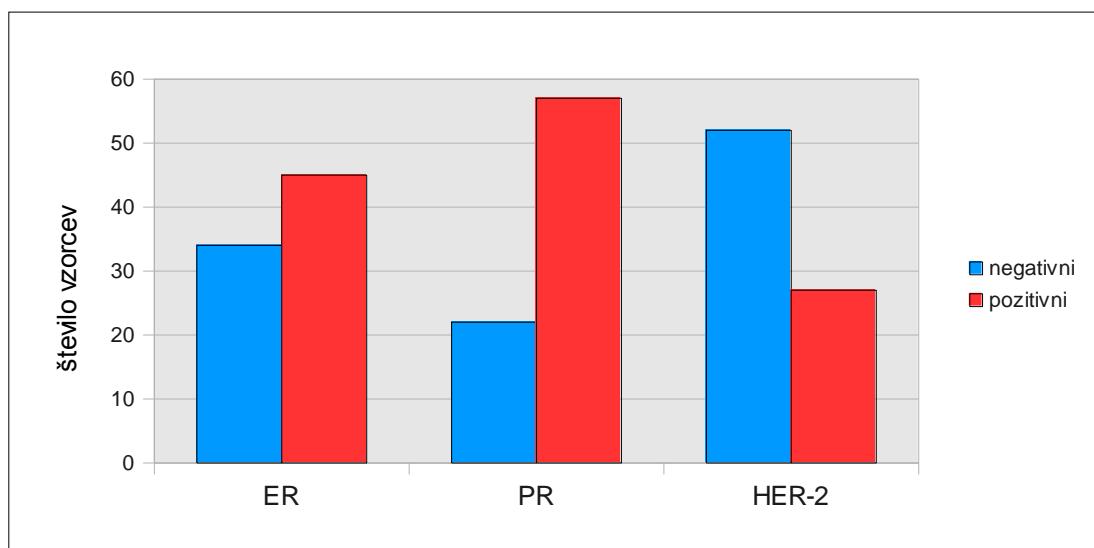
- Različni časovni intervali fiksacije v formalinu niso bistveno vplivali na rezultate izražanja VEGF.
- Pri ER in PR smo ugotovili slabše IHC reakcije ob nezadostno fiksiranem tkivu (8 ur).
- V tkivu tumorja, predolgo fiksiranega v formalinu, je bil za optimalno barvno reakcijo potreben daljši časovni interval razkrivanja antiga.
- V tkivu tumorja, fiksiranega v formalinu 24 ur, smo ugotovili zmerno do močno

specifično reakcijo.

4.3.2 Rezultati imunohistokemične preiskave za estrogenske in progesteronske receptorje ter receptor za humani epidermalni rastni dejavnik 2

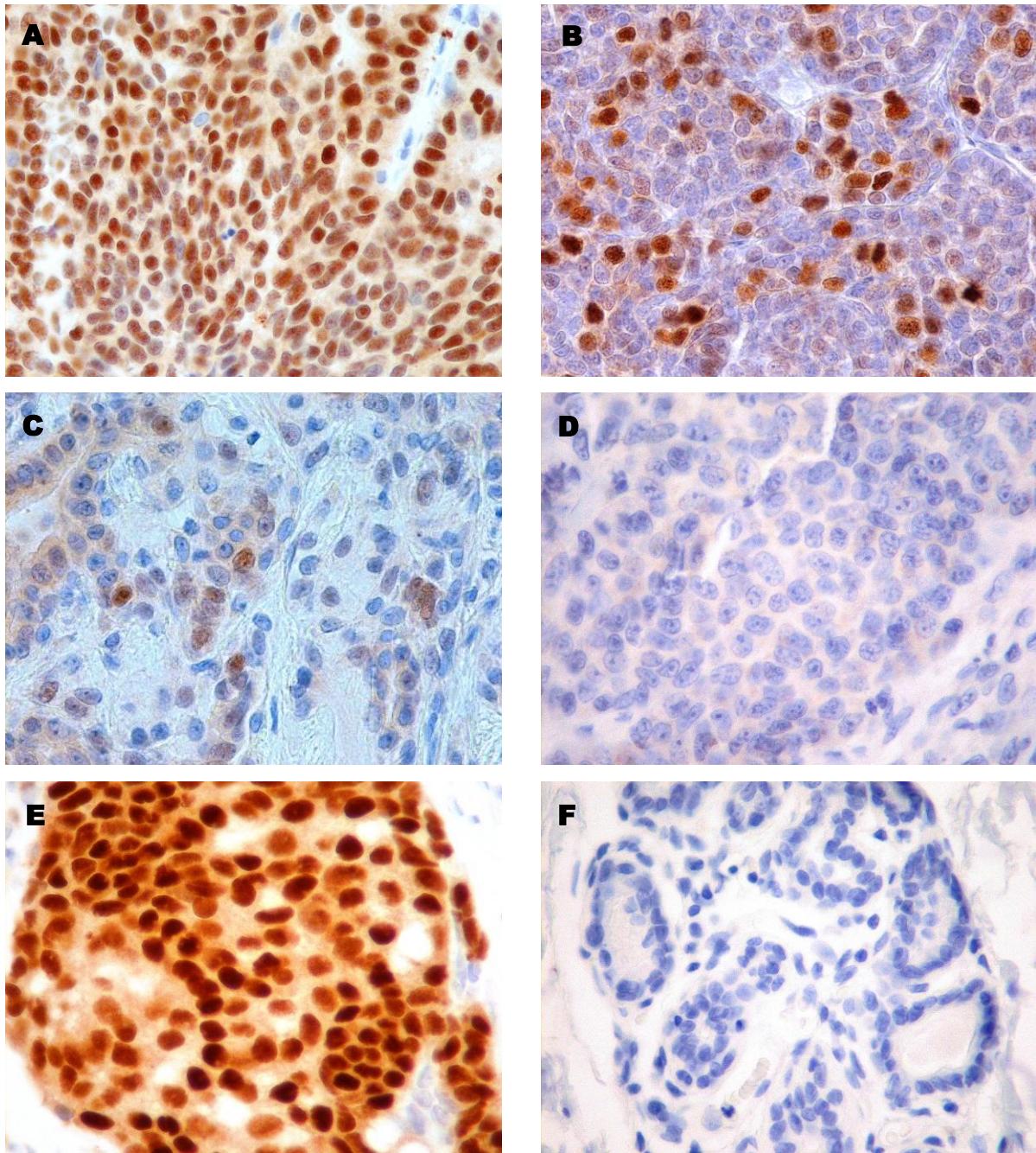
Od vseh 81 tumorjev vključenih v IHC preiskavo, je bil pri 2 vzorcih rezultat neuporaben za oceno. Oba vzorca sta bila primer malignega mešanega TMŽ. V več zaporednih poskusih, pri IHC označevanju ER in PR, smo pri obeh vzorcih opazili nespecifično barvno reakcijo. Pri IHC označevanju HER-2 je bila barvna reakcija šibka, s slabim kontrastom.

Pri IHC označevanju ER je bilo 43 % tumorjev ER^- in 57 % tumorjev ER^+ . Pri IHC označevanju PR je bilo 27,8 % tumorjev PR^- in 72,2 % tumorjev PR^+ . Pri IHC označevanju HER-2 je bilo 65,8 % tumorjev $HER-2^-$ in 34,2 % tumorjev $HER-2^+$ (Slika 6). 21,5 % (17/79) tumorjev je bilo hkrati ER^+ , PR^+ in $HER-2^+$, medtem ko je bilo 15,2 % (12/79) tumorjev trojno negativnih (ER^- , PR^- in $HER-2^-$). 21,5 % (17/79) tumorjev je bilo hkrati ER^+ in $HER-2^+$ in 25,3 % (20/79) tumorjev je bilo hkrati PR^+ in $HER-2^+$.



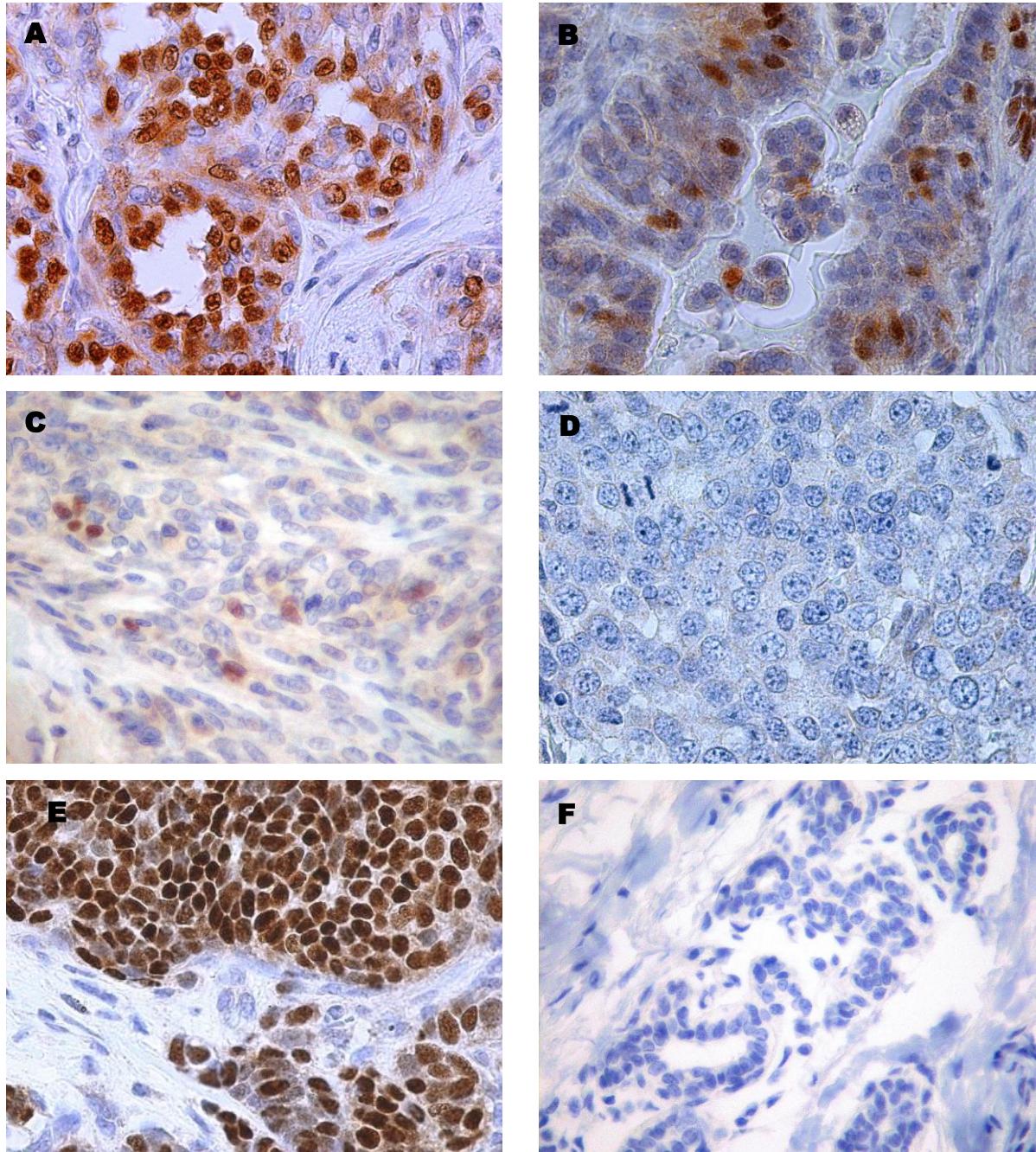
Slika 6: Število malignih tumorjev mlečne žleze ER^+ , ER^- , PR^+ , PR^- , $HER-2^+$ in $HER-2^-$ ($n = 79$)

Figure 6: The number of ER^+ , ER^- , PR^+ , PR^- , $HER-2^+$ in $HER-2^-$ malignant mammary gland tumours ($n = 79$)



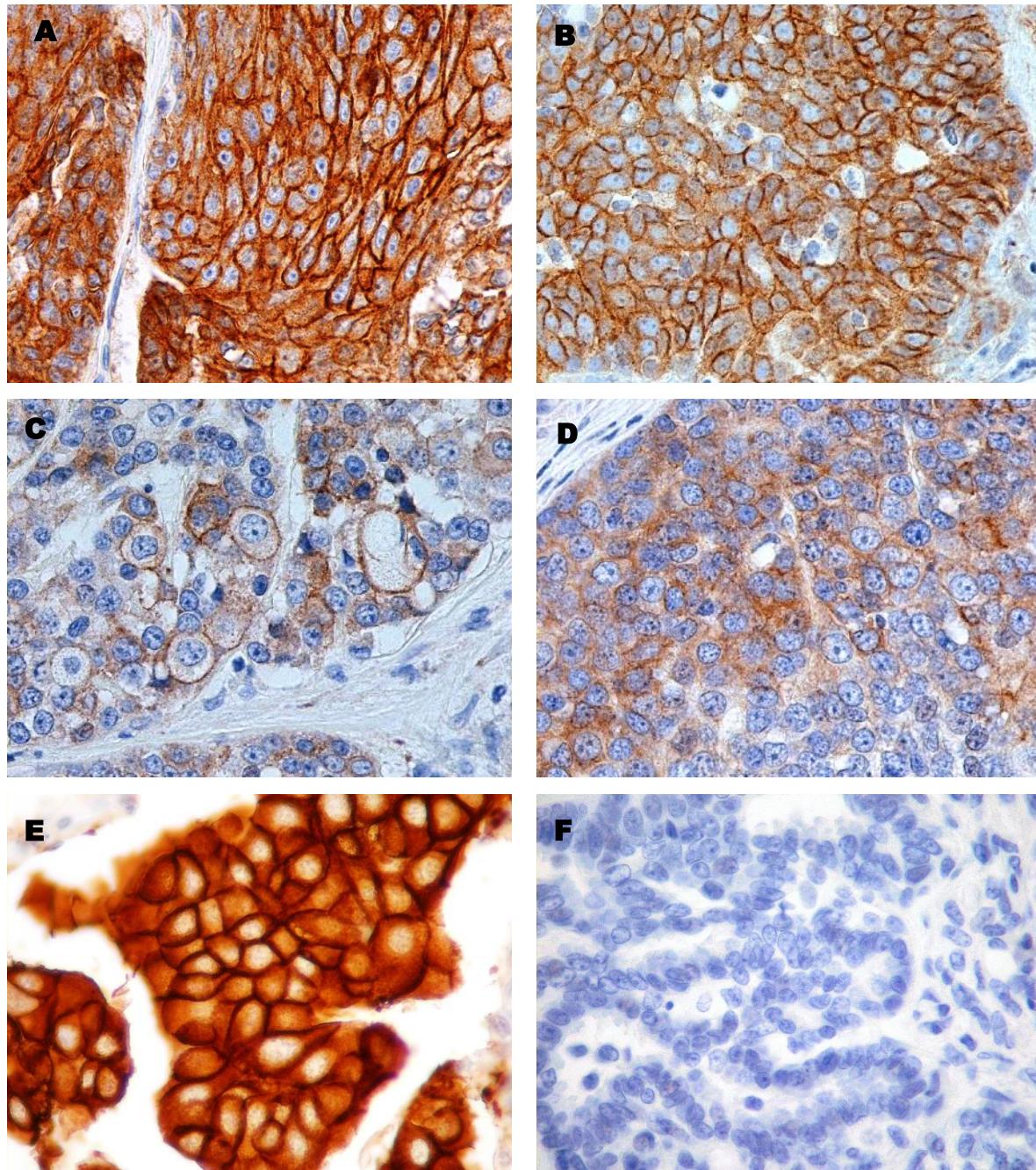
Slika 7: Različne ravni izražanja estrogenskega receptorja v malignih tumorjih mlečne žleze: A močno, B zmerno, C šibko, D negativno, E pozitivna kontrola in F negativna kontrola (IHC označevanje, 400-kratna povečava)

Figure 7: Different levels of estrogen receptor expression in malignant mammary gland tumours: A strong, B moderate, C weak, D negative, E positive control, F negative control (IHC staining, 400-fold magnification)



Slika 8: Različne ravni izražanja progesteronskega receptorja v malignih tumorjih mlečne žleze: A močno, B zmerno, C šibko, D negativno, E pozitivna kontrola in F negativna kontrola (IHC označevanje, 400-kratna povečava)

Figure 8: Different levels of progesteron receptor expression in malignant mammary gland tumours: A strong, B moderate, C weak, D negative, E positive control, F negative control (IHC staining, 400-fold magnification)

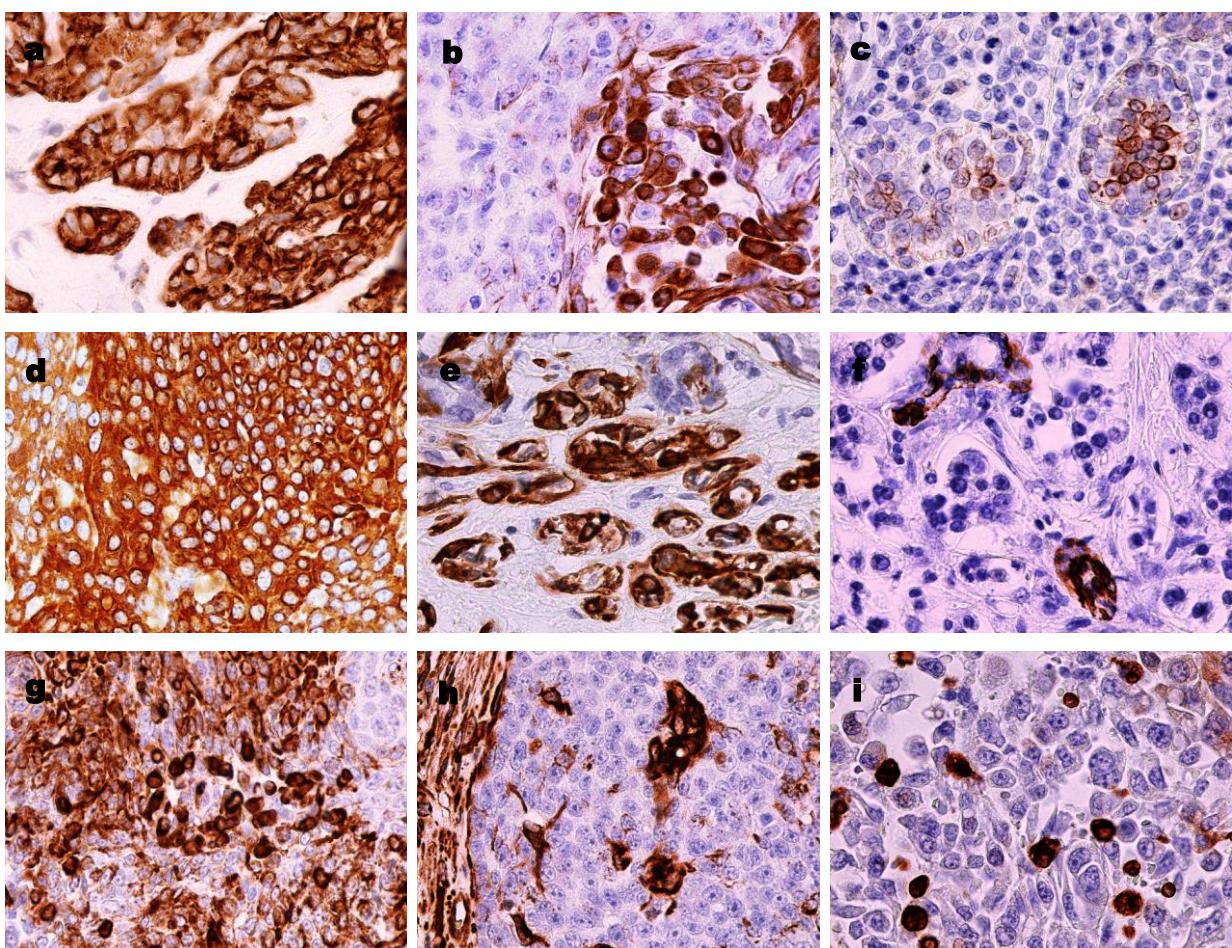


Slika 9: Različne ravni izražanja receptorja za humani epidermalni rastni dejavnik 2 v malignih tumorjih mlečne žleze: A močno, B zmerno, C šibko, D negativno, E pozitivna kontrola in F negativna kontrola (IHC označevanje, 400-kratna povečava)

Figure 9: Different levels of human epidermal growth factor receptor 2 expression in malignant mammary gland tumours: A strong, B moderate, C weak, D negative, E positive control, F negative control (IHC staining, 400-fold magnification)

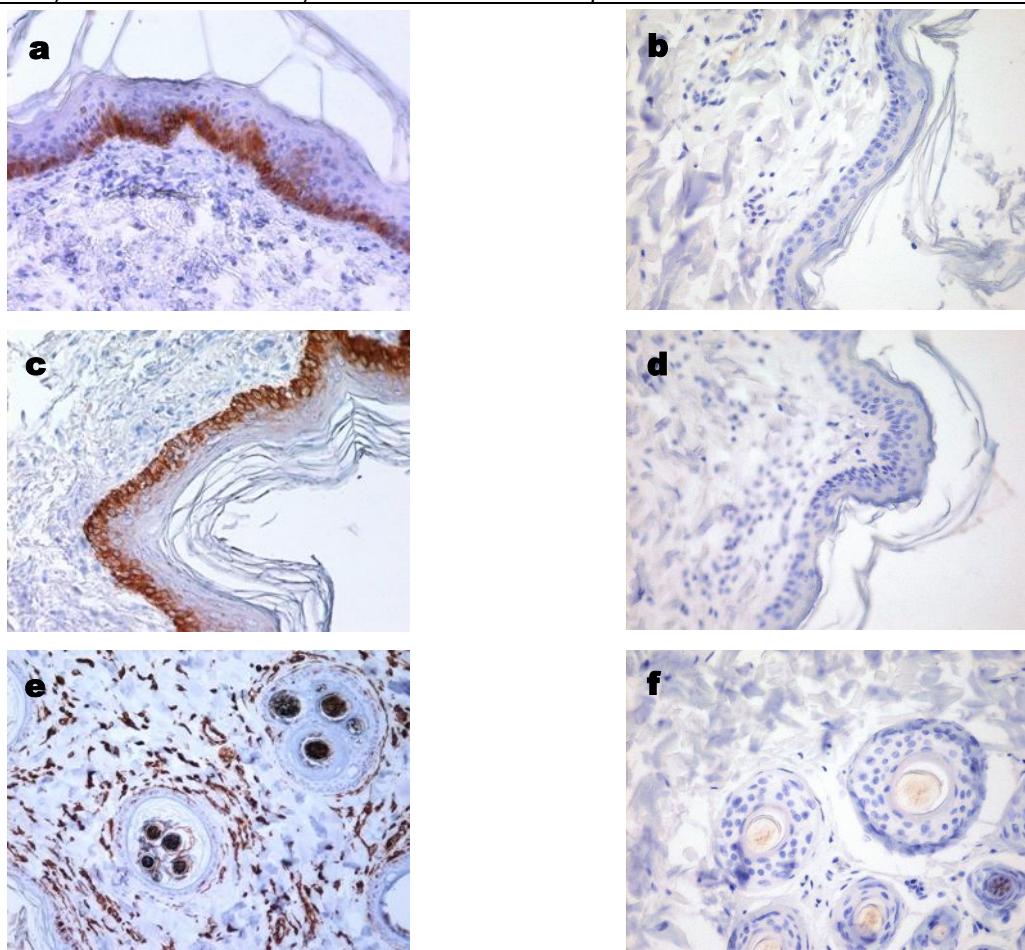
4.3.3 Rezultati imunohistokemične preiskave za bazalne celične označevalce

Z IHC preiskavo smo ugotavljali ravni izražanja keratina 5/6, keratina 14 in vimentina v 12 TMŽ, ki so bili ER⁻, PR⁻ in HER-2⁻ (Slika 1). Vseh 12 karcinomov je bilo keratin 14⁺ in vimentin⁺. Pri IHC označevanju keratina 5/6 je bilo 10 tumorjev (83,3 %) keratin 5/6⁺ in 2 (16,7 %) keratin 5/6⁻.



