

Badanie histopatologiczne w onkologii weterynaryjnej. Część IV. Nowotwory gruczołu sutkowego u suk

Izabella Dolka, Rafał Sapieryński

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Nowotwory gruczołu sutkowego (mammary gland tumors – MGT) są powszechnie występującymi guzami u suk niesterylizowanych z częstością występowania około 250 przypadków na 100 tys. psów rocznie. Obserwacje kliniczne wskazują, że na występowanie guzów gruczołu sutkowego u suk ma wpływ czas wykonanej ovariectomii. Im wcześniej została przeprowadzona (przed pierwszym czy drugim cyklem), tym względne ryzyko rozwoju guza jest mniejsze w porównaniu z sukami sterylizowanymi po drugim cyklu lub po ukończeniu 2½ lat, czy też z sukami niesterylizowanymi (1, 2, 3). Guzy sutka rozpoznawane są zdecydowanie częściej u suk niesterylizowanych, osobników starszych, częściej u psów rasowych niż u mieszzańców, ponadto wydaje się, że suki ras małych także chorują częściej. Według danych literaturowych około 50% zmian nowotworowych gruczołu sutkowego u suk ma charakter złośliwy (głównie raki), jednak z doświadczeń własnych, a także informacji zawartych w nowszych doniesieniach wynika, że nowotwory złośliwe przeważają nad ich niezłośliwymi odpowiednikami (około 70–74% guzów sutka ma charakter złośliwy). Co istotne, złośliwe nowotwory sutka (mammary cancers, mammary gland cancers, mammary malignant tumors) mogą mieć różnorodny obraz histologiczny, stopień histologicznej złośliwości (patrz dalej) i różnią się od siebie znacznie pod względem zachowania biologicznego, tj. tendencją do dawania wznowy, przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych i miejsc odległych, współczynnikiem umieralności, czasem przeżycia, a także, co wynika z powyższego, metodami leczenia chorych psów. Oszacowano, że umieralność (liczba zgonów z powodu nowotworu na określonej liczbie pacjentów z tym nowotworem; umieralność wynosi 50%, jeżeli w danym czasie z powodu nowotworu umrze połowa pacjentów z danym nowotworem) w przypadku złośliwych nowotworów sutka u suk waha się w granicach od 20 do 55%, przy czym istnieją tu wyraźne różnice geograficzne (największa umieralność została odnotowana w USA, a najniższa we Włoszech; 4, 5).

Istnieje wiele potencjalnych parametrów (markerów), które można stosować jako czynniki o znaczeniu rokowniczym w przypadku nowotworów u ludzi i zwierząt, generalnie można je podzielić na czynniki epidemiologiczne, kliniczne (możliwe do określenia w trakcie badania klinicznego pacjenta, popartego technikami obrazowymi), mikroskopowe (takie, które można oceniać w trakcie analizy cytologicznej lub histopatologicznej), molekularne (oceniane dzięki zastosowaniu technik molekularnych) oraz inne. Istnieje wiele źródeł publikacyjnych, w których przedstawiono badania oceniające wykorzystanie takich markerów, jednak badania takie mają różną wiarygodność (6). Najbardziej wskazane badania to badania prospektywne obejmujące liczne grupy zwierząt, z długimi okresami obserwacji, których wyniki poddano wielowymiarowej/wieloczynnikowej analizie statystycznej (multivariate statistical analysis). W medycynie weterynaryjnej najwięcej badań poświęconych czynnikom rokowniczym u pacjentów onkologicznych ma charakter badań retrospektywnych, gdzie uzyskane wyniki poddano jednowymiarowej/jednoczynnikowej analizie statystycznej (univariate statistical analysis), co sprawia, że wnioski płynące z takich badań nie zawsze są jednoznaczne. Ostatecznie, niektóre z czynników prognostycznych uznanych za istotne statystycznie w analizie jednowymiarowej tracą swoje znaczenie jako niezależne czynniki prognostyczne w analizie wieloczynnikowej (6).