Slika 10: Različne ravni izražanja bazalnih celičnih označevalcev v tumorjih mlečne žleze: a–c keratin 5/6, d–f keratin 14, g–i vimentin - od leve proti desni z močno, zmerno in šibko ravnijo izražanja (IHC označevanje, 400-kratna povečava)

Figure 10: Different levels of basal cell markers expression in malignant mammary gland tumours: a–c keratin 5/6, d–f keratin 14, g–i vimentin – from left to the right with strong, moderate and weak expression (IHC staining, 400-fold magnification)



Slika 11: Pozitivne (levo) in negativne kontrole (desno) za bazalne celične označevalce: a–b keratin 5/6, c–d keratin 14, e–f vimentin (IHC označevanje, 200-kratna povečava)

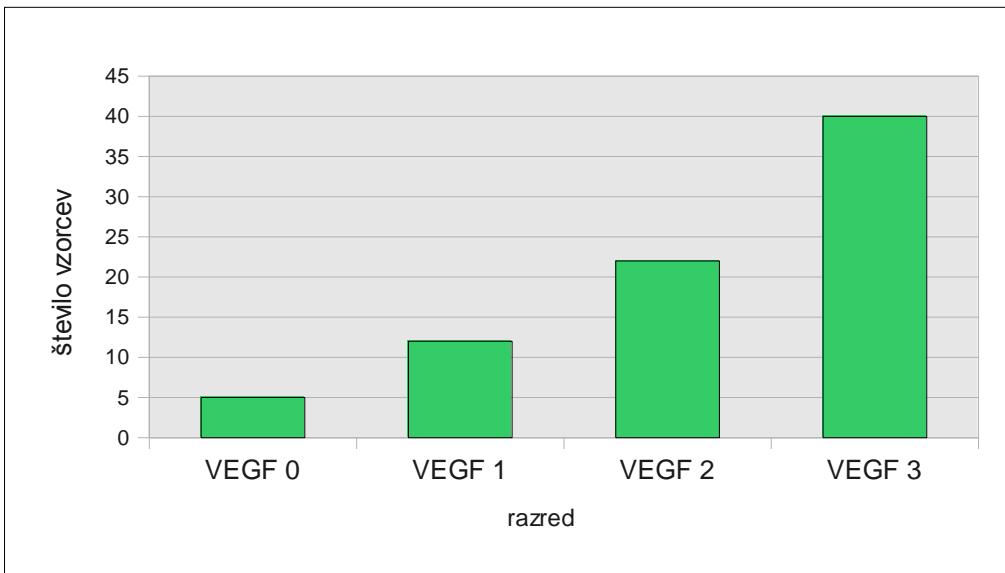
Figure 11: Positive (left) and negative controls (right) for basal cell markers. a–b keratin 5/6, c–d keratin 14, e–f vimentin (IHC staining, 200-fold magnification)

4.3.4 Rezultati imunohistokemične preiskave za vaskularni endotelijski rastni dejavnik

Od 81 IHC označenih tumorjev, 2 vzorca nista bila uporabna za oceno. Oba vzorca sta bila primer malignega mešanega TMŽ. V več zaporednih poskusih je bila barvna reakcija šibka, s slabim kontrastom.

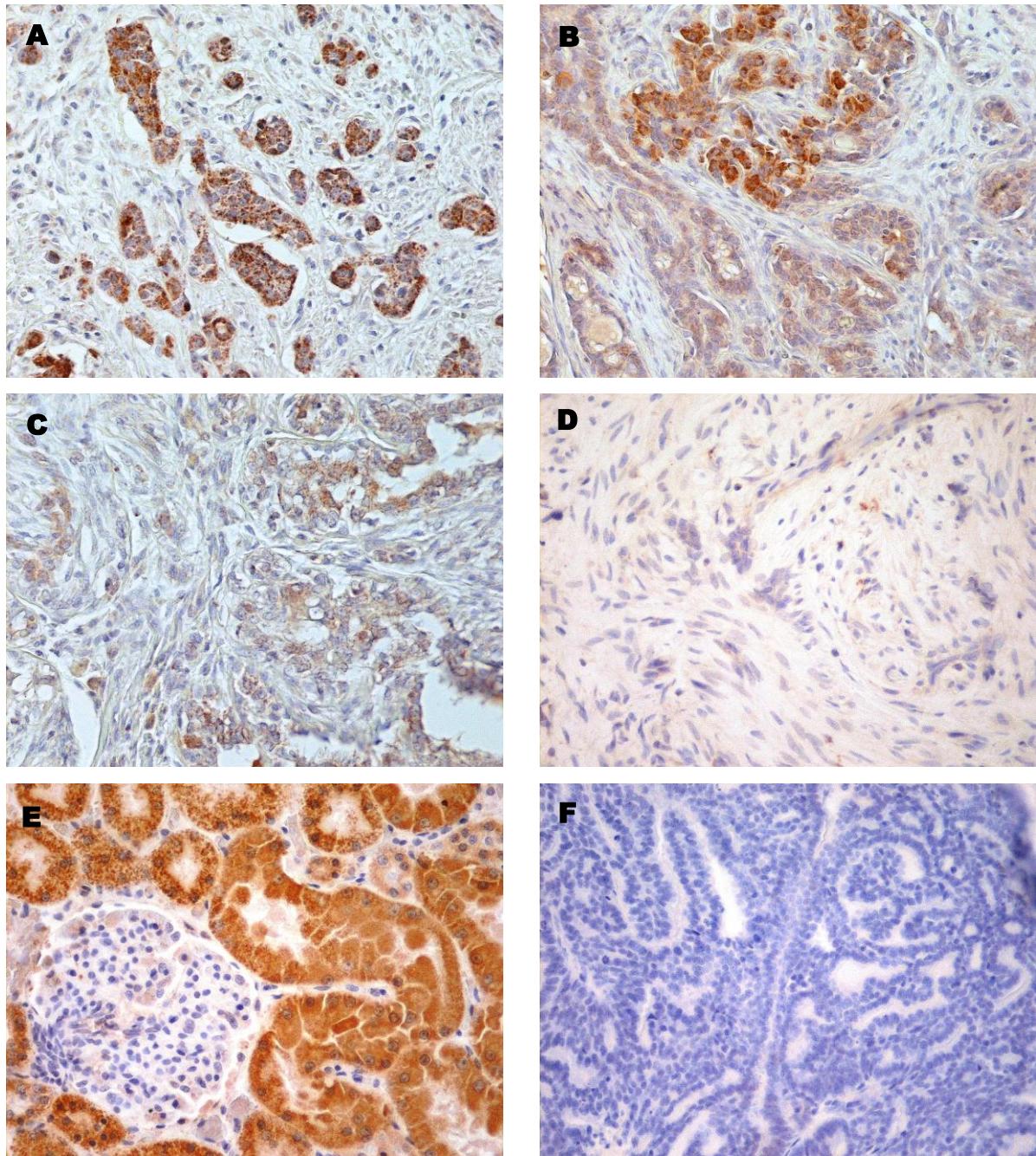
Od vseh 79 IHC označenih tumorjev se je v 6,3 % tumorjev obarvalo 25 % citoplazme tumorskih celic – tumorje smo ocenili z ravnijo izražanja VEGF 0. V 15,2 % tumorjev se je obarvalo 25 do 50 % citoplazme tumorskih celic – tumorje smo ocenili z ravnijo izražanja VEGF 1. V 27,9 % tumorjev se je obarvalo 50 do 75 % citoplazme tumorskih celic – tumorje smo ocenili z ravnijo izražanja VEGF 2. V 50,6 % tumorjev se je obarvalo več kot 75 %

citoplazme tumorskih celic – tumorje smo ocenili z ravnijo izražanja VEGF 3 (Slika 12).



Slika 12: Razpon rezultatov imunohistokemične analize izražanja vaskularnega endoteljskega rastnega dejavnika v malignih tumorjih mlečne žleze ($n = 79$)

Figure 12: The range of immunohistochemical analysis results of vascular endothelial growth factor expression in malignant mammary gland tumours ($n = 79$)

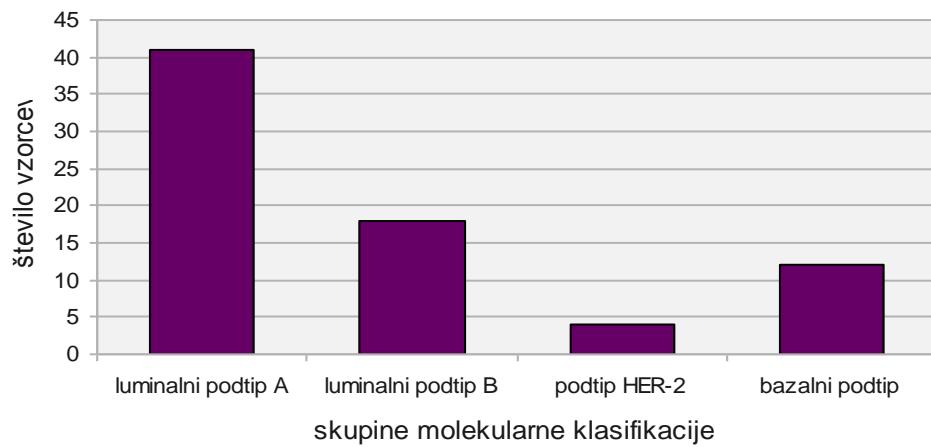


Slika 13: Različne ravni izražanja vaskularnega endotelijskega rastnega dejavnika v malignih tumorjih mlečne žleze: A močno, B zmerno, C šibko, D negativno, E pozitivna kontrola in F negativna kontrola (IHC označevanje, 200-kratna povečava)

Figure 13: Different levels of vascular endothelial growth factor expression in malignant mammary gland tumours: A strong, B moderate, C weak, D negative, E positive control, F negative control (IHC staining, 200-fold magnification)

4.3.5 Imunohistokemično razvrščanje

Po vzoru Sassi in sod. (2010) smo, na podlagi analize rezultatov IHC označevanja ER, PR, HER-2, keratina 5/6, keratina 14 in vimentina, karcinome mlečne žleze psic razdelili v štiri skupine (Slika 1). Med 75 karcinomi jih je 54,6 % luminalnega podtipa A, 24 % luminalnega podtipa B, 5,3 % podtipa HER-2 in 16 % bazalnega podtipa (Slika 14).



Slika 14: Število karcinomov mlečne žleze različnih IHC podtipov (n = 75)

Figure 14: The number of mammary gland carcinomas of different IHC subtypes (n = 75)

4.4 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE

4.4.1 Preverjanje soodvisnosti posameznih spremenljivk

S testom Pearsonovega hi-kvadrata smo analizirali 79 malignih TMŽ, v katerih smo preverili stopnjo izražanja ER, PR, HER-2 in VEGF. Ob multiplih tumorjih pri eni psici, smo posamezen tumor obravnavali kot samostojno enoto. Od vseh 79 tumorjev, za enega nismo imeli podatka o sterilizaciji psice, za dva o mestu tumorja in za pet o kliničnem stadiju. Karcinomov enostavnega/kompleksnega patohistološkega tipa je bilo skupaj 70. 72 karcinomom (enostaven, kompleksen in poseben tip) smo določili stopnjo diferenciacije. 75 karcinomov (vse maligne epitelijske tumorje) smo IHC razvrstili. Pri spremenljivki starost smo oblikovali dve skupini: psice stare manj kot 10 let in psice stare 10 let ali več, da smo dobili dve približno enako veliki skupini. Pri spremenljivki mesto tumorja smo tumorje razdelili v tri skupine: tumorji, ki so se pojavili na prvih treh mlečnih kompleksih, tumorji, ki so se pojavili na zadnjih dveh mlečnih kompleksih in difuzno razraščeni vnetni tumorji. Pri patohistološkem razvrščanju smo vse maligne mezenhimske tumorje združili v eno skupino. Preverili smo tudi soodvisnost patohistološkega tipa (enostaven/kompleksen) in patohistološkega razvrščanja s stopnjo diferenciacije tumorjev.

*Tabela 8: Razporeditev tumorjev ER⁻/ER⁺ znotraj skupin kliničnih, patohistoloških in imunohistokemičnih parametrov**Table 8: The distribution of ER⁻/ER⁺ tumours by the clinical, pathohistological and immunohistochemical parameters*

značilnost	podskupine	n	ER ⁻	ER ⁺	P
starost	< 10 let ≥ 10 let	27 52	5 (14,7 %) 29 (85,3 %)	22 (48,9 %) 23 (51,1 %)	0.020
sterilizacija	da ne	16 62	9 (27,3 %) 24 (72,7 %)	7 (15,6 %) 38 (84,4 %)	0.205
multipli	da ne	38 41	17 (50,0 %) 17 (50,0 %)	21 (46,7 %) 24 (53,3 %)	0.086
mesto tumorja	1., 2. mlečni kompleks 3., 4. in 5. mlečni kompleks vnetni	31 44 2	13 (39,4 %) 18 (54,5 %) 2 (6,1 %)	18 (40,9 %) 26 (59,1 %) 0	0.253
navidezna brejost	da ne	13 66	4 (11,8 %) 30 (88,2 %)	9 (20,0 %) 36 (80,0 %)	0.328
klinični stadij	I II III IV	35 14 10 15	12 (37,5 %) 4 (12,5 %) 5 (15,6 %) 11 (34,4 %)	23 (54,8 %) 10 (23,8 %) 5 (11,9 %) 4 (9,5 %)	0.044
patohistološko razvrščanje	in situ kompleksen enostaven tubulopapilaren enostaven soliden enostaven anaplastičen poseben tip mezenhimski	3 29 25 13 3 2 4	0 2 (5,9 %) 13 (38,2 %) 10 (29,4 %) 3 (8,8 %) 2 (5,9 %) 4 (11,8 %)	3 (6,7 %) 27 (60 %) 12 (2,7 %) 3 (6,7 %) 0 0 0	<0.001
patohistološki tip	kompleksen enostaven	29 41	2 (7,1 %) 26 (92,9 %)	27 (64,3 %) 15 (35,7 %)	<0.001
stopnja diferenciacije	I II III	30 25 17	8 (26,7 %) 9 (30,0 %) 13 (43,3 %)	22 (52,4 %) 16 (38,1 %) 4 (9,5 %)	0.003
VEGF	0 1 2 3	5 12 23 39	0 4 (11,8 %) 4 (11,8 %) 26 (76,5 %)	5 (11,1 %) 8 (17,8 %) 19 (42,2 %) 13 (28,9 %)	<0.001
PR	PR ⁻ PR ⁺	21 58	19 (55,9 %) 15 (44,1 %)	2 (4,4 %) 43 (95,6 %)	<0.001
HER-2	HER-2 ⁻ HER-2 ⁺	52 27	25 (73,5 %) 9 (26,5 %)	27 (60,0 %) 18 (40,0 %)	0.209

*statistično značilne vrednosti so krepko označene

Razporeditev tumorjev ER⁺/ER⁻ je statistično značilno različna znotraj starostnih skupin, skupin kliničnega stadija, patohistološkega razvrščanja, patohistološkega tipa in stopnje diferenciacije malignih TMŽ pri psicah ($P < 0,05$) (Tabela 8). Tumorji ER⁻ so pogostejši (85,3 %) pri psicah starih 10 let ali več. Oba vnetna karcinoma sta ER⁻. Tumorji psic kliničnega stadija I so pogosteje ER⁺ (65,7 %), tumorji psic kliničnega stadija IV pa ER⁻ (73,3 %). Vsi karcinomi *in situ* so ER⁺, karcinomi kompleksnega tipa pretežno ER⁺ (93,1%), vsi anaplastični karcinomi, karcinomi posebnega tipa in vsi maligni mezenhimski tumorji so ER⁻. Tubulopapilarni karcinomi so, glede na izražanje ER, različni od solidnih in anaplastičnih karcinomov. Solidni in anaplastični karcinomi so pogosteje ER⁻. Večji del (92,9 %) karcinomov enostavnega tipa je ER⁻, večji del (93,1 %) karcinomov kompleksnega tipa pa ER⁺. Največ tumorjev ER⁻ (43,3 %) je stopnje diferenciacije III, največ tumorjev ER⁺ (52,4 %) je stopnje diferenciacije I. V 90,5 % so tumorji ER⁻ hkrati tudi PR⁻ in 95,6 % tumorjev ER⁺ je hkrati PR⁺. 80 % tumorjev ER⁺ je z ravnijo izražanja VEGF 0, 1 in 2. Vsi tumorji z ravnijo izražanja VEGF 0 so ER⁺. Največ tumorjev ER⁻ je med tumorji z ravnijo izražanja VEGF 3 (76,5 %).

*Tabela 9: Razporeditev tumorjev PR⁻/PR⁺ znotraj skupin kliničnih, patohistoloških in imunohistokemičnih parametrov**Table 9: The distribution of PR⁻/PR⁺ tumours by the clinical, pathohistological and immunohistochemical parameter*

značilnost	podskupine	n	PR ⁻	PR ⁺	P
starost	< 10 let	27	3 (14,3 %)	24 (41,4 %)	0,025
	≥ 10 let	52	18 (85,7 %)	34 (58,6 %)	
sterilizacija	da	16	5 (23,8 %)	11 (19,3 %)	0,662
	ne	62	16 (76,2 %)	46 (80,7 %)	
multipli	da	38	10 (46,7 %)	28 (48,3 %)	0,959
	ne	41	11 (52,4 %)	30 (51,7 %)	
mesto tumorja	1., 2. mlečni kompleks	31	8 (38,1 %)	23 (41,1 %)	0,758
	3., 4., 5. mlečni kompleks	44	12 (57,1 %)	32 (57,1 %)	
	vnetni	2	1 (4,8 %)	1 (1,8 %)	
navidezna brejost	da	13	2 (9,5 %)	11 (19,0 %)	0,317
	ne	66	19 (90,5 %)	47 (81,0 %)	
klinični stadij	I	35	6 (30,0 %)	29 (53,7 %)	0,003
	II	14	1 (5,0 %)	13 (24,1 %)	
	III	10	4 (20,0 %)	6 (11,1 %)	
	IV	15	9 (45,0 %)	6 (11,1 %)	
patohistološko razvrščanje	in situ	3	0	3 (5,2 %)	<0,001
	kompleksen	29	0	29 (50,0 %)	
	enostaven tubulopapilaren	25	5 (23,8 %)	20 (34,5 %)	
	enostaven soliden	13	9 (42,9 %)	4 (6,9 %)	
	enostaven anaplastičen	3	3 (14,3 %)	0	
	posebni	2	1 (4,8 %)	1 (1,7 %)	
patohistološki tip	mezenhimski	4	3 (14,3 %)	1 (1,7 %)	<0,001
	enostaven	41	17 (100,0 %)	24 (45,3 %)	
stopnja diferenciacije	kompleksen	29	0	29 (54,7 %)	<0,001
	I	30	1 (5,6 %)	29 (53,7 %)	
	II	25	6 (33,3 %)	19 (35,2 %)	
VEGF	III	17	11 (61,1 %)	6 (11,1 %)	<0,001
	0	5	0	5 (8,6 %)	
	1	12	2 (9,5 %)	10 (17,2 %)	
	2	23	0	23 (39,7 %)	
HER-2	3	39	19 (90,5 %)	20 (34,5 %)	0,527
	HER-2 ⁻	52	15 (71,4 %)	37 (63,8 %)	
	HER-2 ⁺	27	6 (28,6 %)	21 (36,2 %)	

*statistično značilne vrednosti so krepko označene

Razporeditev tumorjev PR⁺/PR⁻ je statistično značilno različna znotraj starostnih skupin, skupin kliničnega stadija, patohistološkega razvrščanja, patohistološkega tipa in stopnje diferenciacije malignih TMŽ pri psicah ($P < 0,05$) (Tabela 9). Največ tumorjev PR⁻ (85,7 %) je pri psicah starih 10 let ali več, medtem ko so pri psicah mlajših od 10 let pogosteži tumorji PR⁺ (88,9 %). Pri psicah kliničnega stadija I, II in III so pogosteži tumorji PR⁺ (80 %), pri psicah kliničnega stadija IV pa tumorji PR⁻ (60 %). Vsi karcinomi *in situ* in karcinomi kompleksnega tipa so PR⁺. Tubulopapilarni karcinomi so večinoma PR⁺ (80 %), in obratno solidni karcinomi večinoma PR⁻ (69,2 %), medtem ko so vsi trije anaplastični karcinomi PR⁻. Skoraj vsi tumorji stopnje diferenciacije I (96,7 %) so PR⁺. Prav tako je visok delež tumorjev stopnje diferenciacije II (76 %) PR⁺, medtem ko so tumorji stopnje diferenciacije III pogosteje (64,7%) PR⁻. Vsi tumorji z ravnijo izražanja VEGF 0 in VEGF 2 in večji del tumorjev z ravnijo izražanja VEGF 1 (83,3 %) so PR⁺. Tumorji PR⁻ so večinoma (90,5 %) z ravnijo izražanja VEGF 3.

*Tabela 10: Razporeditev tumorjev HER-2-/HER-2⁺ znotraj skupin kliničnih, patohistoloških in imunohistokemičnih parametrov**Table 10: The distribution of HER-2-/HER-2⁺ tumours by the clinical, pathohistological and immunohistochemical parameters*

značilnost	podskupine	n	HER-2-	HER-2 ⁺	P
starost	< 10 let ≥ 10 let	27 52	17 (32,7 %) 35 (67,3 %)	10 (37,0 %) 17 (63,0 %)	0,699
sterilizacija	da ne	16 62	13 (25,5 %) 38 (74,5 %)	3 (11,1 %) 24 (88,9 %)	0,135
mesto tumorja	1., 2. mlečni kompleks 3., 4., 5. mlečni kompleks vnetni	31 44 2	24 (48,0 %) 25 (50,0 %) 1 (2,0 %)	7 (25,9 %) 19 (70,4 %) 1 (3,7 %)	0,166
multipli	da ne	38 41	28 (53,8 %) 24 (46,2 %)	10 (37,0 %) 17 (63,0 %)	0,156
navidezna brejost	da ne	13 66	9 (17,3 %) 43 (82,7 %)	4 (14,8 %) 23 (85,2 %)	0,777
klinični stadij	I II III IV	35 14 10 15	24 (48,0 %) 9 (18,0 %) 7 (14,0 %) 10 (20,0 %)	11 (45,8 %) 5 (20,8 %) 3 (12,5 %) 5 (20,8 %)	0,990
patohistološko razvrščanje	in situ kompleksen enostaven tubulopapilaren enostaven soliden enostaven anaplastičen posebni mezenhimski	3 29 25 13 3 2 4	1 (1,9 %) 18 (34,6 %) 18 (34,6 %) 9 (17,3 %) 2 (3,8 %) 1 (1,9 %) 3 (5,8 %)	2 (7,4 %) 11 (40,7 %) 7 (25,9 %) 4 (14,8 %) 1 (3,7 %) 1 (3,7 %) 1 (3,7 %)	0,874
patohistološki tip	enostaven kompleksen	41 29	29 (61,7 %) 18 (38,3 %)	12 (52,2 %) 11 (47,8 %)	0,447
stopnja diferenciacije	I II III	30 25 17	20 (41,7 %) 16 (32,7 %) 13 (26,5 %)	10 (41,7 %) 10 (38,5 %) 4 (15,4 %)	0,546
VEGF	0 1 2 3	5 12 23 39	3 (5,8 %) 9 (17,3 %) 14 (26,9 %) 26 (50,0 %)	2 (7,4 %) 3 (11,1 %) 9 (33,3 %) 13 (48,1 %)	0,852

Razporeditev tumorjev HER-2-/HER-2⁺ znotraj skupin kliničnih, patohistoloških in imunohistokemičnih parametrov ni statistično značilno različna ($P > 0,05$) (Tabela 10).

*Tabela 11: Razporeditev tumorjev VEGF 0/VEGF 1/VEGF 2 in VEGF 3 znotraj skupin kliničnih, patohistoloških in imunohistokemičnih parametrov**Table 11: The distribution of VEGF 0/VEGF 1/VEGF 2 in VEGF 3 tumours by the clinical, pathohistological and immunohistochemical parameters*

značilnost	podskupine	n	VEGF 0	VEGF 1	VEGF 2	VEGF 3	P
starost	< 10 let ≥ 10 let	27 52	4 (80,0 %) 1 (20,0 %)	3 (25,0 %) 9 (75,0 %)	13 (56,5 %) 10 (43,5 %)	7 (17,9 %) 32 (82,1 %)	0,002
sterilizacija	da ne	16 62	0 5 (100,0 %)	1 (8,3 %) 11 (91,7 %)	4 (18,2 %) 18 (81,8 %)	11 (28,2 %) 28 (71,8 %)	0,276
mesto tumorja	1., 2., 3. mlečni kompleks 4., 5. mlečni kompleks vnetni	31 44 2	3 (60,0 %) 2 (40,0 %) 0	4 (33,3 %) 8 (66,7 %) 0	8 (38,1 %) 13 (61,9 %) 0	16 (41,0 %) 21 (53,8 %) 2 (5,1 %)	0,782
multipli	da ne	38 41	2 (40,0 %) 3 (60,0 %)	5 (41,7 %) 7 (58,3 %)	11 (47,8 %) 12 (52,2 %)	20 (51,3 %) 19 (48,7 %)	0,921
klinični stadij	I II III IV	35 14 10 15	4 (80,0 %) 0 1 (20,0 %) 0	4 (33,3 %) 4 (33,3 %) 2 (16,7 %) 2 (16,7 %)	12 (57,1 %) 3 (14,3 %) 4 (19,0 %) 2 (9,5 %)	15 (41,7 %) 7 (19,4 %) 3 (8,3 %) 11 (30,6 %)	0,319
navidezna brejost	da ne	13 66	1 (20,0 %) 4 (80,0 %)	0 12 (100,0 %)	7 (30,4 %) 16 (69,6 %)	5 (12,8 %) 34 (87,2 %)	0,109
patohistološko razvrščanje	in situ kompleksen enostaven tubulopapilaren enostaven soliden enostaven anaplastičen posebni mezenhimski	3 29 25 13 3 2 4	1 (20,0 %) 3 (60,0 %) 1 (20,0 %) 0 0 0 0	0 7 (58,3 %) 2 (16,7 %) 1 (8,3 %) 0 1 (8,3 %) 0 1 (8,3 %)	1 (4,3 %) 15 (65,2 %) 6 (26,1 %) 1 (4,3 %) 0 0 0	1 (2,6 %) 4 (10,3 %) 16 (41,0 %) 11 (28,2 %) 3 (7,7 %) 1 (2,6 %) 3 (7,7 %)	0,008
patohistološki tip	enostaven kompleksen	41 29	1 (25,0 %) 3 (75,0 %)	3 (30,0 %) 7 (70,0 %)	7 (31,8 %) 15 (68,2 %)	30 (88,2 %) 4 (11,8 %)	<0,001
stopnja diferenciacije	I II III	30 25 17	1 (25,0 %) 3 (75,0 %) 0	6 (54,5 %) 4 (36,4 %) 1 (9,1 %)	13 (59,1 %) 6 (27,3 %) 3 (13,6 %)	10 (28,6 %) 12 (34,3 %) 13 (37,1 %)	0,073
ER	ER ⁻ ER ⁺	34 45	0 5 (100,0 %)	4 (33,3 %) 8 (66,7 %)	4 (17,4 %) 19 (82,6 %)	26 (66,7 %) 13 (33,3 %)	<0,001
PR	PR ⁻ PR ⁺	21 58	0 5 (100,0 %)	2 (16,7 %) 10 (83,3 %)	0 23 (100,0 %)	19 (48,7 %) 20 (51,3 %)	<0,001

*statistično značilne vrednosti so krepko označene

Razporeditev tumorjev VEGF 0/VEGF 1/VEGF 2/VEGF 3 je statistično značilno različna znotraj starostnih skupin, skupin patohistološkega razvrščanja in patohistološkega tipa malignih TMŽ pri psicah ($P < 0,05$) (Tabela 11). Tumorji z ravnijo izražanja VEGF 0 so po patohistološkem razvrščanju karcinomi *in situ*, karcinomi kompleksnega tipa in tubulopapilarni karcinomi. Vsi anaplastični karcinomi, večji delež solidnih karcinomov (84,6 %) in večji delež malignih mezenhimskih tumorjev (75 %) so tumorji z ravnijo izražanja VEGF 3. Večji del tumorjev (88,2 %) z ravnijo izražanja VEGF 3 so karcinomi enostavnega patohistološkega tipa, medtem ko je med karcinomi kompleksnega tipa največ tumorjev z ravnijo izražanja VEGF 0, 1 in 2 (86,2 %). Vsi tumorji z ravnijo izražanja VEGF 0 so ER⁺ in PR⁺. Tumorji z ravnijo izražanja VEGF 1 in 2 so predvsem ER⁺ (77,1 %) in PR⁺ (94,3 %). Tumorji z ravnijo izražanja VEGF 3 so predvsem ER⁻ (66,7 %).

*Tabela 12: Razporeditev tumorjev A/luminalnega podtipa B/podtipa HER-2/bazalnega podtipa znotraj skupin kliničnih, patohistoloških in imunohistokemičnih parametrov**Table 12: The distribution of luminal subtype A/luminal subtype B/subtype HER-2/basal subtype tumours by the clinical, pathohistological and immunohistochemical parameters*

značilnost	podskupine	n	luminalni podtip A	luminalni podtip B	podtip HER-2	bazalni podtip	p
starost	< 10 let ≥ 10 let	27 48	17 (41,5 %) 24 (58,5 %)	7 (38,9 %) 11 (61,1 %)	1 (25,0 %) 3 (75 %)	2 (16,7 %) 10 (83,3 %)	0,431
sterilizacija	da ne	16 58	11 (27,5 %) 29 (72,5 %)	1 (5,6 %) 17 (94,4 %)	1 (25,0 %) 3 (75,0 %)	3 (25,0 %) 9 (75,0 %)	0,300
mesto tumorja	1., 2. mlečni kompleks 3., 4., 5. mlečni kompleks vnetni	28 43 2	15 (38,5 %) 23 (59,0 %) 1 (2,6 %)	7 (38,9 %) 11 (61,1 %) 0	0 3 (75,0 %) 1 (25,0 %)	6 (50,0 %) 6 (50,0 %) 0	0,110
multipli	da ne	37 38	21 (51,2 %) 20 (48,8 %)	8 (44,4 %) 10 (55,6 %)	2 (50,0 %) 2 (50,0 %)	6 (50,0 %) 6 (50,0 %)	0,972
navidezna brejost	da ne	13 62	7 (17,1 %) 34 (82,9 %)	4 (22,2 %) 14 (77,8 %)	0 4 (100,0 %)	2 (16,7 %) 10 (83,3 %)	0,766
klinični stadij	I II III IV	34 14 8 14	20 (51,3 %) 8 (20,5 %) 5 (12,8 %) 6 (15,4 %)	9 (56,3 %) 5 (31,3 %) 1 (6,3 %) 1 (6,3 %)	0 0 1 (33,3 %) 2 (66,7 %)	5 (41,7 %) 1 (8,3 %) 1 (8,3 %) 5 (41,7 %)	0,120
patohistološka diagnostika	in situ kompleksen enostaven tubulopapilaren enostaven soliden enostaven anaplastičen posebni	3 29 25 13 3 2	3 (7,3 %) 19 (46,3 %) 15 (36,6 %) 2 (4,9 %) 0 2 (4,9 %)	0 10 (55,6 %) 6 (33,3 %) 2 (11,1 %) 0 0	0 0 1 (25,0 %) 2 (50,0 %) 1 (25,0 %) 0	0 0 3 (25,0 %) 7 (58,3 %) 2 (16,7 %) 0	<0,001
patohistološki tip	enostaven kompleksen	41 29	17 (47,2 %) 19 (52,6 %)	8 (44,4 %) 10 (55,6 %)	4 (100,0 %) 0	12 (100,0 %) 0	0,002
stopnja diferenciacije	I II III	30 25 17	21 (55,3 %) 14 (34,2 %) 4 (10,5 %)	8 (44,4 %) 8 (44,5 %) 2 (11,1 %)	1 (25,0 %) 1 (25,0 %) 2 (50,0 %)	0 3 (25,0 %) 9 (75,0 %)	<0,001
VEGF	0 1 2 3	5 11 23 36	4 (9,8 %) 8 (19,5 %) 16 (39,0 %) 13 (31,7 %)	1 (5,6 %) 2 (11,1 %) 7 (38,9 %) 8 (44,4 %)	0 1 (25,0 %) 0 3 (75,0 %)	0 0 0 12 (100,0 %)	0,015

*statistično značilne vrednosti so krepko označene

Razporeditev karcinomov različnih IHC podtipov je statistično značilno različna znotraj skupin patohistološkega razvrščanja, patohistološkega tipa in stopnje diferenciacije malignih TMŽ pri psicah ($P < 0,05$) (Tabela 12). Vsi karcinomi *in situ* so luminalnega podtipa A, vsi karcinomi kompleksnega tipa luminalnega podtipa A (65,5 %) in luminalnega podtipa B (34,5 %). Delež karcinomov kompleksnega tipa je višji (55,6 %) med karcinomi luminalnega podtipa B. Tubulopapilarni karcinomi so predvsem luminalnega podtipa A in B (82,9 %). Anaplastični karcinomi so podtipa HER-2 (33,3 %) in bazalnega podtipa (66,7 %). Oba karcinoma posebnega tipa sta luminalnega podtipa A. Med karcinomi bazalnega podtipa in karcinomi podtipa HER-2 so samo karcinomi enostavnega tipa. Med karcinomi luminalnega podtipa A in B je večji delež tumorjev stopnje diferenciacije I in II (96,7 % in 84 %), med karcinomi bazalnega podtipa pa večji delež tumorjev stopnje diferenciacije III (75 %). Med karcinomi bazalnega podtipa je največ tumorjev stopnje diferenciacije III (52,9 %). Vsi tumorji z ravnijo izražanja VEGF 0 so luminalnega podtipa A in B. 75 % vseh karcinomov podtipa HER-2 in vsi karcinomi bazalnega podtipa močno izražajo VEGF (tumorji VEGF 3).

4.4.2 Preveranje soodvisnosti patohistološkega razvrščanja in stopnje diferenciacije

Želeli smo preveriti soodvisnost obeh patohistoloških ocen – patohistološkega razvrščanja in stopnje diferenciacije, zato smo s testom Pearsonovega hi-kvadrata ugotavljali razporeditev tumorjev različnih stopenj proliferacije (I-III) v posameznih skupinah patohistološkega razvrščanja.

Tabela 13: Razporeditev karcinomov enostavnega/kompleksnega tipa znotraj skupin stopnje diferenciacije

Table 13: The distribution of simple/complex type carcinomas by the histological grade groups

patohistološki tip tumorja	stopnja diferenciacije I	stopnja diferenciacije II	stopnja diferenciacije III	P
kompleksen	19 (65,5 %)	8 (27,6 %)	2 (6,9 %)	0,001
enostaven	10 (24,4 %)	16 (39,0 %)	15 (36,6 %)	

Tabela 14: Razporeditev tumorjev različnih patohistoloških tipov znotraj skupin stopnje diferenciacije

Table 14: The distribution of tumours of different histopathological subtype by the histological grade groups

patohistološki tip tumorja	stopnja diferenciacije I	stopnja diferenciacije II	stopnja diferenciacije III	P
kompleksen	19 (65,5 %)	8 (27,6 %)	2 (6,9 %)	<0,001
enostaven tubulopapilaren	10 (40,0 %)	13 (52,0 %)	2 (8,0%)	
enostaven soliden	0	2 (15,4%)	11 (84,6 %)	
enostaven anaplastičen	0	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	
poseben tip	1 (50,0 %)	1 (50,0 %)	0	

Patohistološki tip (enostaven/kompleksen) in patohistološko razvrščanje sta statistično značilno povezana s stopnjo diferenciacije tumorjev ($P < 0,05$). Karcinomi kompleksnega tipa so večinoma (65,5 %) stopnje diferenciacije I, karcinomi enostavnega tipa pa večinoma (39,0 %) stopnje diferenciacije II (Tabela 13). Ob delitvi karcinomov enostavnega tipa na posamezne podskupine, so tubulopapilarni karcinomi večinoma (52,0 %) stopnje diferenciacije II, solidni in anaplastični karcinomi pa stopnje diferenciacije III (84,6 % in 66,7 %) (Tabela 14).

4.4.3 Preverjanje korelacij med ravnimi izražanja celičnih označevalcev

Korelacije med ravnimi izražanja celičnih označevalcev VEGF, ER, PR in HER-2 smo preverili z izračunom Spearmanovega koeficiente korelacije. Pri tem testu nismo upoštevali mejnih vrednosti za posamezen celični označevalec, ampak delež pozitivnih tumorskih celic, določen ob analizi rezultatov IHC preiskave. Od vseh 81 tumorjev, smo analizirali 79 malignih TMŽ, ker za dva maligna mešana tumorja zaradi neustrezne IHC reakcije nismo imeli podatka o ravni izražanja celičnih označevalcev.

Tabela 15: Spearmanov koeficient korelacije izražanja VEGF, ER, PR in HER-2

Table 15: Spearman's rank correlation coefficient between VEGF, ER, PR and HER-2 expression

		VEGF	ER	PR	HER-2
VEGF	r _s P n	1,000 0,014 78	-0,277 <0,001 78	-0,387 <0,001 78	-0,050 0,662 78
ER	r _s P n	-0,277 0,014 78	1,000 78	0,579 <0,001 78	0,221 0,050 78
PR	r _s P n	-0,387 <0,001 78	0,579 <0,001 78	1,000 78	0,218 0,054 78
HER-2	r _s P n	-0,050 0,662 78	0,221 0,050 78	0,218 0,054 78	1,000 78

r_s = Spearmanov koeficient korelacije

P = statistična značilnost

n = število vzorcev

*statistično značilne vrednosti so krepko označene

Pozitivna korelacija med Izražanjem ER in PR v vzorcih malignih TMŽ je statistično značilna (P < 0,05). Negativna korelacija med izražanjem ER in VEGF in PR in VEGF je statistično značilna (P < 0,05). Pozitivna korelacija med izražanjem ER in HER-2 in PR in HER-2 je na meji statistične značilnosti (P = 0,050 oziroma P = 0,054) (Tabela 15).

4.4.4 Preverjanje povezanosti posameznih spremenljivk s preživetjem psic

Analizo preživetja smo naredili z metodo po Kaplan - Meierju. V analizo smo vključili vseh 72 psic, med temi za štiri psice nismo imeli podatka o preživetju dveh let po kirurški odstranitvi TMŽ. Pri multiplih tumorjih ene psice smo v analizo vključili tumor, ki je bil po patohistološkem razvrščanju najbolj malign (Pena in sod., 2013). Dve leti po kirurški odstranitvi TMŽ je bilo 37 psic (54,4 %) še vedno živih in se bolezen ni ponovila, 16 (23,5 %) jih je poginilo zaradi TMŽ, 8 (11,8 %) zaradi drugega vzroka, pri 7 (10,3 %) se je bolezen ponovila.

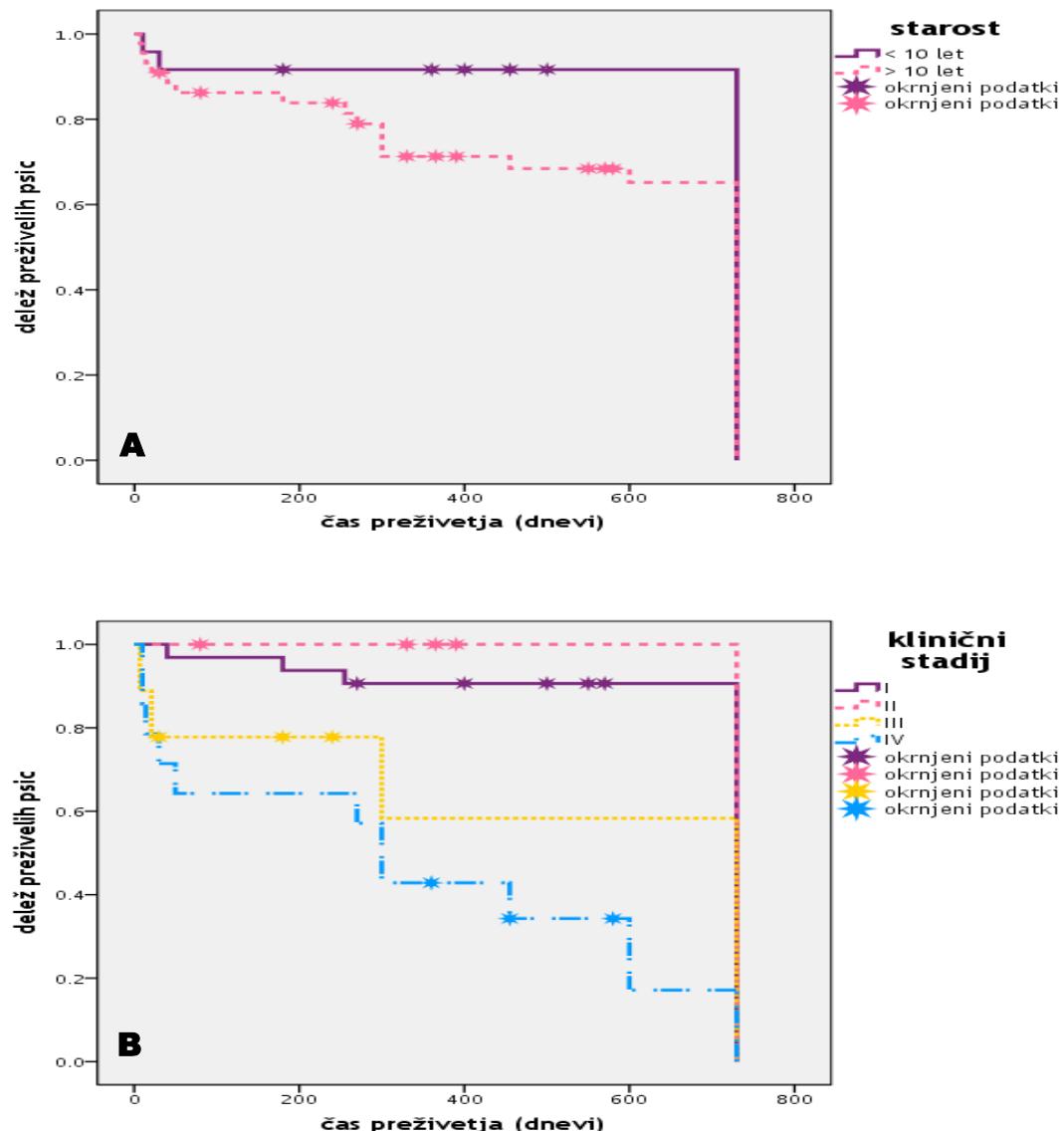
Upoštevali smo le podskupine posameznih spremenljivk, kjer je bilo število vzorcev več kot tri, kar je dovolj za minimalno velikost vzorca, potrebnega za statistično analizo. Pri preverjanju povezave preživetja glede na mesto TMŽ nismo upoštevali dveh vnetnih karcinomov. Pri preverjanju povezave preživetja z IHC razvrščanjem nismo upoštevali treh primerov karcinomov podtipa HER-2. Pri preverjanju povezave preživetja s patohistološkim razvrščanjem nismo upoštevali dveh primerov karcinomov posebnega tipa in treh primerov karcinomov *in situ* in anaplastičnih karcinomov. Trije primeri anaplastičnih karcinomov so bili upoštevani pri delitvi na enostaven/kompleksen patohistološki tip. Karcinomov enostavnega/kompleksnega tipa je bilo 57, karcinomov z določeno stopnjo diferenciacije 62 in karcinomov z določenim IHC podtipom 59. Za dva maligna mešana tumorja nismo imeli podatkov o ravni izražanja ER, PR, HER-2 in VEGF.

*Tabela 16: Analiza povezave preživetja po testu log-rank s spremenljivkami, ki bi lahko vplivale na preživetje psic dve leti po kirurški odstranitvi tumorjev mlečne žleze**Table 16: Log-rank test for variables possibly associated with the survival of bitches two years after surgical removal of mammary gland tumours*

spremenljivka	N	skupine	število psov (%)	čas preživetja (dnevi) (srednja vrednost in standardni odklon)	P
starost	68	< 10 let > 10 let	24 (35,3) 44 (64,7)	670,8 ± 41,2 551,7 ± 42,0	0,033
sterilizacija	68	da ne	14 (20,6) 54 (79,4)	605,5 ± 68,0 591,8 ± 35,7	0,865
navidezna brejost	68	da ne	11 (16,2) 57 (83,8)	604,5 ± 85,1 592,4 ± 33,9	0,626
multipli	68	da ne	29 (42,6) 39 (57,4)	582,0 ± 49,3 605,8 ± 40,6	0,596
mesto tumorja	66	1., 2. mlečni kompleks 3., 4., 5. mlečni kompleks	29 (42,7) 37 (54,4)	627,6 ± 43,4 594,0 ± 42,9	0,497
klinični stadij	68	I II III IV	32 (47,1) 13 (19,1) 9 (13,2) 14 (20,6)	676,4 ± 30,4 730,0 ± 0,0 487,3 ± 121,8 337,3 ± 78,3	<0,001
patohistološko razvrščanje	60	kompleksen tip enostaven tubulopapilaren enostaven soliden mezenhimski	22 (32,4) 19 (27,9) 13 (19,1) 6 (8,8)	730,0 ± 0,0 658,1 ± 40,5 472,3 ± 88,6 377,5 ± 161,0	<0,001
patohistološki tip	57	kompleksen enostaven	22 (38,6) 35 (61,4)	730,0 ± 0,0 541,3 ± 47,8	0,002
stopnja diferenciacije	59	I II III	24 (41,9) 21 (35,5) 14 (22,6)	730,0 ± 0,0 602,0 ± 52,6 412,3 ± 84,9	<0,001
VEGF	66	0 1 2 3	5 (7,5) 10 (15,2) 17 (25,8) 34 (51,5)	730,0 ± 0,0 730,0 ± 0,0 730,0 ± 0,0 488,6 ± 51,4	<0,001
ER	66	ER ⁻ ER ⁺	29 (43,9) 37 (56,1)	452,8 ± 58,1 716,9 ± 13,2	<0,001
PR	66	PR ⁻ PR ⁺	20 (30,3) 46 (69,7)	342,3 ± 70,0 709,5 ± 14,3	<0,001
HER-2	66	HER-2 ⁻ HER-2 ⁺	44 (66,7) 22 (33,3)	597,8 ± 38,6 610,0 ± 52,5	0,951
IHC razvrščanje	59	luminalni podtip A luminalni podtip B bazalni podtip	33 (53,2) 14 (22,6) 12 (19,4)	702,3 ± 19,4 694,6 ± 35,7 344,9 ± 89,1	<0,001

*statistično značilne vrednosti so krepko označene

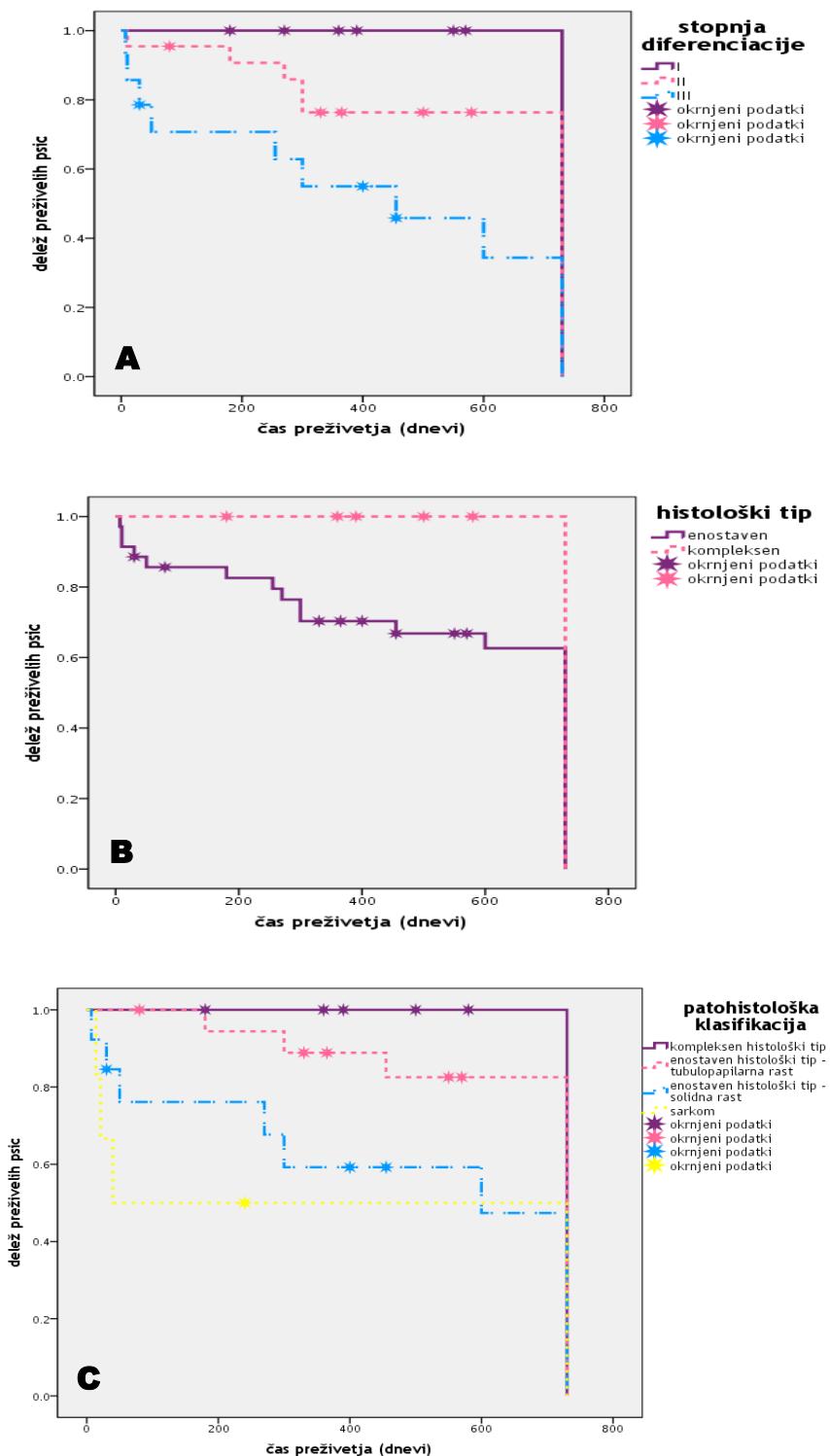
Od vseh proučenih spremenljivk so starost, klinični stadij, patohistološko razvrščanje, patohistološki tip (enostaven/kompleksen), stopnja diferenciacije, VEGF, ER, PR in IHC razvrščanje statistično značilno povezani s preživetjem psic z malignimi TMŽ ($P < 0,05$) (Tabela 16). Vsako teh spremenljivk smo ponazorili s krivuljo preživetja po Kaplan - Meierju.