Czynniki rokownicze w nowotworach gruczołu sutkowego u suk

Epidemiologiczne i kliniczne czynniki o znaczeniu rokowniczym

Ocenia się, że rokowanie w przypadku złośliwych nowotworów sutka jest gorsze u suk starszych, które przekroczyły 10 lat życia, a także u pacjentek, które mają większą masę ciała (psy ras dużych i olbrzymich). Nie ma jak dotąd przekonujących dowodów, które wskazywałyby na przydatność parametrów związanych ze statusem reprodukcyjnym suk

Histopathology in veterinary oncology. Part IV. Mammary gland tumors in female dogs

Dolka I., Sapieryński R. Department of Pathology and Veterinary Diagnostics Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

Mammary gland tumors are cancers with high clinical importance in canine veterinary practice, with the incidence estimated as high as 198 cases per 100.00 dogs per year, regardless of the sex. Most mammary tumors occur in middle aged and older dogs with a very low incidence in young animals. Clinically, dogs affected are presented to the clinic with solid or multiple masses in mammary glands, usually without clinical signs of systemic disease. Some clinical features, including rapid growth, superficial ulceration and fixation to underlying tissues are considered to be typical for malignant tumors. Microscopic examination of the removed mass or its sample with identification of histologic subtype, histological grade and vessels invasion, as the most important parameters, is crucial to the diagnosis and prognosis. In this article we have described various factors that are important in prognostication when mammary gland cancer in female dog is recognized.

Keywords: female dogs, mammary gland tumors, histopathology, histologic grade, prognosis.

(liczba potomstwa, regularność cyklu jajnikowego, liczba i długość rui, występowanie ciąży urojonych) na określenie rokowania. W jednym z badań wykazano, że rokowanie jest gorsze u suk, u których okres, jaki upłynął od sterylizacji do rozpoznania guza, był dłuższy niż 4 lata (7).

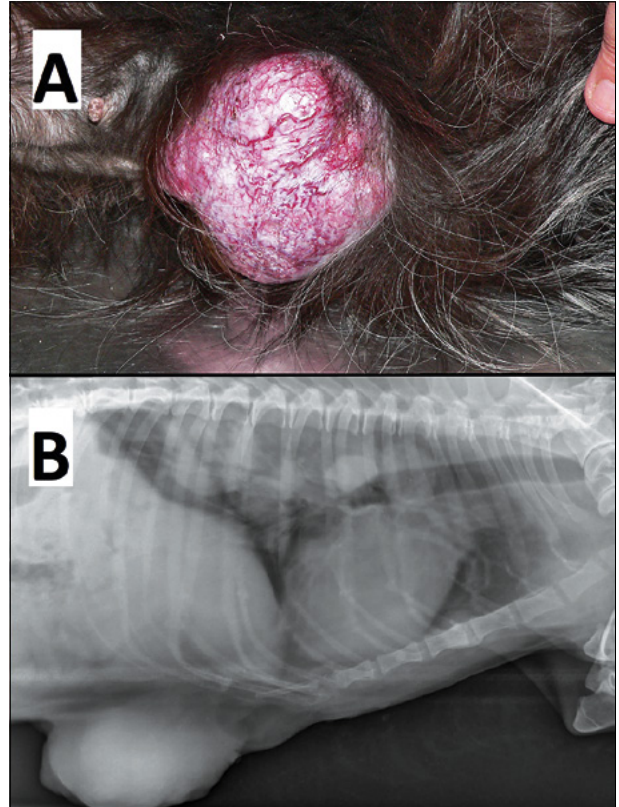
Nadwaga lub otyłość mogą mieć znaczenie rokownicze u suk z nowotworami gruczołu sutkowego, wykazano bowiem że złośliwe guzy pojawiają się istotnie częściej u suk ze zwiększoną ilością tkanki tłuszczowej (średnia wieku 8,7 roku), niż u samic, u których ilość tkanki tłuszczowej była optymalna lub obniżona (średnia wieku 10,4 roku), ponadto u suk z nadwagą obserwowano najwyższy odsetek raków o najwyższym III stopniu złośliwości histologicznej (8).

Do dobrze znanych parametrów klinicznych, które mają znaczenie w określaniu rokowania u suk z guzami sutka, należą: szybkie tempo wzrostu guza (tzw. krótki wywiad), wielkość guza w momencie rozpoznania, obecność owrzodzenia, powiększenie regionalnych węzłów chłonnych (przerzuty do węzłów chłonnych potwierdzone badaniem cytologicznym lub histopatologicznym) czy związanie z tkankami otaczającymi – tzw. kliniczne cechy złośliwości (ryc. 1). Rokowanie jest gorsze u suk, u których w momencie rozpoznania



Ryc. 1. Obraz kliniczny raka gruczołu sutkowego u suk – widoczny duży, zlokalizowany w tylnym pakiecie gruczołowym kulisty guz, który wykazuje powierzchowne owrzodzenie – typowe cechy złośliwości klinicznej nowotworu