Slika 15: Krivulje preživetja, po Kaplan - Meierju, psic starih manj kot 10 let in 10 let ali več (A) in psic kliničnega stadija I, II, III in IV (B)

Figure 15: Kaplan - Meier survival curve for bitches aged less than 10 years and 10 years or more (A), and for bitches with clinical stages I, II, III and IV (B)

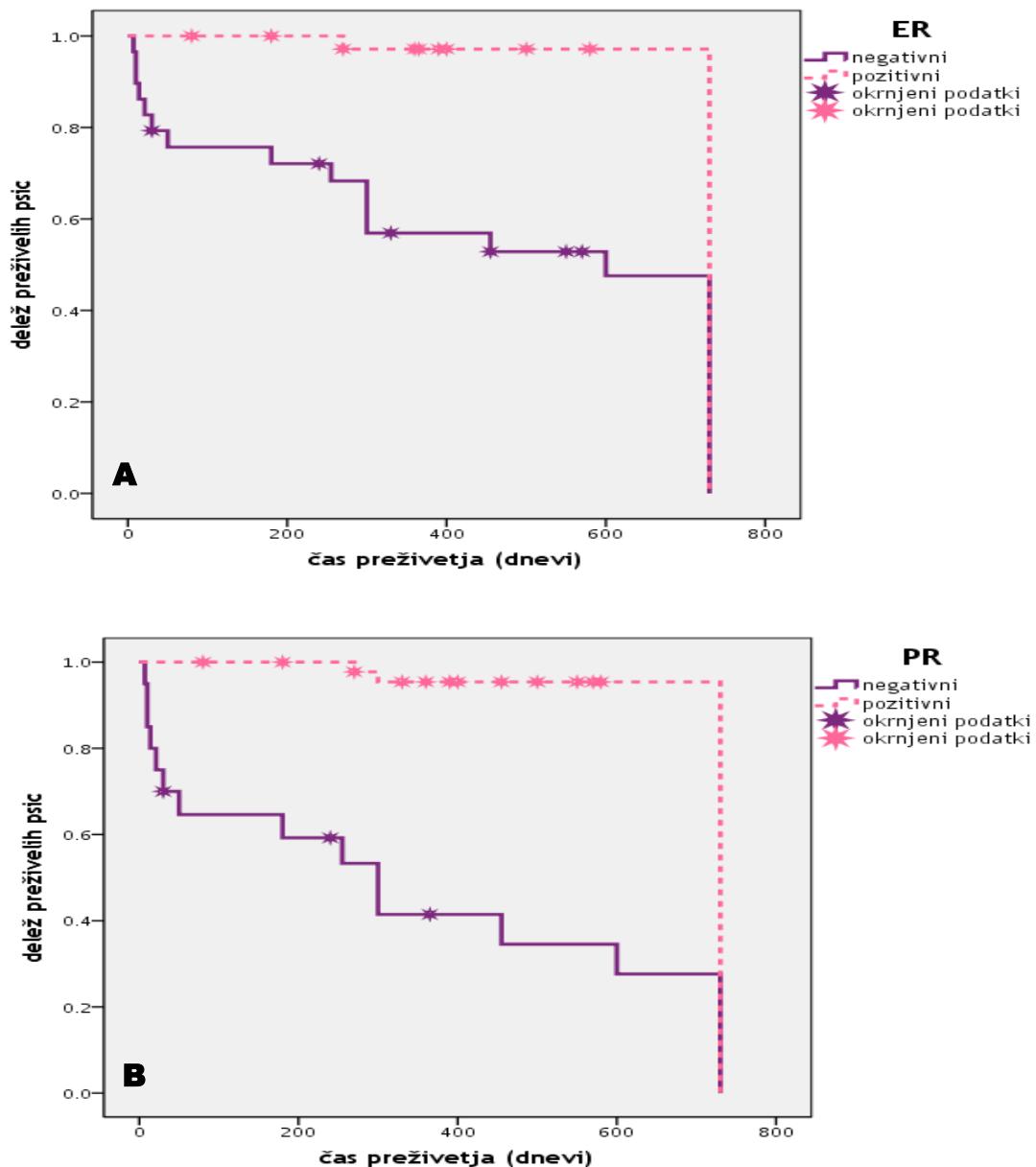
Razlika med krivuljama preživetja psic, starih manj kot 10 let, in psic, starih 10 let ali več, je statistično značilna ($P < 0,05$) (Slika 15, A). Krivulja preživetja psic kliničnega stadija I se statistično značilno ne razlikuje od krivulje preživetja psic kliničnega stadija II ($P > 0,05$), obe krivulji se statistično značilno razlikujeta od krivulj preživetja psic kliničnega stadija III in IV ($P < 0,05$). Razlika v preživetju psic kliničnega stadija III in IV ni statistično značilna ($P > 0,05$) (Slika 15, B). Vse psice kliničnega stadija II so preživele dve leti po kirurški odstranitvi tumorjev, tri psice kliničnega stadija I so poginile (Tabela 16).



Slika 16: Krivulje preživetja, po Kaplan - Meierju, psic s tumorji različnih patohistoloških značilnosti: A stopnja diferenciacije, B histološki tip, C patohistološko razvrščanje

Figure 16: Kaplan - Meier survival curves for bitches with tumours of different histopathological characteristics: A histological grade, B histopathological type, C histopathological classification

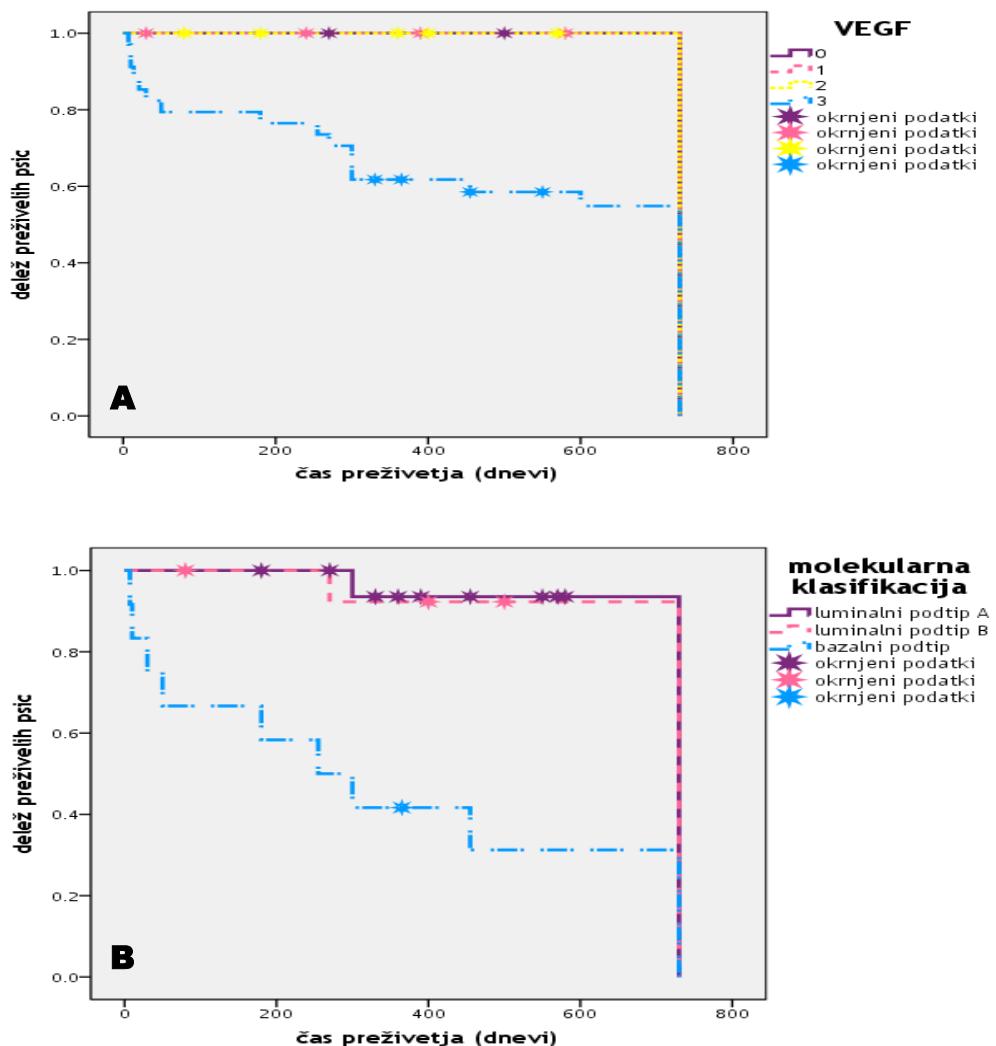
Krivulja preživetja psic s tumorji stopnje diferenciacije I se statistično značilno razlikuje od krivulje preživetja psic s tumorji stopnje diferenciacije II in III ($P < 0,05$). Statistično značilna je razlika med krivuljama preživetja psic s tumorji stopnje diferenciacije II in III ($P < 0,05$) (Slika 16, A). Statistično značilna je razlika med krivuljama preživetja psic s karcinomi enostavnega in kompleksnega tipa ($P < 0,05$) (Slika 16, B). Krivulja preživetja psic s karcinomi kompleksnega tipa se statistično značilno razlikuje od krivulje preživetja psic s solidnimi karcinomi in psic z malignimi mezenhimskimi tumorji ($P < 0,05$), ne pa od krivulje preživetja psic s tubulopapilarnimi karcinomi ($P > 0,05$). Krivulja preživetja psic s tubulopapilarnimi karcinomi se statistično značilno razlikuje od krivulje preživetja psic s solidnimi karcinomi in psic z malignimi mezenhimskimi tumorji ($P < 0,05$). Razlika med krivuljama preživetja psic s solidnimi karcinomi in psic z malignimi mezenhimskimi tumorji ni statistično značilna ($P > 0,05$) (Slika 16, C). Vse psice s karcinomi kompleksnega tipa so preživele dve leti po kirurški odstranitvi TMŽ (Tabela 16).



Slika 17: Krivulje preživetja, po Kaplan – Meierju, psic s tumorji ER^+/ER^- (A) in tumorji PR^+/PR^- (B)

Figure 17: Kaplan - Meier survival curves for bitches with ER^+/ER^- tumours (A) and PR^+/PR^- tumours (B)

Krivulja preživetja psic s tumorji ER^- se statistično značilno razlikuje od krivulje preživetja psic s tumorji ER^+ (Slika 17, A) in krivulja preživetja psic s tumorji PR^- se statistično značilno razlikuje od krivulje preživetja psic s tumorji PR^+ ($P < 0,05$) (Slika 17, B).



Slika 18: Krivulje preživetja, po Kaplan - Meierju, psic s tumorji različne ravni izražanja vaskularnega endoteljskega rastnega dejavnika (A) in tumorji različnih IHC podtipov (B)

Figure 18: Kaplan - Meier survival curves for bitches with tumours with different levels of vascular endothelial growth factor expression (A) and tumours of different IHC subtypes (B)

Med krivuljami preživetja psic s tumorji VEGF 0, 1 in 2 ni statistično značilnih razlik (Slika 18, A) – vse psice so preživele dve leti po kirurški odstranitvi TMŽ (Tabela 16). Krivulja preživetja psic s tumorji VEGF 3 se statistično značilno razlikuje od krivulj preživetja psic s tumorji VEGF 0, VEGF 1 in VEGF 2 ($P < 0,05$) (Slika 18, A). Krivulji preživetja psic s karcinomi luminalnega podtipa A in luminalnega podtipa B se statistično značilno razlikujeta od krivulje preživetja psic s karcinomi basalnega podtipa ($P < 0,05$). Razlika med krivuljama preživetja psic s karcinomi luminalnega podtipa A in B ni statistično značilna ($P > 0,05$) (Slika 18, B).

4.4.5 Preverjanje najmočnejših prognostičnih dejavnikov

Z multivariatno analizo smo izdelali dva različna modela. V prvem smo upoštevali vse spremenljivke, ki so bile v analizi po Kaplan - Meierju statistično značilno povezane s preživetjem (Tabela 16) (starost, klinični stadij, patohistološko razvrščanje, patohistološki tip, stopnja diferenciacije, VEGF, ER in PR), razen IHC razvrstiteve. IHC razvrstiteve nismo upoštevali, ker je bila postavljena na podlagi izražanja ER, PR in smo upoštevali posamezne celične označevalce.

Tabela 17: Rezultati multivariatne analize prvega modela – klinični stadij in PR kot najmočnejša prognostična dejavnika za preživetje psic z malignimi tumorji mlečne žleze

Table 17: Results of multivariate analysis of the first model – clinical stage and PR as the strongest prognostic factors for the survival of bitches with malignant mammary gland tumours

spremenljivka	skupine	število psov (%)	relativno tveganje	95 % intervali zaupanja	P
klinični stadij	I	30 (45,5)	0,223	0,098–0,506	0,003
	II	13 (19,7)	0,271	0,101–0,731	<0,001
	III	9 (13,6)	0,490	0,168–1,428	0,010
	IV	14 (21,2)	referenčna vrednost		0,191
PR	PR ⁺	20 (30,3)	3,114	1,601–6,059	0,001
	PR ⁻	46 (69,7)	referenčna vrednost		

*statistično značilne vrednosti so krepko označene

Po prvem modelu sta najmočnejša prognostična dejavnika za preživetje psic z malignimi TMŽ klinični stadij in PR (Tabela 17). Relativno tveganje pri psicah kliničnega stadija III ni statistično značilno nižje kot pri psicah kliničnega stadija IV ($P > 0,05$). Tveganje za pogin je pri psicah kliničnega stadija I in II, 4,5 in 3,7-krat manjše kot pri psicah kliničnega stadija IV, medtem ko je razmerje pri psicah kliničnega stadija III 2,2-krat manjše. Pri psicah s tumorji PR⁻ je tveganje 3,1-krat večje v primerjavi s psicami s tumorji PR⁺ (Tabela 17).

Z drugim modelom smo žeeli med seboj primerjati klinično in patohistološko diagnostiko z IHC razvrščanjem. Pri analizi smo upoštevali klinični stadij, IHC razvrščanje in stopnjo diferenciacije. Patohistološko razvrščanje je bilo zaradi malo vzorcev ($n \leq 3$) v posameznih podskupinah nepopolno, stopnja diferenciacije je bila v analizi preživetja po Kaplan - Meierju močnejši prognostičen dejavnik kot patohistološki tip (Tabela 16).

Tabela 18: Rezultati multivariantne analize drugega modela – klinični stadij in IHC razvrščanje kot najmočnejša prognostična dejavnika za preživetje psic z malignimi tumorji mlečne žleze

Table 18: Results of multivariate analysis of the second model – clinical stage and IHC classification as the strongest prognostic factors for the survival of bitches with malignant mammary gland tumours

spremenljivka	skupine	število psov (%)	relativno tveganje	95 % intervali zaupanja	P
klinični stadij	I	29 (49,2)	0,245	0,100 – 0,601	0,016
	II	13 (22,0)	0,270	0,093 – 0,784	0,002
	III	6 (10,2)	0,459	0,138 – 1,531	0,016
	IV	11 (18,6)	referenčna vrednost		0,205
IHC razvrščanje	luminalni podtip A	33 (56,0)	0,324	0,151 – 0,692	0,004
	luminalni podtip B	14 (23,7)	0,377	0,150 – 0,947	0,038
	bazalni podtip	12 (20,3)	referenčna vrednost		

*statistično značilne vrednosti so krepko označene

Po drugem modelu sta najmočnejša prognostična dejavnika za preživetje psic z malignimi TMŽ klinični stadij in IHC razvrščanje. Rezultati relativnega tveganja psic s kliničnim stadijem I, II, III in IV so podobni kot v prvem modelu. Relativno tveganje pri psicah s karcinomi luminalnega podtipa A ni statistično značilno različno kot pri psicah s karcinomi luminalnega podtipa B ($P > 0,05$), medtem ko je tveganje pri psicah s karcinomi luminalnega podtipa A in B 3,1 in 3,7-krat manjše kot pri psicah s karcinomi bazalnega podtipa (Tabela 18).

4.4.5.1 Preverjanje uporabnosti kombinirane ocene najmočnejših prognostičnih dejavnikov

Na podlagi kombinirane ocene kliničnega stadija in IHC razvrščanja oziroma kliničnega stadija in PR, smo psice razdelili v skupine (Tabela 19 in Tabela 20). Za skupine, kjer je bilo število psic večje ali enako pet (v tabelah krepko označeno), smo izdelali krivulje preživetja po Kaplan - Meierju.

Tabela 19: Število okrnjenih podatkov o preživetju in preživelih psicah z malignimi tumorji mlečne žleze v podskupinah kombinirane ocene kliničnega stadija in imunohistokemičnega razvrščanja (n = 62)

Table 19: Number of surviving and censored bitches with malignant mammary gland tumours in subgroups with different clinical stage and immunohistochemical classification (n = 62)

klinični stadij	IHC razvrščanje	n	okrnjeni podatki (%)	preživele psice (%)
I	<i>luminalni podtip A</i>	17	3 (17,6 %)	14 (100 %)
I	<i>luminalni podtip B</i>	7	2 (28,6 %)	5 (100 %)
I	podtip HER-2	/	/	/
I	<i>bazalni podtip</i>	5	0	3 (60 %)
II	<i>luminalni podtip A</i>	7	2 (28,6 %)	5 (100 %)
II	luminalni podtip B	5	1 (20 %)	4 (100 %)
II	podtip HER-2	/	/	/
II	bazalni podtip	1	1 (100 %)	/
III	luminalni podtip A	4	1 (25 %)	2 (66,7 %)
III	luminalni podtip B	1	0	1 (100 %)
III	podtip HER-2	1	1 (100 %)	/
III	bazalni podtip	1	0	1 (0 %)
IV	luminalni podtip A	5	3 (60 %)	1 (50 %)
IV	luminalni podtip B	1	0	1 (0 %)
IV	podtip HER-2	2	0	2 (0 %)
IV	<i>bazalni podtip</i>	5	0	5 (0 %)

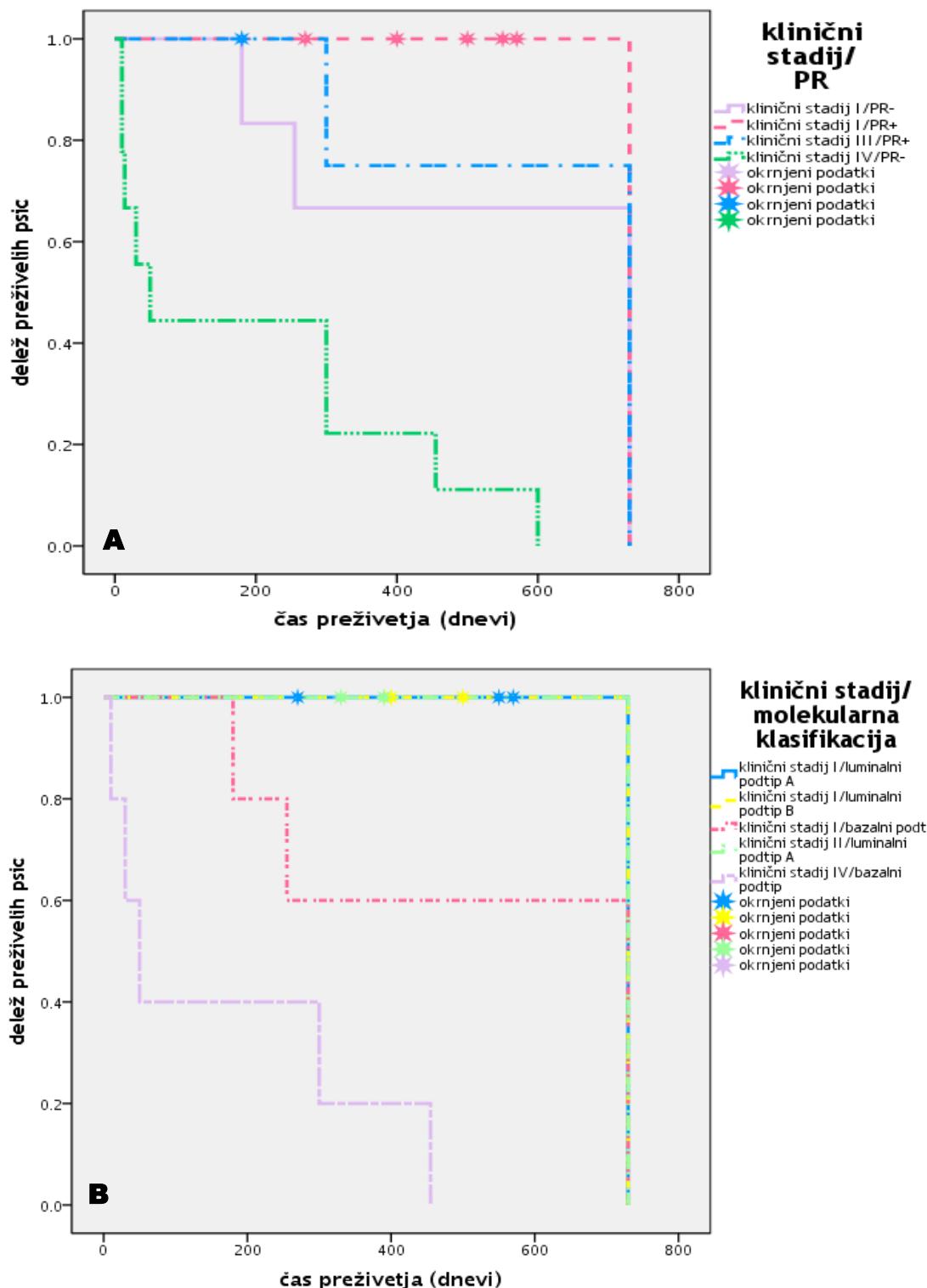
*skupine vključene v nadaljnjo analizo so krepko označene

Tabela 20: Število okrnjenih podatkov o preživetju in preživelih psicah z malignimi tumorji mlečne žleze v podskupinah kombinirane ocene kliničnega stadija in PR (n = 66)

Table 20: Number of survived and censored bitches with malignant mammary gland tumours in subgroups with different clinical stage and PR (n = 66)

klinični stadij	PR	n	okrnjeni podatki (%)	preživele psice (%)
I	PR ⁻	6	0	4 (66,7 %)
I	PR ⁺	24	5 (20,8 %)	19 (100 %)
II	PR ⁻	1	1 (100 %)	/
II	PR ⁺	12	3 (25 %)	9 (100 %)
III	PR ⁻	4	2 (50 %)	2 (0 %)
III	PR ⁺	5	1 (20 %)	3 (75 %)
IV	PR ⁻	9	0	9 (0 %)
IV	PR ⁺	5	3 (60 %)	1 (50 %)

*skupine vključene v nadaljnjo analizo so krepko označene



Slika 19: Krivulje preživetja po Kaplan - Meierju psic z malignimi tumorji mlečne žleze glede na kombinirano oceno kliničnega stadija/IHC razvrščanja (A) in kliničnega stadija/PR (B)

Figure 19: Kaplan - Meier survival curve for bitches with malignant mammary gland tumours with a combined estimation of clinical stage/IHC classification (A) and clinical stage/PR (B)

Vse psice kliničnega stadija I/karcinomi luminalnega podtipa A, kliničnega stadija I/karcinomi luminalnega podtipa B in kliničnega stadija II/karcinomi luminalnega podtipa A so preživele dve leti po kirurški odstranitvi tumorjev. Krivulja preživetja psic iz teh treh skupin je bila statistično značilno različna od krivulje preživetja psic kliničnega stadija I/karcinomi bazalnega podtipa in psic kliničnega stadija IV/karcinomi bazalnega podtipa. Razlika med krivuljama preživetja psic kliničnega stadija I/karcinomi bazalnega podtipa in psic kliničnega stadija IV/karcinomi bazalnega podtipa je na meji statistične značilnosti ($P = 0,055$) (Slika 19, A).

Vse psice kliničnega stadija I/tumorji PR⁺ so preživele dve leti po kirurški odstranitvi tumorjev. Razlika med krivuljama preživetja psic kliničnega stadija I/tumorji PR⁻ in psic kliničnega stadija III/tumorji PR⁺ ni bila statistično značilna ($P > 0,05$). (Slika 19, B).

5 RAZPRAVA

TMŽ pri psicah so bili po poročilih raziskave opravljene v Sloveniji, v času od leta 1988 do leta 1997, najpogosteji tip tumorja, ki se pojavlja pri psih. Med vsemi 1390 preiskanimi tumorji je bilo 36,2 % TMŽ. V raziskavi je bilo 77,1 % vseh TMŽ malignih (Žnideršič 1998).

5.1 Klinični parametri

Podatke iz literature, da se maligni TMŽ najpogosteje pojavljajo pri psicah starih 10 in 11 let ter starejših (Gobello in Corrada, 2001; Murphy, 2008; Kim in sod., 2011a; Sleenckx in sod., 2011), potrjujejo tudi rezultati naše raziskave. Največ (19,4 %) psic naše raziskave je starih 11 let in več kot polovica (65,3 %) je starejših od 10 let (Tabela 5). Ugotovili smo statistično značilno razliko v preživetju psic, ki so stare manj kot 10 let in psic starih 10 let ali več (Slika 15 A, Tabela 16). Pri psicah starih 10 let ali več je tveganje za pegin, zaradi TMŽ, v času dveh let po kirurški odstranitvi tumorjev večje. Na podlagi naših rezultatov lahko potrdimo podatke iz literature, da starejše kot so psice ob pojavu TMŽ, slabša je prognoza bolezni (Sorenmo in sod., 2009). Rezultati so podobni v raziskavah Hellmen-a in sod (1993) in Nieto-a in sod. (2000). Hellmen in sod. (1993) so obravnavali 202 TMŽ in razlika v preživetju med mlajšimi in starejšimi psicami je bila statistično značilna v univariatni in multivariatni analizi. Nieto in sod. (2000) so pregledali 66 psic s TMŽ in dokazali statistično značilno povezavo med slabšo prognozo in višjo starostjo psic ($P = 0,047$). Pena in sod. (2013), ki so v raziskavo vključili 65 psic, so hkrati ugotovili višji delež pojava zasevkov in ponovnega pojava bolezni pri psicah starosti 9–11 let. Poleg TMŽ, je večja smrtnost pri starejših psicah lahko posledica slabše odpornosti organizma in drugih spremljevalnih starostnih bolezni, ki poslabšajo zdravstveno stanje psice (Philibert in sod., 2003; Sorenmo, 2003).

Zanimalo nas je tudi ali hkraten pojav več TMŽ (multipli tumorji) vpliva na slabšo prognozo psic. Malo manj kot polovica vseh psic (43,1 %) naše raziskave je imelo multiple tumorje. Prisotnost multiplih tumorjev ni bila statistično značilno povezana s preživetjem (Tabela 16) in sklepamo lahko, da je za prognozo psic s TMŽ pomembnejša stopnja malignosti tumorjev

kot pa njihov hkraten pojav.

Pri psicah, ki niso sterilizirane ali v primeru sterilizacije opravljene po drugem estrusu je tveganje za pojav TMŽ visoko. Nastanek, rast in napredovanje TMŽ so tesno povezani s hormonskim statusom psice, ki se od psice do psice razlikuje (Illera in sod., 2006; Santos in sod., 2010b; Sleenckx in sod., 2011). Gizinski in sod. (2004) so ugotovili skoraj 3-krat više vrednosti estrogena in progesterona v serumu psic z malignimi TMŽ v primerjavi z zdravimi psicami. Pri steriliziranih psicah, vključenih v našo raziskavo, so bile vse sterilizacije opravljene po nastopu drugega estrusa, medtem ko je bil delež nesteriliziranih psic 80,3 %. Pri 19,7 % steriliziranih psicah iz naše raziskave so se kljub sterilizaciji pojavili TMŽ in lahko potrdimo, da je za čim uspešnejšo preventivo pomembna pravočasna sterilizacija.

Hormonske spremembe v času spolnega ciklusa psice lahko vplivajo na pojav navidezne brejosti (Lee in sod., 2006). Kljub dokazanemu vplivu spolnih hormonov na patogenezo TMŽ, povezava med navidezno brejestjo in pojavom tumorjev ostaja predmet novih raziskav (Sleenckx in sod., 2011). Veronesi in sod. (2003) so na vzorcih 267 TMŽ preverili povezavo med navidezno brejestjo in patohistološkimi tipi tumorjev, vendar niso ugotovili statistično značilnih povezav ($P = 0,18$). V naši raziskavi je bila pri 16,7 % psic diagnosticirana navidezna brejost in pri polovici teh psic (6/12), se je hkrati pojavilo več TMŽ. Zaradi malo vzorcev, povezav med navidezno brejestjo in pojavom multiplih tumorjev nismo statistično ovrednotili. Med preživetjem psic z navidezno brejestjo in tistih brez ni statistično značilne razlike (Tabela 16). Mogoče je, da v naši raziskavi niso bila zapisana vsa stanja navidezne brejosti, zato na podlagi rezultatov naše raziskave ne moremo delati zaključkov.

Ob starosti in vplivu spolnih hormonov, ki sta najpomembnejša dejavnika tveganja za pojav TMŽ pri psicah, je pomembna pasemska oziroma genetska komponenta (Sorenmo in sod., 2011). V naši raziskavi so bili tumorji najpogosteji pri kokeršpanjelih (19,4 % od vseh psic s TMŽ), psicah mešanih pasem (18,1 %) in srednjih kodrih (6,9 %). Po trije primeri (4,2 %) psic z malignimi TMŽ so bili pasme maltežan, nemški ovčar, pekinžan in slovaški čuvač. Naše rezultate težko primerjamo z drugimi raziskavami, saj deleži psov s TMŽ po posameznih raziskavah močno variirajo (Sleenckx in sod., 2011). V raziskavi Sarli-a in sod. (2002) so bili TMŽ najpogosteji pri nemškem ovčarju in yorkshirskem terierju (devet od vseh 60 psic), medtem ko so Richards in sod. (2001) pri nemškem ovčarju ugotovili manjše tveganje za pojav TMŽ. V

norveški raziskavi Moe-a in sod. (2001), v katero je bilo vključene 25 % celotne populacije psov z različnimi tipi tumorjev, so višje tveganje za pojav TMŽ ugotovili pri bokserjih, kokeršpanjelih, angleških špringer španjelih in jazbečarjih. Odstopanja med rezultati raziskav bi lahko pripisali različni zastopanosti posameznih pasem psov v posameznih državah. Prav tako so razlike odvisne od lastnikov psov oziroma njihove odločitve, ali bodo ob pojavu TMŽ psico pripeljali na pregled na veterinarsko kliniko. Rezultati naše raziskave so primerljivi z rezultati retrospektivnih raziskav izvedenih v Sloveniji, kjer so se TMŽ prav tako najpogosteje pojavljali pri mešancih, kodrih in kokeršpanjelih (Zaninović 1990; Cepuder 1997; Žnideršič 1998). TMŽ se pogosteje pojavljajo pri čistokrvnih kot pri mešanih pasmah. V raziskavi Sarli in sod. (2002) je bilo 65,5 % (38/58) vseh psov pasemskeih, v raziskavi Itoh-a in sod. (2005) pa 84,2 % (85/101). Podobno je bilo v naši raziskavi 81,9 % (59/72) vseh psic s TMŽ pasemskeih. Med vsemi pasmami psic s TMŽ, vključenih v našo raziskavo, so po podatkih registra Veterinarske uprave Republike Slovenije (december 2011), v Sloveniji najpogosteje zastopani nemški ovčarji (22589 psov), zlati prinašalci (9093 psov), maltežani (5231 psov) in kokeršpanjeli (3157 psov) (Tabela 4). Kljub številni populaciji nemškega ovčarja v Sloveniji smo na KKMŽ VF UNI LJ pojav malignih TMŽ v času od leta 2003 do 2010 ugotovili le pri treh psicah te pasme. V primerjavi z nemškimi ovčarji je populacija kokeršpanjelov v Sloveniji 7-krat manjša, medtem ko so se TMŽ pri psicah te pasme pojavili 4,7-krat pogosteje. V Sloveniji je številna tudi populacija zlatih prinašalcev in maltežanov, medtem ko smo v naši raziskavi zapisali le dva oziroma tri primere psic s TMŽ teh pasem. Rezultati nakazujejo na možnost pasemske predispozicije za pojav malignih TMŽ pri kokeršpanjelih.

Z rezultatom naše raziskave o mestu TMŽ smo potrdili podatke iz literature, da se tumorji pogosteje pojavljajo na zadnjih in predzadnjih mlečnih kompleksih (Sorenmo in sod., 2009; Sleenckx in sod., 2011). Med vsemi 80 malignimi TMŽ je bilo 27,5 % tumorjev na zadnjih in 20% na predzadnjih mlečnih kompleksih in delež se je zmanjševal v smeri proti prvim mlečnim kompleksom (Tabela 6). Santos in sod. (2010b) pojav razlagajo z večjo količino žleznega tkiva v zadnjih in predzadnjih mlečnih kompleksih in posledično višjo stopnjo proliferacije celic, ki vodi v časovno daljšo stopnjo regresije. V času zgodnjega anestrusa in diestrusa so razlike, med zadnjimi in predzadnjimi mlečnimi kompleksi v primerjavi s prednjimi, tudi v sami strukturi žleznega tkiva (Chandra in sod., 2010).

5.1.1. Klinični stadij

V naši raziskavi smo ugotovili statistično značilno povezanost med kliničnim stadijem in preživetjem psic. Prognostična vrednost kliničnega stadija je statistično značilna v univariatni in multivariatni analizi (Tabela 16, Tabela 17, Tabela 18). Prognostična vrednost ocene kliničnega stadija je bila dokazana v mnogih raziskavah TMŽ pri psicah (Philibert in sod., 2003; Chang in sod., 2005; Ferreira in sod., 2009). Velikost tumorja, ocenjena samostojno ali kot del ocene kliničnega stadija, predstavlja pomemben prognostičen dejavnik za oceno preživetja psic s TMŽ, vendar na podlagi različnih rezultatov raziskav ni jasno, pri kateri velikosti tumorja se prognoza bolezni poslabša. Rezultati raziskav Chang-a in sod. (2005) in Ferreira in sod. (2009) so podobni rezultatom naše raziskave. V vseh treh raziskavah razlika med preživetjem psic kliničnega stadija I in II ni statistično značilna, medtem ko se prognoza bolezni poslabša pri psicah s tumorji, ki so večjega premera kot pet cm (klinični stadij III). V raziskavi Philibert-a in sod. (2003) je bilo preživetje psic kliničnega stadija II v primerjavi s psicami kliničnega stadija I, krajše, kar pomeni, da se prognoza poslabša že pri psicah s tumorji, ki je večjega premera kot tri cm. Avtorji so ugotovili statistično značilno razliko med preživetjem psic kliničnega stadija I, II in III (Philibert in sod., 2003).

Poleg večjega premera tumorja je prisotnost zasevkov v bezgavkah povezana s slabo prognozo bolezni pri psicah s TMŽ (Misdorp in sod., 1999; Philibert in sod., 2003; Karayannopoulou in sod., 2005; Szczubial in Lopuszynski, 2011). V raziskavi Karayannopoulou-a in sod. (2005) je poginilo 24 od vseh 28 psic (85,7 %) s prisotnimi zasevkami v regionalnih bezgavkah, medtem ko je v skupini psic brez prisotnih zasevkov poginilo 8 od vseh 38 psic (21,1 %). Philibert in sod. so na vzorcu 97 psic s TMŽ ugotovili, da imajo psice brez prisotnih zasevkov 3,1-krat manjše tveganje za pegin eno leto po kirurški odstranitvi tumorjev v primerjavi s psicami z zasevkami. Po mnenju Szczubial-a in Lopuszynski-ega (2011) je razlika v preživetju samo v primeru, ko so zasevki v regionalnih bezgavkah večji od dveh mm. V njihovi raziskavi razlika v preživetju psic s prisotnimi zasevkami premora manjšega od 2 mm in psic brez prisotnih zasevkov ni bila statistično značilna. V naši raziskavi smo pri psicah kliničnega stadija IV ugotovili najkrajši čas preživetja ($337,3 \pm 78,3$ dni) (Tabela 16), a v primerjavi s psicami kliničnega stadija III razlika v preživetju ni statistično značilna (Slika 15,

B). Mogoče je, da je imela katera od psic kliničnega stadija III ob kirurški odstranitvi tumorjev že prisotne zasevke v regionalnih bezgavkah, vendar ti niso bili ugotovljeni. Zasevke v bezgavkah je klinično težko določiti in v posameznih primerih so mogoči lažno negativni rezultati (Sorenmo in sod., 2011). Pri psicah naše raziskave se ob kirurški odstranitvi tumorjev niso vedno hkrati odstranile tudi regionalne bezgavke. Poleg tega so zasevki lahko zelo majhni, in ker se bezgavke patohistološko ne pregledajo v celoti, je mogoče, da se zasevki spregledajo (Matos in sod., 2006).

5.2 Patohistološki parametri

Epitelijski tumorji so najpogosteje diagnosticiran patohistološki tip TMŽ pri psicah (Misdorp in sod., 1999) in podobno je v naši raziskavi 92,6 % vseh tumorjev epitelijskega izvora. Posamezne raziskave potrjujejo razliko med preživetjem psic s tumorji različnih patohistoloških tipov (Yamagami in sod., 1996, Philibert in sod., 2003, Chang in sod., 2005, Rasotto in sod., 2012). Yamagami in sod. (1996) so v raziskavi, delani na vzorcu 175 psic s TMŽ ugotovili daljši čas preživetja pri psicah s tumorji z visokim deležem navzočih tubulov. Rasotto in sod. (2012) so dokazali statistično značilno povezavo med patohistološkimi tipi TMŽ in prisotnimi zasevki v regionalnih bezgavkah ter vraščanjem tumorskih celic v limfne žile. V primerjavi s karcinomi kompleksnega tipa, so karcinomi enostavnega tipa pogosteje vraščali v limfne žile in oblikovali zasevke v regionalnih bezgavkah. V naši raziskavi zaradi premajhnega števila vzorcev, v analizi preživetja po Kaplan - Meierju nismo mogli upoštevati karcinomov *in situ* (3 primeri), anaplastičnih karcinomov (2 primera) in karcinomov posebnega tipa (2 primera). Za ostale skupine patohistološkega razvrščanja smo dokazali statistično značilno povezavo s preživetjem psic (Tabela 16). Statistično značilna je razlika v preživetju psic s karcinomi kompleksnega tipa in psic s karcinomi enostavnega tipa (Slika 16, B). Vse psice s karcinomi kompleksnega tipa so preživele dve leti po kirurški odstranitvi tumorjev (Tabela 16). Rezultati naše raziskave potrjujejo podatke iz literature, da so karcinomi kompleksnega tipa manj agresivni in prognostično ugodnejši od karcinomov enostavnega tipa (Sarli in sod., 2002; Hellmen, 2005). Avtorji s področja humane medicine menijo, da mioepitelijska celica deluje kot inhibitor in uravnana prehod tumorja iz *in situ* v

invazivno obliko (Lakhani in O'Hare, 2000; Polyak in Hu, 2005). Mioepitelijske celice uravnavajo proliferacijo in diferenciacijo luminalnih celic in tako stabilizirajo strukturo luminalnega epitelija (Sopel, 2010). Mioepitelijska celica je, v primerjavi z luminalno epitelijsko celico, mitotično manj aktivna in posledično je manj tveganja za nastanek napak v času podvojevanja DNA (Lakhani in O'Hare, 2001). Prisotnost mioepitelijskih celic v TMŽ pri psicah bi lahko povezali z manjšo agresivnostjo karcinomov kompleksnega tipa. Ob delitvi skupine karcinomov enostavnega tipa, glede na tip rasti (tubulopapilarni, solidni, anaplastični), razlika v preživetju psic s karcinomi kompleksnega tipa in psic s tubulopapilarnimi karcinomi ni statistično značilna, ugotovili pa smo razliko med preživetjem psic s tubulopapilarnimi in psic s solidnimi karcinomi (Slika 16, C). Z našimi rezultati lahko sklepamo, da so tubulopapilarni karcinomi prognostično podobnejši karcinomom kompleksnega tipa, medtem ko so solidni karcinomi agresivnejši. To potrjuje tudi rezultat preverjanja soodvisnosti patohistološkega razvrščanja in stopnje diferenciacije tumorjev. Ob delitvi karcinomov enostavnega tipa, glede na tip rasti, smo ugotovili, da so tubulopapilarni karcinomi največkrat stopnje diferenciacije I in II (skupno 92 %) in podobno so karcinomi kompleksnega tipa največkrat stopnje diferenciacije I in II (93,1 %). Nasprotno so solidni in anaplastični karcinomi največkrat stopnje diferenciacije III (84,6 % in 66,7 %). Razlika je statistično značilna ($P < 0,05$) (Tabela 14). Razmerja so podobna v raziskavi Pena-e in sod. (2013); karcinomi enostavnega tipa so bili predvsem stopnje diferenciacije I (66,7 %), solidni in anaplastični karcinomi pa stopnje diferenciacije III (66,7 % in 100 %). Philibert in sod. (2003) so prav tako ugotovili statistično značilno razliko v preživetju psic s karcinomi enostavnega tipa različnih tipov rasti ($P = 0,02$). Glede na razlike med podskupinami, karcinome enostavnega tipa ne moremo obravnavati kot enotno skupino, saj ob statističnih izračunih ne dobimo realnih rezultatov. S tega stališča naši rezultati potrjujejo večjo uporabnost patohistološkega razvrščanja TMŽ pri psicah, ki so jo v svoji raziskavi predlagali Goldschmidt in sod. (2011) in pri kateri enostavni tubulopapilarni karcinomi, enostavni solidni karcinomi in enostavni anaplastični karcinomi predstavljajo tri, medsebojno ločene skupine. Predlaganega razvrščanja nismo uporabili v naši raziskavi, saj je WHO ni potrdila in ne obsega vseh patohistoloških pojavnih oblik TMŽ pri psicah (Salgado in Cassali, 2012).

Ocena stopnje diferenciacije predstavlja pomemben del patohistološke ocene tumorja

vendar se pri TMŽ pri psicah le redko upošteva pri redni patohistološki diagnostiki. Metoda po Elstonu in Ellisu (1991) so za oceno TMŽ pri psicah v svojih raziskavah uporabili mnogi avtorji (Dutra in sod., 2004; Karayannopoulou in sod., 2005; Qiu in sod., 2008; Rezaie in sod., 2009, Clemente in sod., 2010, Santos in sod., 2010a, Manuali in sod., 2012; Pena in sod., 2013). Karayannopoulou in sod. (2005) in Pena in sod. (2013) so v svojih raziskavah dokazali, da ima metoda prognostično vrednost za preživetje psic s TMŽ. V naši raziskavi, raziskavi Pene in sod. (2012) in raziskavi Karayannopoulou in sod. (2005) so vse psice s TMŽ stopnje diferenciacije I preživele dve leti po kirurški odstranitvi tumorjev. Karayannopoulou in sod. (2005) so ugotovili 21-krat višje, Pena in sod. (2013) pa 13,28-krat višje tveganje za pegin pri psicah s TMŽ stopnje diferenciacije III, v primerjavi s psicami s tumorji stopnje diferenciacije I. V dveh letih po kirurški odstranitvi tumorjev je, po rezultatih raziskave Karayannopoulou in sod. (2005), peginilo 86,7 % (26/30) psic s tumorji stopnje diferenciacije III, v primerjavi s 46,4 % (13/28) peginom pri psicah s tumorji stopnje diferenciacije II. V naši raziskavi je preživetje statistično značilno različno med psicami s tumorji stopnje diferenciacije I, II in III ($P < 0,05$) (Slika 16, A). Preživetje je v povprečju najkrajše pri psicah s tumorji stopnje diferenciacije III ($412,3 \pm 84,9$ dni) (Tabela 16). Menimo, da bi bilo oceno stopnje diferenciacije tumorjev smiselno upoštevati v patohistološki diagnostiki malignih TMŽ psic, saj poda pomembno informacijo o agresivnosti tumorja. Namreč tudi prognostično ugodni karcinomi kompleksnega tipa so lahko slabo diferencirani in v tem primeru se prognoza poslabša.

Metoda ocenjevanja stopnje diferenciacije po Elstonu in Ellisu (1991), ki smo jo uporabili v naši raziskavi, je bila v osnovi oblikovana za ocenjevanje invazivnih adenokarcinomov mlečne žleze pri ženskah, in sicer ne glede na patohistološki tip (Elston in Ellis, 1991). Na drugi strani za oceno malignih TMŽ pri psicah z uporabo metode po Elstonu in Ellisu (1991), ni določenih merit in odločitev o tem, katere patohistološke tipe ocenjevati, je prepuščena avtorjem. Posledično so rezultati posameznih raziskav različni. Dutra in sod. (2004) in Manuali in sod. (2012) so pri oceni upoštevali karcinome enostavnega in kompleksnega tipa, Clemente in sod. (2010) in Karayannopoulou in sod. (2005) hkrati še karcinome posebnega tipa. Santos in sod. (2010a) so pri oceni upoštevali tudi karcinosarkom in karcinom *in situ*, Manuali in sod. (2012) in Clemente in sod. (2010) karcinosarkom, maligni mioepiteliom in sarkom. Metoda po

Elstonu in Ellisu ne upošteva ocene proliferacije mioepitelijskih in mezenhimskeh tumorskih celic, kar je slabost za ocenjevanje malignih TMŽ pri psicah. Namreč, maligni TMŽ, sestavljeni iz kombinacije epiteljskih in mioepitelijskih celic (karcinomi kompleksnega tipa), so pri psicah pogosti in pri ženskah redki (Goldschmidt in sod., 2011). Če se z oceno stopnje diferenciacije omejimo le na karcinome enostavnega tipa lahko izgubimo pomembne prognostične podatke (Elston in Ellis, 1991). Pena in sod. (2013) so zato predlagali uporabo modificirane metode po Elstonu in Ellisu, ki upošteva oceno področij proliferacije mioepitelijskih celic in malignih tumorjev mešanega tipa ter psicam z malignimi TMŽ prirejeno oceno pleomorfnosti jeder tumorskih celic. Ob upoštevanju teh priporočil lahko stopnjo proliferacije določimo malignim TMŽ pri psicah različnih patohistoloških tipov. V naši raziskavi smo oceno stopnje proliferacije določili malignim tumorjem epitelijskega izvora, saj ti predstavljajo 90 % vseh TMŽ pri psicah. V vzorcih karcinomov kompleksnega tipa smo navzočnost tubulov ocenjevali le na področjih epitelijskih tumorskih celic, medtem ko smo pleomorfost jeder ocenjevali v epitelijskih in mioepitelijskih tumorskih celicah (Pena in sod., 2013).

5.3 Celični označevalci

Poleg klinične in patohistološke diagnoze je mogoče v TMŽ pri psicah določati posamezne celične označevalce, ki so povezani s prognozo bolezni. Raziskave izražanja ER in PR v TMŽ pri psicah so se izkazale kot uporabne za napoved prognoze bolezni, medtem ko si rezultati raziskav o prognostični vrednosti določanja ravni izražanja HER-2 nasprotujejo (Sleeczk in sod., 2011).

5.3.1 Celična označevalca ER in PR

Rezultati naše statistične analize kažejo, da so tumorji ER⁻ in PR⁻ pogostejši pri psicah starih deset let ali več (Tabela 8 in Tabela 9). Podobno so Martin de las Mulas in sod. (2005) ugotovili, da se ER pogosteje izraža v tumorjih psic starih osem let ali manj. Kljub temu da je raven izražanja ER tesno povezana s hormonskim statusom psice, v naši raziskavi nismo dokazali statistično značilne razlike v izražanju ER v malignih TMŽ pri steriliziranih in nesteriliziranih psicah (Tabela 8).

Statistično značilna je razporeditev tumorjev ER^+/ER^- znotraj skupin kliničnega stadija. Tumorji ER^+ in PR^+ so pogostejši pri psicah kliničnega stadija I in II (Tabela 8 in Tabela 9). Na vzorcu 228 TMŽ so to potrdili tudi Martin de las Mulas in sod. (2005); ER in/ali PR so se pogosteje izražali v tumorjih z manjšim premerom kot tri cm (psice kliničnega stadija I). V raziskavi Chang in sod. (2009), ki so v analizo vključili 113 psic s TMŽ, so se ER in PR pogosto izražali tudi v tumorjih s premerom tri do pet cm (psice kliničnega stadija II). Vseh sedem psic kliničnega stadija IV v raziskavi Martin de las Mulas in sod. (2005) je imelo tumorje ER^- in PR^- . V naši raziskavi je 73,3 % in 60 % vseh psic kliničnega stadija IV imelo tumorje ER^- in PR^- .

Statistično značilno različna je povezava med ravnijo izražanja ER in PR v različnih patohistoloških tipih tumorjev (Tabela 8 in Tabela 9). Številne raziskave (Geraldes in sod., 2000; Millanta in sod., 2005; Illera in sod., 2006; Manee-in in sod., 2007; Thuroczy in sod., 2007; Chang in sod., 2009) so potrdile statistično značilno višje izražanje ER in PR v benignih TMŽ pri psicah, v primerjavi z malignimi tumorji. Martin de las Mulas in sod. (2005) so ugotovili pogostejše izražanje ER in PR v karcinomih kompleksnega tipa in tubulopapilarnih karcinomih. V naši raziskavi so vsi karcinomi kompleksnega tipa PR^+ in 93,1 % vseh ER^+ . 80 % vseh tubulopapilarnih karcinomov je PR^+ , medtem ko jih je ER^+ manj kot polovica (48 %) (Tabela 8 in Tabela 9). Tubulopapilarni karcinomi naše raziskave so torej pogosteje PR^+ kot ER^+ .

Rezultati naše raziskave kažejo, da se ER in PR pogosteje izražajo v dobro diferenciranih tumorjih stopnje diferenciacije I in II (Tabela 8 in Tabela 9), kar so ugotovili tudi Martin de las Mulas in sod. (2005), kljub drugim uporabljenim metodam določanja stopnje diferenciacije. Statistično značilna je razporeditev tumorjev ER^+/ER^- , PR^+/PR^- znotraj skupin tumorjev z različno ravnijo izražanja VEGF (Tabela 8). Z izračunom Spearmanovega koeficiente korelacije smo ugotovili pozitivno korelacijo med izražanjem ER in PR in negativno korelacijo med izražanjem ER in VEGF ter PR in VEGF (Tabela 15). Podoben vzorec izražanja ER in PR v TMŽ je znan (Manee-in in sod., 2010), medtem ko bi proučevanje vzrokov za negativno korelacijo med ER in VEGF lahko bilo zanimivo za nove raziskave. Iz področja TMŽ pri ženskah je znano, da estrogen pospešuje razraščanje tumorjev in angiogenezo tudi v odsotnosti ER (Iyer in sod., 2012)

V naši raziskavi smo dokazali statistično značilno povezavo med ravnijo izražanja ER in PR in

preživetjem psic (Tabela 16). Martin de las Mulas in sod. (2005) so ugotovili statistično značilno povezavo med ravnijo izražanja ER in prisotnostjo zasevkov, ne pa tudi povezave s preživetjem. ER so se pogosteje izražali v TMŽ psic brez prisotnih zasevkov. Chang in sod. (2009) so dokazali statistično značilno povezavo med ravnijo izražanja PR in preživetjem psic v enem letu po kirurški odstranitvi tumorjev, ne pa tudi med ravnijo izražanja ER in preživetjem. Medtem ko je dokazana povezava med ravnijo izražanja ER in PR ter kliničnimi in patohistološkimi parametri TMŽ pri psicah, povezava med ravnijo izražanja ER in PR ter preživetjem psic s TMŽ še ni v polnosti raziskana. Potrebne bodo dodatne raziskave, ki bi potrdile prognostično vrednost teh dveh celičnih označevalcev.

5.3.1.1 Tumorji ER^-/PR^+

V naši raziskavi so pogostejši tumorji ER^-/PR^+ (19 %) kot tumorji ER^+/PR^- (2,5 %). Podobne rezultate je mogoče zaslediti tudi v raziskavah Martin de las Mulas in sod. (2005) in Toniti in sod. (2009). V raziskavi Martin de las Mulas in sod. (2005) je bil delež tumorjev ER^+/PR^- 1 % (2/155), medtem ko je bil delež tumorjev ER^-/PR^+ 43 % (67/155). V raziskavi Toniti in sod. (2009) je bil, od 27 malignih TMŽ, delež tumorjev ER^+/PR^- 5 % in delež tumorjev ER^-/PR^+ 14 %. V naši raziskavi bi odstopanja med tumorji ER^-/PR^+ in tumorji ER^+/PR^- lahko razložili s poliklonsko obliko protitelesa proti PR, ki smo ga uporabili pri IHC označevanju. Tip protitelesa zazna obe obliki PR; PRA in PRB, in delež tumorjev PR^+ je v primerjavi z deležem tumorjev ER^+ , v povprečju višji (Slika 5). Nadalje bi višje izražanje PR v TMŽ pri psicah, v primerjavi s stopnjo izražanja ER, lahko bilo vrstno specifično. Pri psici se v obdobju aktivnega rumenega telesa več tednov izloča progesteron (Papa in Hoffman, 2011). Visoke koncentracije progesterona zavirajo izražanje ER in pospešujejo izražanje PR (Manee-in in sod., 2010).

5.3.2 Celični označevalec HER-2

Medtem ko je v naši raziskavi delež tumorjev ER^+/ER^- in tumorjev PR^+/PR^- statistično značilno povezan s preživetjem, kliničnim stadijem bolezni in patohistološko oceno malignih TMŽ pri psicah, za tumorje $HER-2^+/HER-2^-$ teh povezav nismo ugotovili (Tabela 10). Rezultati raziskav ravni izražanja HER-2 v malignih TMŽ pri psicah si nasprotujejo (Sleecckx in sod., 2011). Dutra

in sod. (2004) so dokazali statistično značilno razliko v ravni izražanja HER-2 v različnih patohistoloških tipih TMŽ pri psicah in razliko v ravni izražanja HER-2 v tumorjih različnih stopenj diferenciacije. Kljub temu težko delamo zaključke na podlagi rezultatov njihove raziskave, saj je bil vzorec malignih TMŽ, upoštevanih pri analizi, premajhen ($n = 17$) (Metze in Adam, 2005). Uporabnost HER-2 kot prognostičnega dejavnika niso dokazali Rungsiipat in sod. (2008), Kim in sod. (2011a) in Ressel in sod. (2013). Hsu in sod. (2009) so ugotovili celo boljšo prognozo bolezni pri psicah s TMŽ HER-2⁺ v dveh letih po kirurški odstranitvi tumorjev. V njihovi raziskavi je bilo 29,7 % (27/91) vseh malignih TMŽ HER-2⁺. V naši raziskavi je 34,2 % vseh tumorjev HER-2⁺ (Slika 6). Delež je podoben kot v raziskavi Kim in sod. (2011a) (35,3 %), medtem ko je delež tumorjev HER-2⁺ nižji (17,6 %) v raziskavi Martin de las Mulas in sod. (2003). Različni deleži bi lahko bili posledica različnih tipov uporabljenih protiteles. Hkrati je ocena ravni izražanja HER-2 v tumorjih subjektivnejša kot pa ocena ravni izražanja ER in PR. Mogoča so odstopanja med rezultati posameznih raziskav v deležih tumorjev HER-2^{+/HER-2-}. V naši raziskavi smo ob izračunu Spearmanovega koeficiente korelacije ugotovili, da je pozitivna korelacija med ER in HER-2 ter PR in HER-2 na meji statistične značilnosti ($P = 0,050$ in $P = 0,054$) (Tabela 15). Na podlagi rezultatov naše raziskave menimo, da je celični označevalec HER-2 za napoved prognoze uporabnejši v kombinaciji z ER in PR, saj je razlika med preživetjem psic s TMŽ različnih IHC podtipov statistično značilna, in sicer v univariatni in multivariatni analizi (Tabela 16 in Tabela 17).

5.3.3 Celični označevalec VEGF

V naši raziskavi se je VEGF močneje izražal v malignih TMŽ pri psicah starih 10 let ali več in v tumorjih ER⁻, enostavnega patohistološkega tipa. Restucci in sod. (2002) so v svoji raziskavi ugotovili statistično značilno višje ($P < 0,0001$) izražanje VEGF v slabše diferenciranih TMŽ pri psicah stopnje diferenciacije III, medtem ko v naši raziskavi povezava med ravnijo izražanja VEGF in stopnjo diferenciacije tumorja ni statistično značilna ($P = 0,073$). Ugotovili pa smo statistično značilno različno ($P = 0,008$) raven izražanja VEGF v posameznih patohistoloških tipih tumorjev (Tabela 11). Qui in sod. (2008) so ugotovili statistično značilno povezavo ($P < 0,05$) med ravnijo izražanja VEGF in prisotnostjo zasevkov v regionalnih bezgavkah oziroma kliničnim stadijem; pri vseh šestih psicah z zasevki je bila raven izražanja VEGF v TMŽ

visoka. Povezava med ravnijo izražanja VEGF in kliničnim stadijem bolezni v naši raziskavi ni statistično značilna ($P = 0,319$). Millanta in sod. (2006) in Santos in sod. (2010a) niso dokazali nobene povezave med ravnijo izražanja VEGF in preiskanimi kliničnopatološkimi parametri.

Rezultati raziskav prognostične vrednosti ravni izražanja VEGF v TMŽ pri psicah si nasprotujejo. Millanta in sod. (2006) na vzorcih 29 karcinomov mlečne žleze in Santos in sod. (2010a) na vzorcih 64 malignih TMŽ niso potrdili prognostične vrednosti VEGF ($P > 0,05$). Nasprotno smo v naši raziskavi dokazali statistično značilno povezavo med ravnijo izražanja VEGF in preživetjem psic z malignimi TMŽ (Tabela 16). Vse psice s tumorji z ravnijo izražanja VEGF 0, 1 in 2 so preživele dve leti po kirurški odstranitvi tumorjev. Podobno kot ocena ravni izražanja HER-2, je tudi ocena ravni izražanja VEGF v TMŽ lahko precej subjektivna. Hkrati avtorji raziskav uporabljajo različne mejne vrednosti za razdelitev tumorjev v posamezne skupine glede, na raven izražanja VEGF. Primerjava rezultatov posameznih raziskav je posledično težja.

5.4 Imunohistokemično razvrščanje

V naši raziskavi smo ugotovili statistično značilno razliko v preživetju psic s karcinomi različnih IHC podtipov. Razlika je statistično značilna v univariatni in multivariatni analizi (Tabela 16 in Tabela 18). Prognoza je boljša pri psicah s karcinomi luminalnega podtipa A in B, kot pri psicah s karcinomi bazalnega podtipa. Karcinomi podtipa HER-2 so bili štirje. Pojavili so se pri treh psicah – pri eni dva hkrati. Vse tri psice so poginile v dveh letih po kirurški odstranitvi TMŽ, ena psica zaradi drugega vzroka, nepovezanega s TMŽ. Pri izračunu preživetja bi lahko upoštevali tri karcinome, en podatek o preživetju je okrnjen. Za oceno naše prve hipoteze bi preživetje psic s karcinomi bazalnega podtipa morali primerjati s preživetjem psic s tumorji luminalnega podtipa A in B ter podtipa HER-2. Zaradi maloštevilnih vzorcev karcinomov podtipa HER-2, primerjava s preživetjem psic s karcinomi bazalnega podtipa ni relevantna.

Rezultati raziskav Gama in sod. (2008) in Sassi in sod. (2010), o prognostični vrednosti IHC razvrščanja malignih TMŽ pri psicah, si nasprotujejo. Če primerjamo rezultate naše raziskave z rezultati obeh raziskav ugotovimo, da je v naši in raziskavi Gama in sod. (2008) čas preživetja najkrajši pri psicah s karcinomi bazalnega podtipa (Tabela 16). Povsem nasprotno našim in

ugotovitvam Gama in sod. (2008), rezultati raziskave Sassi in sod. (2010) nakazujejo na najboljši izid bolezni pri psicah s karcinomi bazalnega podtipa, vendar povezava ni bila statistično značilna ($P = 0,85$). V naši raziskavi med karcinomi bazalnega podtipa ni karcinomov kompleksnega tipa (Tabela 12), medtem ko je v raziskavi Gama in sod. (2008) ta delež nizek (7,3 %). Nasprotno je v raziskavi Sassi in sod. (2010) med karcinomi bazalnega podtipa več karcinomov kompleksnega (70 %) kot enostavnega tipa (30 %). Ker so karcinomi kompleksnega tipa prognostično ugodnejši, bi to lahko vplivalo na boljši izid bolezni pri psicah s karcinomi bazalnega podtipa v raziskavi Sassi in sod. (2010).

V naši raziskavi smo ugotovili statistično značilno povezavo med posameznimi IHC podtipi tumorjev in patohistološkimi parametri (Tabela 12). Karcinomi kompleksnega tipa so vsi luminalnega podtipa A ali B. V raziskavi Gama in sod. (2008) je 90,2 % (37/41) vseh karcinomov kompleksnega tipa luminalnega podtipa A ali B. V naši in njihovi raziskavi je podobna tudi razporeditev TMŽ različnih stopenj diferenciacije med posameznimi IHC podtipi. V raziskavi Gama in sod. (2008) so vsi tumorji stopnje diferenciacije I luminalnega podtipa A, medtem ko so tumorji stopnje diferenciacije II pretežno luminalnega podtipa A in B (skupaj 84,9 %). V naši raziskavi je 96,7 % in 88 % vseh tumorjev stopnje diferenciacije I in II luminalnega podtipa A in B.

5.5 Kombinirana ocena najmočnejših prognostičnih dejavnikov

Med testiranimi parametri v naši raziskavi sta imela klinični stadij in IHC razvrščanje oziroma, med celičnimi označevalci PR, največjo prognostično vrednost za psice z malignimi TMŽ (Tabela 17, Tabela 18). Po modelu kombinirane ocene dveh parametrov smo ugotovili, da imajo psice kliničnega stadija I s prognostično neugodnimi karcinomi bazalnega podtipa oziroma tumorji PR⁻ možnost preživetja in obratno, psice prognostično neugodnega kliničnega stadija IV imajo možnost preživetja, če imajo karcinome luminalnega podtipa A in B oziroma tumorje PR⁺. Rezultati potrjujejo izredno heterogenost malignih TMŽ pri psicah in podpirajo možnost, da z upoštevanjem več prognostično pomembnih dejavnikov lahko postavimo natančnejšo prognozo bolezni.

5.6 Prednosti in slabosti proučevanja tumorjev mlečne žleze pri psicah

Rakasta obolenja so v porastu. Karcinogeneza je zelo zapleten proces in kljub številnim, že znamenitim dejavnikom tveganja in razumevanju delovanja signalnih poti, določeni procesi ostajajo nerazjasnjeni. TMŽ pri psicah so zelo raznoliki in nemogoče je postaviti enotno formulo, s katero bi lahko napovedali natančno prognozo bolezni. Odstopanja opazimo pri klinični in patohistološki oceni, nenazadnje se potek bolezni razlikuje od psice do psice. Ob rezultatih naše raziskave smo ugotovili, da je za postavitev prognoze koristno, da imamo na voljo kar največ parametrov na podlagi katerih lahko z večjo gotovostjo ocenimo agresivnost tumorja in napovedemo izid bolezni. Patohistološka diagnostika poleg kliničnega stadija trenutno predstavlja zlati standard za oceno TMŽ pri psicah in v naši raziskavi smo potrdili uporabnost obeh parametrov za napoved izida bolezni (Tabela 16). Določanje kliničnega stadija bi moralo predstavljati del redne klinične diagnostike, kljub temu kliničnega stadija psicam s TMŽ ne ocenjujejo na vseh veterinarskih klinikah v Sloveniji. Veterinarje klinike bi bilo treba spodbujati, da ga vključijo v redno klinično diagnostiko. Na podlagi rezultatov naše raziskave sklepamo, da bi bilo pri diagnostiki TMŽ pri psicah smiselno upoštevati oceno stopnje diferenciacije tumorja in določitev ravni izražanja PR. Kot uporabni parametri za napoved prognoze bolezni so se izkazali tudi ocena ravni izražanja ER in VEGF, IHC razvrščanje in starost psice. Razvrstitev tumorjev na posamezne IHC podtipe se je v naši raziskavi izkazala kot močan prognostičen dejavnik. Za določitev IHC podtipa TMŽ pri psicah bi bila potrebna določitev ravni izražanja vsaj treh celičnih označevalcev (ER, PR in HER-2). S tega vidika je metoda cenovno neugodna. Na podlagi rezultatov naše raziskave ugotavljamo, da ima raven izražanja PR (tumorji PR⁺/PR⁻) v malignih TMŽ pri psicah enako močno prognostično vrednost kot določanje IHC podtipov (pri obeh parametrih P < 0,001) (Tabela 16). Metoda določanja le enega celičnega označevalca, namesto treh, je cenovno dostopnejša.

V veterinarski medicini so, poleg kirurške odstranitve TMŽ, drugi načini zdravljenja psic redki. Klinične raziskave o učinkovitosti hormonskega zdravljenja za preživetje psic z malignimi TMŽ po kirurški odstranitvi tumorjev so maloštevilne. Medtem ko je hormonsko zdravljenje žensk s TMŽ ER⁺ in/ali PR⁺ in zdravljenje žensk s tumorji HER-2⁺ uspešno in predstavlja del redne klinične prakse (Esteva in Hortobagyi, 2004; EBCTCG, 2005; Ferretti in sod., 2007; Goldhirsch

in sod., 2007; Payne in sod., 2008), raziskave hormonskega zdravljenja psic s TMŽ poročajo o nezaželenih stranskih učinkih zdravil (Morris in sod., 1993; Tavares in sod., 2010). Pri vseh psicah s TMŽ iz raziskave Tavares in sod. (2010) in pri 10/18 psicah s TMŽ iz raziskave Morris in sod. (1993) so se pojavili nezaželeni stranski učinki podobni učinkom estrogena. Psice so imele med drugim oteklo vulvo, vaginalni izcedek, vnetje sečil in piometro. V obeh raziskavah so psice zdravili s tamoksifenom, sintetičnim nesteroidnim antiestrogenom, medtem ko je bila učinkovitost aglepristona, antagonista PR, po nam znanih podatkih, proučena le v eni raziskavi. Guil - Luna in sod. (2011) so 22 psic s karcinomi mlečne žleze zdravili z aglepristonom in ugotovili, da 5/13 tumorjev PR⁺ po 15 dneh ni več izražalo PR. Glede na ugotovitve naše in drugih raziskav, da so TMŽ pri psicah pogosteje ER⁻/PR⁺ kot pa ER⁺/PR⁻ (Martin de las Mulas in sod., 2005; Toniti in sod., 2009), bi bilo smiselno učinkovitost zdravljenja z aglepristonom dodatno preveriti.

Glede na dejstvo, da pes predstavlja dober model za raziskave TMŽ pri ženskah, raziskovalci ocenjujejo, da se bo število raziskav o metodah zdravljenja TMŽ pri psicah v prihodnje mogoče povečalo (Queiroga in sod., 2011b; Pinho in sod., 2012). TMŽ pri psicah in TMŽ pri ženskah imajo številne skupne karakteristike. Nastanek obeh je pogosto povezan s spolnimi hormoni, podobni so klinični parametri, ki pomembno vplivajo na prognozo bolezni. Skupne so posamezne značilnosti zgradbe, razvoja in razraščanja tumorjev. Pri malignih oblikah TMŽ pri psicah se pojavljajo nefiziološki vzorci izražanja celičnih označevalcev, ki se uporabljajo v diagnostiki in prognozi TMŽ pri ženskah (Sutter in Ostrander, 2004; Lindblad - Tob in sod., 2005; Khana in sod., 2006; Kumaraguruparan in sod., 2006; Gama in sod., 2008; Vinothini in sod., 2009; Queiroga in sod., 2011b; Pinho in sod., 2012). V veterinarski medicini za TMŽ pri psicah mejna vrednost, ki loči tumorje ER⁺/ER⁻, PR⁺/PR⁻ ali HER-2⁺/HER-2⁻, ni določena. Potrebne bi bile raziskave, ki bi mejno vrednost določile na podlagi odzivnosti psic s TMŽ na hormonsko zdravljenje oziroma kemoterapijo, kot je to določeno pri ženskah s TMŽ ER⁺, PR⁺ ali HER-2⁺ (Manee-in in sod., 2010; Martin de las Mulas in sod., 2005).

Rezultati številnih raziskav TMŽ pri ženskah o prognostični vrednosti IHC razvrščanja so podobni rezultatom naše raziskave. Izid bolezni je najboljši pri pacientkah s tumorji luminalnega podtipa A in B, medtem ko so tumorji podtipa HER-2 in bazalnega podtipa klinično agresivnejši (Sorlie in sod. 2003; Nielsen in sod., 2004; Carey in sod., 2006; Sorlie in

sod., 2006). Podobni so tudi rezultati raziskav ravni izražanja VEGF. V TMŽ pri ženskah je visoka raven izražanja VEGF povezana s slabo prognozo (Ghosh in sod., 2009; Delli Carpini in sod., 2010). Pri TMŽ pri ženskah so znana klinična preizkušanja zdravljenja z inhibitorji angiogeneze, v kombinaciji s kemoterapijo (Reddy in sod., 2012). Glede na rezultate naše raziskave bi takšen tip zdravljenja lahko bil uporaben tudi pri psicah z malignimi TMŽ.

Kljud številnim podobnim rezultatom raziskav TMŽ pri ženskah in TMŽ pri psicah, ostajajo nekatere razlike. Zanimiva so odstopanja pri oceni prognostične vrednosti HER-2. Medtem ko se HER-2 v TMŽ pri ženskah povečano ali močno izraža v agresivnih tumorjih in je močnejše izražanje povezano s slabo prognozo (Kim in sod., 2006; Badovinac - Crnjevic in sod., 2011; Petrelli in Barni, 2012), tega niso dokazale številne raziskave na malignih TMŽ pri psicah (Rungsipipat in sod., 2008; Hsu in sod., 2009; Kim in sod., 2011a; Ressel in sod., 2013) in tudi ne naša raziskava. Pri TMŽ pri ženskah je onkogena aktivnost HER-2 posledica več kopij gena (Moasser, 2007), medtem ko onkogeno delovanje HER-2 v TMŽ pri psicah še ni povsem pojasnjeno. Mallas in sod. (2003) so ugotovili, da se v posameznih TMŽ pri psicah HER-2 povečano ali močno izraža brez prisotnosti več kopij gena. Mogoče je, da za razliko od TMŽ pri ženskah onkogeno delovanje TMŽ pri psicah posledica mutacij gena (Murua Escobar in sod., 2001; Hsu in sod. 2009).

6 ZAKLJUČKI

- ❖ Potrdili smo prvo hipotezo: čas preživetja je najkrajši pri psicah s karcinomi bazalnega podtipa.
- ❖ Delno smo potrdili drugo hipotezo. Med karcinomi bazalnega podtipa je največ tumorjev stopnje diferenciacije III (52,9 %), medtem ko je delež karcinomov kompleksnega tipa najvišji med karcinomi luminalnega podtipa B (55,6 %) in ne med karcinomi luminalnega podtipa A, kot smo predvidevali.
- ❖ Potrdili smo tretjo hipotezo: raven izražanja VEGF v karcinomih različnih IHC podtipov je statistično značilno različna.
- ❖ Tumorji ER⁻ in PR⁻ so pogostejši pri psicah starih 10 let ali več in so največkrat slabše diferencirani anaplastični karcinomi, ki močno izražajo VEGF.
- ❖ VEGF se močneje izraža v karcinomih enostavnega tipa in anaplastičnih karcinomih.
- ❖ Karcinomi luminalnega podtipa A in B so pogosto karcinomi kompleksnega tipa in karcinomi *in situ*. Karcinomi bazalnega podtipa so največkrat slabo diferencirani tumorji enostavnega tipa, ki močno izražajo VEGF.
- ❖ Prognoza je slabša pri psicah starih 10 let ali več, kliničnega stadija IV, s karcinomi enostavnega tipa in malignimi mezenhimskimi tumorji, slabo diferenciranimi tumorji stopnje diferenciacije III, tumorji ER⁻ in PR⁻, tumorji z ravnijo izražanja VEGF 3 in karcinomi bazalnega podtipa.
- ❖ Raven izražanja PR (tumorji PR^{+/PR⁻), IHC razvrščanje in klinični stadij so najmočnejši prognostični dejavniki psic z malignimi TMŽ.}
- ❖ Določanje ravni izražanja PR v malignih TMŽ pri psicah ima enako močno prognostično vrednost kot določanje IHC podtipov.
- ❖ Določanje ravni izražanja HER-2 v malignih TMŽ pri psicah ima prognostično vrednost le v kombinaciji z ER in PR.
- ❖ Prognozo psic z malignimi TMŽ natančneje določimo ob kombinirani oceni prognostičnih dejavnikov.
- ❖ Statistično značilna je povezava med ravnjo izražanja VEGF in patohistološkim

razvrščanjem, ER, PR in preživetjem. Celični označevalec ostaja zanimiv za nadaljnje študije in morebitna prerizkušanja zdravljenja z inhibitorji angiogeneze.

- ❖ Statistično značilna je povezava med obema patohistološkima ocenama – patohistološkim razvrščanjem in stopnjo diferenciacije. Ocena stopnje diferenciacije pomembno dopoljuje patohistološko razvrščanje.
- ❖ Ugotovili smo raznolikost skupine karcinomov enostavnega tipa po Misdorpu in sod. (1999) in potrdili večjo uporabnost patohistološkega razvrščanja po Goldschmidtu in sod. (2011).
- ❖ Potrdili smo enak vzorec izražanja ER in PR in ugotovili negativno korelacijo med ER in VEGF. Proučevanje vzrokov za povezavo med ER in VEGF bi lahko bilo zanimivo za nove raziskave.
- ❖ V naši raziskavi so tumorji ER^-/PR^+ pogosteje (19 %) kot tumorji ER^+/PR^- (2,5 %). Glede na visok delež malignih TMŽ, ki so pozitivni na izražanje PR (72,2 %), bi bilo smiselno preveriti odzivnost psic na zdravljenje z aglepristonom, antagonistom PR.

7 POVZETEK

Maligni tumorji mlečne žleze (TMŽ) pri psicah predstavljajo zelo heterogeno skupino tumorjev in samo na podlagi klinične in patohistološke diagnostike je težko postaviti natančno prognozo bolezni. Zato so pomembna proučevanja dejavnikov, ki bi omogočili natančnejšo ocena poteka in izida bolezni. Poznani so že posamezni klinični in patohistološki parametri, ki so povezani s preživetjem psic s TMŽ. Imunohistokemična preiskava (ang. immunohistochemistry – IHC) v tumorjih omogoča določanje ravni izražanja proteinov, ki so povezani z napredovanjem tumorja, in v nabor dejavnikov, povezanih s prognozo bolezni pri psicah s TMŽ, so bili dodani posamezni t. i. celični označevalci. Raziskave izražanja celičnih označevalcev delane na TMŽ pri psicah so maloštevilne in rezultati posameznih raziskav so pogosto različni.

Na podlagi ravni izražanja določenih celičnih označevalcev, TMŽ pri psicah razdelimo v posamezne skupine IHC razvrščanja. Model je povzet po sistemu razvrščanja TMŽ pri ženskah in je bil uporabljen v dveh raziskavah TMŽ pri psicah. Si pa rezultati obeh raziskav o tem, kateri IHC podtip je povezana z najslabšo prognozo, nasprotujejo. Z našo raziskavo smo tako želeli preveriti prognostično vrednost IHC razvrščanja malignih TMŽ pri psicah. Zastavili smo si tri hipoteze in sicer, da so karcinomi bazalnega podtipa slabo diferencirani in povezani s slabo prognozo, da je med karcinomi luminalnega podtipa A največji delež karcinomov kompleksnega tipa in, da se VEGF statistično značilno različno izraža v posameznih IHC podtipih. Poleg proučevanja ravni izražanja celičnih označevalcev, smo v raziskavi upoštevali številne klinične (starost, pasma, steriliziranost, mesto tumorja, obsežnost kirurškega posega, navidezna brejost, klinični stadij) in patohistološke (patohistološko razvrščanje, patohistološki tip (enostaven/kompleksen), stopnja diferenciacije) parametre in ugotavljali njihovo morebitno povezanost s preživetjem psic. Proučili smo tudi povezave med posameznimi parametri.

V raziskavo smo vključili 81 malignih TMŽ 72 psic, katerim so tumorje kirurško odstranili med leti 2003 in 2010 na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Iz kliničnih kartotek psic smo zbrali klinične podatke o pasmi, starosti, steriliziranosti

psic, mestu tumorjev, morebitni zgodovini navidezne brejosti psic in kliničnem stadiju. Za vsak tumor je bila v okviru redne diagnostike na Inštitutu za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani opravljena patohistološka diagnostika na osnovi merit Svetovne zdravstvene organizacije. Poleg patohistološke diagnostike smo na podlagi merit, ki sta jih opredelila Elston in Ellis, karcinomom enostavnega, kompleksnega in posebnega tipa določili stopnjo diferenciacije. Z IHC preiskavo smo ugotavliali raven izražanja estrogenih (ER) in progesteronskih receptorjev (PR), receptorja za humani epidermalni rastni dejavnik 2 (ang. human epidermal growth factor receptor – HER-2) in vaskularnega endoteljskega rastnega dejavnika (ang. vascular endothelial growth factor – VEGF). Za preverjanje povezav med ravnem izražanja posameznih celičnih označevalcev in IHC razvrščanja malignih TMŽ z ostalimi spremenljivkami smo uporabili test Pearsonovega hi-kvadrata. Korelacije med ravnem izražanja celičnih označevalcev smo preverili s Spermanovim koeficientom korelacije. Krivulje preživetja smo izdelali z metodo po Kaplan - Meierju. Multivariatno analizo spremenljivk, ki bi lahko bile povezane s preživetjem dveh let po kirurški odstranitvi tumorjev, smo opravili s pomočjo Coxovega regresijskega modela sorazmernega tveganja.

Z našo raziskavo smo potrdili dve zastavljeni hipotezi in eno delno. Karcinomi bazalnega podtipa so povezani s slabo prognozo in raven izražanja VEGF je v posameznih IHC podtipih karcinomov mlečne žleze pri psicah različna. Karcinomi bazalnega podtipa so večinoma slabo diferencirani s stopnjo diferenciacije III. Večji delež karcinomov kompleksnega tipa je luminalnega podtipa B.

Z rezultati klinične ocene bolezni smo ugotovili, da je 80,3 % psic z malignimi TMŽ vključenih v našo raziskavo nesteriliziranih in, da jih je 65,3 % starih 10 let ali več. Več kot polovica (57,5 %) vseh tumorjev je bilo na zadnjih in predzadnjih mlečnih kompleksih. Tumorji so bili najpogostejši pri kokeršpanjelih (19,4 %).

Razporeditev tumorjev ER^+/ER^- in PR^+/PR^- je statistično značilno različna znotraj starostnih skupin, skupin kliničnega stadija, patohistološkega razvrščanja, patohistološkega tipa in stopnje diferenciacije malignih TMŽ pri psicah. Razporeditev tumorjev VEGF 0/VEGF 1/VEGF 2/VEGF 3 je statistično značilno različna znotraj starostnih skupin, skupin patohistološkega razvrščanja in patohistološkega tipa. Razporeditev karcinomov različnih IHC podtipov je

statistično značilno različna znotraj skupin patohistološkega razvrščanja, patohistološkega tipa in stopnje diferenciacije malignih TMŽ pri psicah. Ugotovili smo pozitivno korelacijo ($P < 0,001$) med ravnijo izražanja ER in PR in negativno korelacijo med ravnijo izražanja ER in VEGF ter PR in VEGF ($P < 0,05$ in $P < 0,001$).

Starost, klinični stadij, patohistološko razvrščanje, patohistološki tip, stopnja diferenciacije in raven izražanja ER (tumorji ER^+/ER^-), PR (tumorji PR^+/PR^-) in VEGF (tumorji VEGF 0/VEGF 1/VEGF 2/VEGF 3) so statistično značilno povezani s preživetjem psic z malignimi TMŽ. Po rezultatih multivariatne analize predstavljajo raven izražanja PR (tumorji PR^+/PR^-), IHC razvrščanje in klinični stadij najmočnejše prognostične dejavnike za psice z malignimi TMŽ. Ob kombinirani oceni ugotovimo, da imajo psice kliničnega stadija I s prognostično neugodnimi karcinomi bazalnega podtipa oziroma tumorji PR^- možnost preživetja in obratno, psice prognostično neugodnega kliničnega stadija IV imajo možnost preživetja, če imajo karcinome luminalnega podtipa A in B oziroma tumorje PR^+ .

Raziskave IHC razvrščanja malignih TMŽ pri psicah so maloštevilne in njihovi rezultati si nasprotujejo. V naši raziskavi smo ugotovili močno prognostično vrednost IHC razvrščanja in področje ostaja zanimivo za nadaljnje raziskave o možnosti zdravljenja psic s TMŽ po modelu zdravljenja žensk s TMŽ.

8 SUMMARY

Malignant mammary gland tumours represent a very heterogeneous group of neoplasms and it is difficult to establish a precise prognosis of the disease solely with clinical and histopathological diagnoses. Therefore, studying the factors which would enable a more accurate assessment of the disease progress and outcome is of great importance. Some clinical and histological parameters associated with the survival of the bitches with mammary gland tumours are already known. With immunohistochemical staining methods the expression level of proteins associated with tumour progression can be determined and some so-called cell markers have been added to the list of factors associated with the prognosis of bitches with mammary gland tumours. Studies of expression of cell markers in canine mammary gland tumours are scarce and the results often conflicting.

Based on the level of expression of specific cell markers, canine mammary gland tumours can be divided into groups by immunohistochemical classification. The model is adapted from a classification system of mammary gland tumours in women and has been applied in two studies of canine mammary gland tumours. However, the results of these two studies are contradictory. Therefore, the aim of our study was to assess the prognostic value of immunohistochemical classification of malignant mammary gland tumours in bitches. Three hypothesis were constructed namely, basal carcinomas are poorly differentiated and linked with poor prognosis, the highest proportion of complex type carcinomas is of luminal subtype A and that the level of VEGF expression in IHC subtypes differes significantly. In addition to studying the expression level of cell markers, numerous clinical (age, breed, spaying, tumour location, the extent of surgical procedure, pseudo-pregnancy, clinical stage) and histological (histopathological classification, histological type (simple/complex), histological grade) parameters were included into the study and their correlation with the survival of bitches was determined. In addition, the correlations between the parameters were studied.

The study included 81 malignant mammary gland tumours from 72 bitches that underwent surgery between 2003 and 2010 at the Clinic for small animal medicine and surgery at the

Veterinary Faculty of the University of Ljubljana were included into the study. Data on breed, age, spaying, tumour location, clinical stage and history of pseudo-pregnancy were collected from the medical records of the bitches. The histopathological diagnosis in accordance with the World health organization was determined as part of regular diagnostics at the Institute of pathology, administrative and forensic veterinary medicine at the Veterinary faculty of the University of Ljubljana. In addition to the histopathological diagnostics, simple, complex and special type carcinomas were histologically graded in accordance with Elston and Ellis. The expression level of oestrogen (ER) and progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) was assessed with immunohistochemical staining. To compare the expression of cell markers and immunohistochemical classification with other variables the Pearson's chi-square test was used. Using the Spearman's rank correlation coefficient the correlations between cell marker expression levels were calculated. Survival curves were constructed using the Kaplan-Meier method. The Cox proportional hazard model was used for multivariate analysis on factors potentially associated with 2-year survival.

Two hypothesis were confirmed while one was confirmed only partially. Our results show that basal carcinoma subtypes are associated with poor prognosis and that the level of expression of vascular endothelial growth factor differed between the mammary gland carcinomas of different immunohistochemical subtypes. The proportion of poorly differentiated tumours with histological grade III is the highest in the group of the basal subtype carcinomas of, while the proportion of complex type carcinomas is the highest in the group of luminal subtype B carcinomas.

According to the results of the clinical estimation of the disease, 80.3% of the bitches with malignant mammary gland tumours included in our study were not spayed and 65.3% were aged 10 years or more. More than half (57.5%) of all the tumours were located on the last and penultimate mammary complex. Tumours were most frequent in cocker spaniels (19.4%).

The distribution of ER⁺/ER⁻ and PR⁺/PR⁻ tumours differed significantly by the age, clinical stage, histopathological classification, histological type and degree of differentiation groups ($P<0.05$). The distribution of tumours VEGF 0/VEGF 1/VEGF 2/VEGF 3 differed significantly by

the age, histopathological classification and histological type groups. The distribution of carcinomas of different IHC subtype differed significantly by the histopathological classification, histological type and histological grade groups.

Age, clinical stage, pathohistological classification, histological type, histological grade, ER, PR and VEGF are significantly associated with survival of the bitches with malignant mammary gland tumours. According to the results of multivariate analysis, PR, immunohistochemical classification and clinical stage represents the strongest prognostic factors for the bitches with malignant mammary gland tumours. The combination of these parameters shows the possibility of survival in bitches with prognostically unfavorable basal type carcinomas or PR⁻ tumours when simultaneously the clinical stage I is estimated and vice versa the possibility of survival in bitches with prognostically unfavourable clinical stage IV, when the carcinomas are of luminal subtype A and B or PR⁺.

Studies of the immunohistochemical classification of malignant canine mammary gland tumours in dogs are scarce and their results contradictory. The results of our study indicate a strong predictive value of immunohistochemical classification and the field remains interesting for further studies of treatment options for bitches with mammary gland tumours based on the model of treatment of women with mammary gland tumors.

9 ZAHVALE

Najprej bi se rada zahvalila prof. dr. Poloni Juntes, ker me je izbrala med vsemi kandidati za mladega raziskovalca in mi tako omogočila vstop v svet raziskovanja. Zahvalila bi se ji rada tudi za pomoč pri patohistološki diagnostiki tumorjev mlečne žleze pri psicah.

Posebna zahvala gre prof. dr. Aleksandru Poli za idejo, na podlagi katere se je gradilo naše raziskovalno delo. Hkrati se zahvaljujem prof. dr. Francesci Millanta za vso strokovno podporo pri izvedbi in oceni imunohistokemičnih preiskav, patohistološko diagnostiko in oceno stopnje diferenciacije. Brez nje, naloga ne bi bila to kar je. Za strokovno pomoč pri izvedbi in oceni imunohistokemičnih preiskav bi se rada zahvalila tudi dr. Primožu Drevu iz Onkološkega Inštituta.

Rada bi se zahvalila mojemu mentorju, prof. dr. Milanu Pogačniku, ker ni obupal nad mano in mi je stal ob strani tudi v najtežjih trenutkih.

Posebna zahvala gre tudi moji somentorici izr. prof. dr. Jelki Zabavnik Piano za vso njeno skrb in pomoč pri nalogi, predvsem pa za pozitiven pogled, spodbudne besede in sproščen odnos. Zahvalila bi se rada članicam strokovne komisije za vse strokovne nasvete, odzivnost in hiter pregled naloge ter mag. Brigit Greč-Smole za pregled literature.

Zahvalila bi se rada vsem svojim bivšim sodelavcem na IPSUV. Asist. dr. Tanji Švara za njeno pomoč pri imunohistokemičnih preiskavah, interpretaciji rezultatov in za pogovore, ki so me navdali s pozitivno energijo. Dr. Suzani Žižek za angleško lektoriranje naloge, vedrost in strokovne debate s katerimi sem si širila obzorja. Asist. dr. Mitji Gombaču in Stanki Galuf za sproščenost in spodbudo. Benjaminu Cerku za pomoč pri pripravi pufrov in vsem ostalim, ki jih tu nisem omenila, da so, takšni kot so. Naša druženja ob malicah so bila vedno zabavna.

Rada bi se zahvalila tudi Alešu Butkoviču za vso računalniško pomoč. Vedno, ko sem bila zgubljena, mi je pomagal najti rešitev.

Zahvaljujem se mag. Mateji Stvarnik za potrepljivo odgovarjanje na vsa moja vprašanja in gospe Vanji Kovač za njeno ustrežljivost in prijaznost.

Hvaležna sem tudi svojim kolegicam, dr. Sari jagrič Munih, Nini Mlakar, Cvetki Marhold, Martini Krofič, Tanji Spanič, dr. Sari Prijič in asist. dr. Nataši Drnovšek. Naša druženja so me

navdajala z upanjem in dobro energijo.

Iz vsega srca sem hvaležna mojim domačim; staršem, bratu in mojemu fantu Primožu, za njihove spodbudne besede in brezpogojno ljubezen.

Hvaležna sem vsem ljudem, ki so me spremljali v tem obdobju ali samo za trenutek vstopili v moje življenje – vsak je pomembno prispeval k razvoju dogodkov in končnem rezultatu.

10 LITERATURA

1. Al - Dissi AN, Haines DM, Singh B, Kidney BA. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *Can Vet J* 2010; 51: 1109–14.
2. Andrechek ER, White D, Muller DJ. Targeted disruption of ErB2/Neu in the mammary epithelium results in impaired ductal outgrowth. *Oncogene* 2005; 24(5): 932–7.
3. Anderson E, Clarke RB. Steroid receptors and cell cycle in normal mammary epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9(1): 3–13.
4. Applanat MP, Buteau - Lozano H, Herve MA, Corpet A. Vascular endothelial growth factor is a target gene for estrogen receptor and contributes to breast cancer progression. *Adv Exp Med Biol* 2008; 617: 437–44.
5. Badovinac - Crnjević T, Jakic - Razumovic J, Podolski P, Pleština S, Sarčević B, Munjas R, Vrbanec D. Significance of epidermal growth factor receptor expression in breast cancer. *Med Oncol* 2011; 28(1): S121–8.
6. Barton M. Position paper: the membrane estrogen receptor GPER: clues and questions. *Steroids* 2012; 77(10): 935–42.
7. Basu A, Rowan BG. Genes related to estrogen action in reproduction and breast cancer. *Front Biosci* 2005; 10: 2346–72.
8. Beha G, Brunetti B, Asproni P, et al. Molecular portrait-based correlation between primary canine mammary tumor and its lymph node metastasis: possible prognostic-predictive models and/or stronghold for specific treatments? *BMC Vet Res* 2012a; 8(1): e219 (11 str.).
<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/219>
9. Beha G, Sarli G, Brunetti B, Sassi F, Ferrara D, Benazzi C. Morphology of the myoepithelial cell: immunohistochemical characterization from resting to motile phase. *Sci World J* 2012b; 2012: e252034 (8 str.).
<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/252034/>
10. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch.

Nat Rev Cancer 2003; 3: 401–10.

11. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, et al. How basal are triple-negative breast cancers? Int J Cancer 2008; 123(1): 236–40.
12. Bhat TA, Singh RP. Tumor angiogenesis: a potential target in cancer chemoprevention. Food Chem Toxicol 2008; 46: 1334–45.
13. Bronden LB, Nielsen SS, Toft N, Kristensen AT. Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. Vet Rec 2010; 166: 586–90.
14. Browne BC, Brien NO, Duffy MJ, Crown J, O'Donovan N. HER-2 signaling and inhibition in breast cancer. Curr Cancer Drug Targets 2009; 9: 419–38.
15. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature 2005; 438: 932–6.
16. Cepuder J. Vedenje tumorjev mlečne žleze pri psicah po kirurškem zdravljenju od leta 1992 do leta 1995. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1997. Magistrsko delo.
17. Chandra SA, Cline JM, Adler RR. Cyclic morphological changes in the beagle mammary gland. Toxicol Pathol 2010; 38(6): 969–83.
18. Chang CC, Tsai MH, Liao JW, Chang JP, Wong ML, Chang SC. Evaluation of hormone receptor expression for the use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. J Am Vet Med Assoc 2009; 235(4): 391–6.
19. Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumours: 79 cases (1998–2002). J Am Vet Med Assoc 2005; 227(10): 1625–9.
20. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, et al. Breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. Clin Cancer Res 2008; 14: 1368–76.
21. Chen MHS, Yip GWC, Tse GMK, et al. Expression of basal keratins and vimentin in breast cancers of young women correlates with adverse pathologic parameters. Mod Pathol 2008; 21(10): 1183–91.
22. Clarke RB, Anderson E, Howell A. Steroid receptors in human breast cancer. Trends Endocrinol Metabol 2004; 15: 316–23.

23. Connely OM, Mulac - Jericevic B, Lydon JP. Progesteron-dependent regulation of femal reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* 2003; 68: 771–8.
24. Correa de Sampaio P, Auslaender D, Krubasik D, in sod. A heterogeneous in vitro three dimensional model of tumour-stroma interactions regulating sprouting angiogenesis. *PLoS One* 2012; 7(2): e30753 (16 str.).
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0030753>
25. Dabrosin C. Sex steroid regulation of angiogenesis in breast tissue. *Angiogenesis* 2005; 8(2): 127–36.
26. Delli Carpini J, Karam AK, Montgomery L. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian and cervical cancer. *Angiogenesis* 2010; 13: 43–58.
27. Dellmann HD, Carithers JR. Special epidermal structures. In: Goldner B, ed. *Cytology and microscopic anatomy*. U S A: Williams & Wilkins, Media 1996: 338–40.
28. Monteiro – Riviere NA. Integument. Mammary gland. Frappier BL, Eurell JA, eds. In: Dellmann's textbook of veterinary histology. 6. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006: 320–49.
29. Dutra AP, Granja NVM, Schmitt PC, Cassali GD. C-erb-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary cancer. *Brazilian J Med Biol Res* 2004; 37: 1673–81.
30. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365(9472): 1687–717.
31. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403–10.
32. Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004; 6(3): 109–18.
33. Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmidt FC, Cassali GD. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol* 2009; 7: 230–5.

34. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 795–803.
35. Ferretti G, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Cognetti F. HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007; 19(1): 56–62.
36. Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM, et al. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/ glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 830–5.
37. Gadkar - Sable S, Shah C, Rosario G, Sachdeva G, Puri C. Progesteron receptors: various forms and functions in reproductive tissues. *Front Biosci* 2005; 10: 2118–30.
38. Gama A, Alves A, Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch* 2008; 453:123–32.
39. Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update* 2009; 15(1): 119–38.
40. Geraldes M, Gartner F, Schmitt F. Immunohistochemical study of homonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet Rec* 2000; 146: 403–6.
41. Ghosh S, Sullivan CO, Zerkowski MP, in sod. High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors VEGFR-1, VEGFR-2 and neuropilin-1 are associated with worse outcome in breast cancer. *Hum Pathol* 2008; 39(12): 1835–43.
42. Giretti MS, Simoncini T. Rapid regulatory actions of sex steroids on cell movement trough the actin cytoskeleton. *Steroids* 2008; 73: 895–900.
43. Gizinski S, Boryczko Z, Katkiewicz M, Bostedt H. Investigations on the peripheral steroid hormone concentration and on the estrogen receptor density and antigen Ki-67 distribution in mammary gland tumors of different calssification in bitches. *Tierarztl Prax Ausg Kleintiere Heimtiere* 2004; 32(4): 214–20.
44. Gobello C, Corrada Y. Canine mammary tumors: an endocrine clinical approach. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2001; 23: 705–10.
45. Goldhirsch A, Wood W, Gelber R, Coates A, Thurlimann B, Senn HJ. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast

- cancer 2007. Ann Oncol 2007; 18: 1133–44.
46. Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. Vet Pathol 2011; 48(1): 117–31.
47. Grunewald FS, Prota AE, Giese A, Ballmer-Hofer K. Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. Biochim Biophys Acta 2010; 1804(3): 567–80.
48. Guil - Luna S, Sanchez - Cespedes R, Millan Y, in sod. Aglepristone decreases proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. J Vet Intern Med 2011; 25: 518–23.
49. Gutierrez C, Schiff R. HER 2: Biology, detection and clinical implications. Arch Pathol Lab Med 2011; 135(1): 55–62.
50. Hall JM, McDonnell DP. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. Mol Interv 2005; 5(3): 43–57.
51. Hardy KM, Booth BW, Hendrix MJC, Salomon DS, Strizzi L. ErbB-EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2010; 15: 191–9.
52. Haupt B, Ro JY, Schwartz MR. Basal-like breast carcinoma. A phenotypically distinct entity. Arch Pathol Lab Med 2010; 134: 130–3.
53. Heldring N, Pike A, Andersson S, et al. Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. Physiol Rev 2007; 87: 905–31.
54. Hellmen E, Bergstrom R, Holmberg L, Spangberg IB, Hansson K, Lindgren A. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. Vet Pathol 1993; 30: 20–7.
55. Hellmen E, Lindgren A. The expression of intermediate filaments in canine mammary glands and their tumors. Vet Pathol 1989; 26: 420–8.
56. Hellmen E. Complex mammary tumours in the female dog: a review. J Dairy Res 2005; 72: 90–7.
57. Hennessy BT, Gonzalez - Angulo AM, Stemke-Hale K, in sod. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. Cancer Res 2009; 69(10): 4116–24.

58. Hovey RC, Trott JF, Vonderhaar BK. Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7(1): 17–38.
59. Hsu WL, Huang HM, Liao JW, Wong ML, Chang SC. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Vet J* 2009; 180: 116–23.
60. Hsu WL, Huang HM, Liao JW, Wong ML, Chang SC. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Vet J* 2009; 180: 116–23.
61. Huo D, Melkonian S, Rathouz PJ, Khramtsov A, Olopade OI. Concordance in histological and biological parametrs between first and second primary breast cancers. *Cancer* 2010; 117(5): 907–15.
62. Hyder SM. Sex-steroid regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Endocr-Relat Cancer* 2006; 13: 667–87.
63. Illera JC, Perez - Alenza MD, Nieto A, et al. Steroid and receptors in canine mammary cancer. *Steroids* 2006; 71: 541–8.
64. Itoh T, Uchida K, Ishikawa K, et al. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci*; 2005; 67: 345–7.
65. Iyer V, Klebba I, McCready J, et al. Estrogen promotes ER-negative tumor growth and angiogenesis through mobilization of bone-derived monocytes. *Cancer Res* 2012; 72(11): 2705–13.
66. Jezernik K, Veranič K, Sterle M. Celična biologija: učbenik za študente Medicinske fakultete. Ljubljana: DZS, 2012: 57–9.
67. Jones FE, Stern DF. Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene* 1999; 18: 3481–90.
68. Juntes P. Ocenjevanje proliferacijske aktivnosti tumorjev mlečne žleze pri psicah z meritvami AgNOR, mitotične aktivnosti in tumorskega markerja PCNA. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1997. Doktorska disertacija.

69. Khanna C, Lindblad - Toh K, Vail D, et al. The dog as a cancer model.
Nat Biotechnol 2006; 24: 1065–6.
70. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol* 2005; 133: 246–52.
71. Kim JH, Im KS, Kim NH, Yhee JY, Nho WG, Sur JH. Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: Histopathological and immunohistochemical study. *Vet J* 2011a; 189(3): 318–22.
72. Kim KH, Bender JR. Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 308: 3–8.
73. Kim KH, Toomre D, Bender JR. Splice isoform estrogen receptors as integral transmembrane proteins. *Mol Biol Cell* 2011b; 22(22): 4415–23.
74. Kim MJ, Ro JY, Ahn SH, Kim HH, Kim SB, Gong G. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Hum Pathol* 2006; 37: 1217–26.
75. Koch S, Claesson - Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(7): e a006502 (21 str.).
<http://www.biochemj.org/bj/4370169/bj4370169.htm>
76. Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, et al. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids* 2011; 2011: e812540 (7 str.).
<http://www.hindawi.com/journals/jaa/2011/812540/>
77. Kumaraguruparan R, Prathiba D, Nagini S. Of humans and canines: immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res Vet Sci* 2006; 81(2): 21–24.
78. Kusinska RU, Kordek R, Pluciennik E, Bednarek AK, Piekarski JH, Potemski2 P. Does vimentin help to delineate the so-called 'basal type breast cancer'? *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28:118–26.
79. Lakhani SR, O'Hare MJ. The mammary myoepithelial cell – Cinderella or ugly sister? *Breast Cancer Res* 2001; 3(1): 1–4.
80. Lana SE, Rutteman GR, Withrow SJ. Tumors of the mammary gland. V: Withrow SJ, Vail

- DM, eds. Withrow and MacEven's small animal clinical oncology. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007: 619–36.
81. Lanari C, Molinolo A. Progesterone receptors animal models and cell signaling in breast cancer, diverse activation pathways for the PR: possible implications for breast biology and cancer. *Breast Cancer Res* 2002; 4(6): 240–3.
82. Lee S, Chen TT, Barber CL. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 2007; 130(4): 691–703.
83. Lee WM, Kooistra HS, Mol JA, Dieleman SJ, Schaefers-Okkens AC. Ovariectomy during luteal phase influences secretion of prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the bitch. *Theriogenology* 2006; 66(2): 484v90.
84. Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metabol* 2009; 20: 477–82.
85. Liang Y, Hyder SM. Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects. *Endocrinology* 2005; 146 (8) : 3632–41.
86. Lindblad - Tob K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlson EK, Jaffe DB. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 2005; 438: 803–19.
87. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 264–71.
88. Lopuszynski W, Komsta R, Nozdrym-Plotnicki Z, Szczubial M. Prognostic value of cell proliferation in canine malignant mammary tumours. *Bull Vet Inst Pulawy* 2009; 53: 269–76.
89. Lovšin Barle E. Estrogen receptorji. *Vet Nov* 2004; 30: 379–86.
90. Mady EA, Ramadan EEDH, Ossman AA. Sex steroid hormones in serum and tissue of benign and malignant breast tumor patients. *Dis Markers* 2000; 16: 151–7.
91. Manee-in S, Srisuwatanasagul S, Lohachit C, Sirivaidyapong S. The number of ER α and PR in the mammary glands of bitches with and without tumor mass using IHC assay. *Comp Clin Pathol* 2009; 18: 221–7.
92. Manee-in S, Srisuwatanasagul S, Lohachit C, Suwimonteerabutr J, Sirivaidyapong S.

- Estrogen receptor alpha (ER α) and progesterone receptor (PR) in the mammary gland of bitches during different stages of estrous cycle. *Comp Clin Pathol* 2010; 19: 173–8.
93. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133(4): 704–15.
94. Mann M, Cortez V, Vadlamudi RK. Epigenetics of estrogen receptor signaling: role in hormonal cancer progression and therapy. *Cancers* 2011; 3(3): 1691–707.
95. Martin de las Mulas JM, Van Niel M, Millan Y, et al. Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumourous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. *Res Vet Sci* 2002; 72(2): 153–61.
96. Martin de las Mulas JM, Ordas J, Millan Y, Fernandez-Soria V, y Cajal SR. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 80: 363–7.
97. Martin de las Mulas JM, Ordas J, Millan MY, et al. Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in normal and tumoral canine mammary glands. *Vet Pathol* 2004; 41(3): 269–72.
98. Martin de las Mulas JM, Millan MY, Dios RA. Prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol* 2005; 42: 200–12.
99. Matos AJF, Faustino AMR, Lopes C, Rutteman GR, Gartner F. Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. *Vet Rec* 2006; 158: 626–30.
100. Ribeiro GM, Bertagnolli AC, Rocha RM, Cassali GD. Morphological aspects and immunophenotypic profiles of mammary carcinomas in benign-mixed tumors of female dogs. *Vet Med Int* 2012; 2012: e432763 (7 str.).
- <http://www.hindawi.com/journals/vmi/2012/432763/>
101. Menard S, Campiglio CM, Pupa SM, Tagliabue E. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2965–78.
102. Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C et al. Cancer incidence in pet dogs: findings of the animal tumor registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med* 2008; 22(4): 976–84.
103. Metze K, Adam RL. Comments on the paper "c-erbB-2 expression and nuclear

- pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz Med Biol Res* 2005; 38(2): 141–3.
104. Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci* 2005; 79(3): 225–32.
105. Millanta F, Caneschi V, Ressel L, Citi S, Poli A. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma. *J Comp Pathol* 2010; 142(1): 36–42.
106. Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, et al. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Res Vet Sci* 2006; 81: 350–7.
107. Miller VM, Duckles SP. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 210–41.
108. Misdorp W, Else RW, Helmen E, Lipscomb TP, eds. *Histological classification of mammary tumours of the dog and the cat*. Washington: The Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999: 18–25. (WHO International histological classification of tumours of domestic animals, second series, vd. 7)
109. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis: v review. *Oncogene* 2007; 26: 6469–87.
110. Moe L. Population-based tumors of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl* 2011; 57: 439–43.
111. Mol JA, Lantinga-van Leeuwen IS, van Garderen E, et al. Mammary growth hormone and tumorigenesis - lessons from the dog. *Vet Q* 1999; 21(4): 111–5.
112. Morris JS, Dobson JM, Bostock DE. Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Vet Rec* 1993; 133: 539–42.
113. Morris JS. Improving the diagnosis and treatment of canine mammary tumours: Immunohistochemical markers as prognostic tools. *Vet J* 2010; 184 (1): 3–4.
114. Munson L, Moresco A. Comparative pathology of mammary gland cancers in

- domestic and wild animals. Breast Dis 2007; 28: 7–21.
115. Murphy LC, Leygue E. The role of estrogen receptor-β in breast cancer. Semin Reprod Med 2012; 30(1): 5–13.
116. Murphy S. Mammary tumours in dogs and cats. In Pract 2008; 30: 334–9.
117. Murua Escobar H, Becker K, Bullerdiek J, Nolte I. The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrationsn in tumors of the dog (*Canis familiaris*). Cytogenet Cell Genet 2001; 94 (3/4): 194–5.
118. Nakopoulou L, Stefanaki K, Panayotopoulou E, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/Fik-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation. Human Pathol 2002; 33(9): 863–70.
119. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res 2004; 10(16): 5367–74.
120. Nieto A, Pena L, Perez-Alenza MD, Sanchez MA, Flores JM, Castano M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. Vet Pathol 2000; 37: 239–47.
121. Owens LN. TNM classification of tumors in domestic animals. Geneva: World Health Organization, 1980.
122. Papa PC, Hoffmann B. The corpus luteum of the dog: source and target of steroid hormones? Reprod Dom Anim 2011; 46: 750–6.
123. Park JW, Richard MN, Szollosi J, Benz CC. Unraveling the biologic and clinical complexities of HER2: comprehensive review. Clin Breast Cancer 2008; 392–401.
124. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. J Clin Oncol 2009; 27: 1160–7.
125. Payne SJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer: the present. Histopathology 2008; 52: 82–90.
126. Pena L, De Andres PJ, Clemente M, Cuesta P, Perez-Alenza MD. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics.

- Vet Pathol 2013; 50(1): 94–105.
127. Perez Alenza MD, Rutteman GR, Pena L, Beynen AC, Cuesta P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. J Vet Intern Med 1998; 12: 132–9.
128. Perou CM, Sorlie T, Elsen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000; 406(6797): 747–52.
129. Pereira CT, Rahal SC, de Carvalho Balieiro JC, Ribeiro AA. Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dog: can it really be altered? Anat Histol Embryol 2003; 32: 282–90.
130. Petrelli F, Barni S. Role of HER2-neu as a prognostic factor for survival and relapse in pT1a-bN0M0 breast cancer: a systematic review of the literature with a pooled-analysis. Med Oncol 2012; 29: 2586–93.
131. Philibert JC, Snyder PW, Glickman N, Glickman LT, Knapp DW, Waters DJ. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. J Vet Intern Med 2003; 17: 102–6.
132. Pietras RJ. Interactions between estrogen and growth factors receptors in human breast cancers and the tumor-associated vasculature. Breast J 2003; 9: 361–73.
133. Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gartner F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. Transl Res 2012; 159(3): 165–72.
134. Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. Crit Rev Oncol Hematol 2004; 51: 55–67.
135. Polyak K, Hu M. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? J Mammary Gland Biol Neoplas 2005; 10: 231–47.
136. Qiu CW, Lin DG, Wang JQ, Li CY, Deng GZ. Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. Vet Res Commun 2008; 32: 463–72.
137. Queiroga FL, Pires I, Parente M, Gregorio H, Lopes CS. COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. Vet J 2011; 189(1): 77–82.
138. Queiroga FL, Raposo T, Carvalho MI, Prada J, Pires I. Canine mammary tumours as a

- model to study human breast cancer: most recent findings. *Vivo* 2011b; 25(3): 455–65.
139. Raica M, Cimpeana AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* 2009; 45: 1924–34.
140. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4772–8.
141. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26(19): 3153–8.
142. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology* 2009; 41(1): 40–7.
143. Ramalho LNZ, Ribeiro-Silva A, Cassali GD, Zucoloto S. The expression of p63 and cytokeratin 5/6 in mixed tumors of the canine mammary gland provides new insight into the histogenesis of these neoplasms. *Vet Pathol* 2006; 43: 424–9.
144. Rapisarda A, Melillo G. Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy. *Adv Cancer Res* 2012; 114: 237–67.
145. Rasotto R, Zappulli V, Castagnaro M, Goldschmidt MH. A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Vet Pathol* 2012; 49(2): 330–40.
146. Reddy S, Raffin M, Kaklamani V. Targeting angiogenesis in metastatic breast cancer. *Oncologist* 2012; 17(8): 1014–26.
147. Rehm S, Stanislaus DJ, Williams AN. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defect Res B Dev Reprod Toxicol* 2007; 80(3): 233–45.
148. Reis - Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol* 2006; 59: 225–31.
149. Ressel L, Puleio R, Loria GR, et al. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. *Res Vet Sci* 2013; 94: 299–305.
150. Restucci B, Papparella S, Maiolino P, De Vico G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 2002; 39: 488–93.
151. Richards HG, McNeil PE, Thompson H, Reid SW. An epidemiological analysis of a

- canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service.
Prev Vet Med 2001; 51(1/2): 125–36.
152. Rigler L. Anatomija domačih živali. Angiologia in integumentum commune: skripta za študente veterinarstva. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1992: 401–10.
153. Rezaie A, Tavasoli A, Bahonar A, Mehrazma M. Grading in canine mammary carcinoma. *J Biol Sci* 2009; 9(4): 333–8.
154. Rodriguez - Pinilla SM, Sarrio O, Honrado E, et al. Vimentin and laminin expression is associated with basal-like phenotype in both sporadic and BRCA1-associated breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2007; 60: 1006–12.
155. Rosen JM. Hormone receptor patterning plays a critical role in normal lobuloalveolar development and breast cancer progression. *Breast Dis* 2003; 18: 3–9.
156. Roy D, Liehr JG. Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutat Res* 1999; 424:107–15.
157. Rungsipipat A, Tangkawatana S, Sailasuta A, Lohachit C, Chariyalertsak. C-erbB-2 oncogene and P21WAF/CIP1 tumor suppressor gene expression as prognostic factors in canine mammary adenocarcinomas. *Comp Clin Pathol* 2008; 17: 35–41.
158. Saba CF, Rogers KS, Newman SJ, Mauldin GE, Vail DM. Mammary gland tumors in male dog. *J Vet Intern Med* 2007; 21(5): 1056–9.
159. Sakuma A, Nishiyama S, Yasuno K, Ohmuro T, Kamiie J, Shirota K. A case of canine cutaneous clear cell adnexal expression of smooth muscle actin. *J Toxicol Pathol* 2010; 23: 265–9.
160. Salgado BS, Cassali GD. Prospectives for improved and more accurate classification of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol Online First – 25. sept 2012.*
- <http://vet.sagepub.com/content/early/2012/09/24/0300985812461364.full.pdf+html?rss=1>
161. Santos AAF, Oliveira JT, Lopes CCC, Amorim IF, Vicente CMFB, Gartner FRM, Matos AJF. Immunohistochemical expression of VEGF in canine mammary tumours. *J Comparative Oncol* 2010a; 143(4): 268–75.
162. Santos M, Marcos R, Faustino AMR. Histological study of canine mammary gland during the oestrus cycle. *Reprod Dom Anim* 2010b; 45(5): e146–54.
163. Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Castellani G, Marcato PS. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors.

- J Vet Diagn Invest 2002; 14: 25–34.
164. Sassi F, Benazzi C, Castellani G, Sarli G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *Vet Res* 2010; 6 (5): 1–9.
165. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68(18): 3033–46.
166. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, in sod. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* 2006; 174(2): 169–74.
167. Silver IA. The anatomy of the mammary gland of the dog and cat. *J Small Anim Pract* 1966; 7, 689–96.
168. Sleeckx N, de Rooster H, Veldhuis Kroeze EJB, Van Ginneken C, Van Brantegem L. Canine mammary tumors: an overview. *Reprod Dom Anim* 2011; 46: 1112–31.
169. Sopel M. The myoepithelial cell: its role in normal mammary glands and breast cancer. *Folia Morphol (Warsz)* 2010; 69(1): 1–14.
170. Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33: 537–96.
171. Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, et al. Canine mammary gland tumours: a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol* 2009; 7: 162–72.
172. Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol* 2011; 48(1): 85–97.
173. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(19): 10869–74.
174. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8418–23.
175. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analysis across three different platforms. *BMC Genomics* 2006; 7: e127 (15 str.), 26.5.2006.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1489944/>

176. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(18): 10393–8.
177. Sousa B, Paredes J, Milanezi F, et al. P-cadherin, vimentin and CK14 for identification of basal-like phenotype in breast carcinomas: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 2010; 25: 963–74.
178. Stern DF. ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008; 13: 215–23.
179. Stingl J. Estrogen and progesteron in normal mammary gland development and in cancer. *Horm Cancer* 2011; 2: 85–90.
180. Sutter NB, Ostrander EA. Dog star rising: the canine genetic system. *Nature* 2004; 5: 900–10.
181. Szczubial M, Lopuszynski W. Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet Comp Oncol* 2011; 9(4): 296–303.
182. Tavares WLF, Lavalle GE, Figueiredo MS, et al. Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Vet Scand* 2010; 52: 67–72.
183. Thuroczy J, Reisvaag GJK, Perge E, Tibold A, Szilágyi, Balogh L. Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 2007; 137 (2-3): 122–9.
184. Toniti W, Buranasinsup S, Kongcharoen A, Charoonrut P, Puchadapirom P, Kasorndorkbua C. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2009; 10: 907–11.
185. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* 2002; 161(6): 1991–6.
186. Veronesi MC, Battocchio M, Rizzi C, Sironi G. Relationship between dysplastic and neoplastic mammary lesions and pseudopregnancy in the bitch. *Vet Res Commun* 2003; 27(1): 245–7.
187. Vinothini G, Balachandran C, Nagini S. Evaluation of molecular markers in canine mammary tumors: correlation with histological grading.

Oncol Res 2009; 18(5/6): 193–201.

188. Vos JH, van den Ingh TSGAM, Misdorp W, et al. Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and α -smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: malignant mammary tumours. *Vet Q* 1993; 14: 96–102.
189. Vos JH, van den Ingh TSGAM, Misdorp W, in sod. Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and α -smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: normal mammary tissue. *Vet Q* 1993; 14: 102–7.
190. Watson CJ, Khaled WT. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* 2008; 135: 995–1003.
191. Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson ER, Warner M, Gustafsson JA. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett* 2003; 546(1): 17–24.
192. Wetzels RH, Holland R, van Haelst UJ, Lane EB, Leigh IM, Ramaekers FC. Detection of basement membrane components and basal cell keratin 14 in noninvasive and invasive carcinomas of the breast. *Am J Pathol* 1989; 134(3): 571–9.
193. Windoffer R, Beil M, Magin TM, Leube LE. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J Cell Biol* 2011; 194(5): 669–78.
194. Xiao-Dong F, Goglia L, Sanchez AM, in sod. Progesteron receptor enhances breast cancer cell motility and invasion via extranuclear activation of focal adhesion kinase. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: 431–43.
195. Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *J Vet Med Sci* 1996; 58(11): 1079–83.
196. Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers* 2006; 10(4): 515–27.
197. Yue W, Wang JP, Li Y, et al. Tamoxifen versus aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *Clin Cancer Res* 2005; 15(11): 925s–30s.
198. Zaninović P. Model ugotavljanja in zdravljenja novotvorb mlečne žleze pri psicah. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1990. Doktorska disertacija.
199. Žnideršič L. Epidemiološke, klinične in patomorfološke raziskave tumorjev pri psih. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1998. Magistrsko delo.

11 PRILOGE

Priloga 1: Vprašalnik, ki je bil v primeru manjkajočih podatkov poslan po pošti lastnikom psic s tumorji mlečne žleze

Annex 1: The questionnaire sent by mail to the owners of the bitches with mammary gland tumours in case any data were missing.

Spoštovani gospod/gospa _____. .

Sem Mojca Cerovšek in sem zaposlena kot mlada raziskovalka na Inštitutu za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani. V okviru svoje doktorske naloge proučujem tumorje mlečne žleze pri psicah in sicer nameravam v raziskavo vključiti tiste tumorje, ki smo jih na naš inštitut prejeli med letom 2003 in 2009 iz Klinike za kirurgijo in male živali na Veterinarski fakulteti. V to skupino pade tudi vaša psička _____, kateri so tumorje na kliniki odstranili leta _____. Za raziskavo potrebujem podatke o stanju vaše psičke dve leti po kirurški odstranitvi tumorja, zato bi vam bila hvaležna, če mi lahko odgovorite na vprašanja v spodnji anketi in mi sporočite, kaj se je z vašo psičko dogajalo znotraj dveh let po operaciji. V primeru, da je v tem času poginila ali pa so se tumorji ponovno pojavili, bi potrebovala tudi podatek v kolikšnem času po operaciji je do tega prišlo. Kratka anketa vas bo vodila skozi vprašanja, na katera bi želela odgovore, izpolnjen list mi prosim vrnite v priloženi kuverti.

Za vaše sodelovanje se vam najlepše zahvaljujem, saj boste s tem pripomogli k obsežnejši in zato še bolj uporabni raziskavi o tumorjih mlečne žleze pri psicah.

Hvala in en lep pozdrav.

Mojca Cerovšek, dr. vet. med.

1) Vaša psička _____ je bila operirana leta _____. .

Ali so se po tem času ponovno pojavili tumorji? DA NE
Če ste odgovorili z DA, prosim pripišite, kdaj so se pojavili (meseci, dnevi po operaciji)

Ali je psička v času 2 let po operaciji poginila? DA NE

Če ste odgovorili z DA, prosim pripišite še vzrok pogina:

a) psička je poginila zaradi tumorjev mlečne žleze

b) drugo _____

Ali je bila psička v času 2 let po operaciji evtanazirana? DA NE

Če ste odgovorili z DA, prosim pripišite še vzrok evtanazije:

a) psička je bila evtanazirana zaradi tumorjev mlečne žleze

b) drugo _____