Ryc. 2. Rak prosty lity, o wysokim (III) stopniu złośliwości histologicznej gruczołu sutkowego u suk. Na rycinie A widoczny duży, kulisty guz pokryty bogatą siecią naczyń krwionośnych. Na rycinie B obraz RTG klatki piersiowej psa z ryciny A – oprócz widocznego cienia, jaki daje guz w gruczole sutkowym, widoczne są mnogie kuliste przerzuty do mięszu płuc



guz miał średnicę przekraczającą 3 cm i charakteryzował się naciekowym wzrostem (9, 10). Okres przeżycia u suk z guzami o średnicy mniejszej niż 3 cm wynosił średnio 22 miesiące i był istotnie dłuższy niż u suk, u których średnica guza była równa lub przekraczała 3 cm (średnio 18,3 miesiąca; 9), chociaż w innym badaniu niekorzystny efekt rokowniczy obserwowano już przy średnicy guza przekraczającej 2 cm (5). W badaniach Rasotta i wsp. (11) zwiększenie się średnicy guza korelowało z gorszym rokowaniem, wyrażonym krótszymi okresami przeżycia oraz zwiększonym ryzykiem pojawienia się wznowy miejscowej i przerzutów odległych. Obecność owrzodzenia rokuje niekorzystnie, bowiem mediana okresu przeżycia (median survival time – MST) dla suk, u których w badaniu klinicznym nie stwierdzono owrzodzenia skóry pokrywającego guza wyniosła 443 dni, a odsetek suk, które przeżyły 2 lata od zabiegu wyniósł 45%, z kolei parametry te dla suk, u których były owrzodzenia

Tabela 1. Kliniczne cechy złośliwości nowotworów gruczołu sutkowego u suk

Szybki wzrost guza („krótki wywiad”)
Duża masa/średnica guza
Obecność owrzodzenia powierzchni lub martwicy w centrum masy guza
Związan z tkankami otaczającymi (brak przesuwalności względem podłoża i leżącej ponad nim skóry)
Powiększenie regionalnego węzła chłonnego (obrzęk, bolesność)

skóry w momencie rozpoznania wyniosły odpowiednio 118 dni i 5,4% (12). Kliniczne cechy nowotworów gruczołu sutkowego u suk, które sugerują ich złośliwy charakter, zaprezentowano w **tab. 1**.

Stopień/stadium zaawansowania klinicznego

Od wielu lat u psów ze złośliwymi nowotworami sutka stosuje się **klasyfikację kliniczną (stopień zaawansowania**

klinicznego, system TNM) opracowaną na podstawie oceny wielkości ogniska pierwotnego (T – tumor), badania regionalnych węzłów chłonnych (N – noduli) i występowania przerzutów (M – metastasis; **tab. 2**). W różnych badaniach wykazano przydatność rokowniczą tego systemu, z głównym założeniem, że wzrost stopnia zaawansowania klinicznego wiąże się z gorszym rokowaniem, przy uwzględnieniu takich parametrów jak mediana okresu przeżycia czy odsetek przeżyć po leczeniu

Tabela 2. Schemat klasyfikacji stadium/stopnia zaawansowania klinicznego nowotworów gruczołu sutkowego u suk (klasyfikacja TNM)

T – guz pierwotny			
T ₁		Największa średnica guza <3 cm	
T ₂		Największa średnica guza 3–5 cm	
T ₃		Największa średnica guza >5 cm	
N – regionalne węzły chłonne			
N ₀		Brak dowodów na obecność przerzutów do węzłów	
N ₁		Przerzuty do węzłów chłonnych	
M – przerzuty odległe			
M ₀		Brak dowodów na przerzuty odległe	
M ₁		Obecność przerzutów odległych	
Stadium zaawansowania klinicznego			
1	T ₁	N ₀	M ₀
2	T ₂	N ₀	M ₀
3	T ₃	N ₀	M ₀
4	Każdy T	N ₁	M ₀
5	Każdy T	Każdy N	M ₁

chirurgicznym (5, 12, 13). Oprócz dużej średnicy guza w momencie rozpoznania (jak opisano wyżej), zarówno występowanie przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, jak i występowanie przerzutów do płuc rokuje niekorzystnie (ryc. 2), przy czym takiej zależności nie obserwuje się w przypadku mikroprzerzutów do węzłów chłonnych (średnica ogniska do 2 mm) – obecność mikroprzerzutów w węzłach chłonnych pozostawała bez wpływu na długość przeżycia (5, 13). Związek pomiędzy systemem TNM a efektami leczenia suk ze złośliwymi guzami gruczołu sutkowego zaprezentowano na przykładzie badania opublikowanego przez Trana i wsp. (tab. 3; 12).

Badanie histopatologiczne

W pierwszej kolejności badanie histopatologiczne guza lub jego fragmentu ma odpowiedzieć na pytanie, czy ma on charakter rozrostu nienowotworowego, nowotworu niezłośliwego, czy złośliwego. Istnieje wiele cech mikroskopowych, które pozwalają na odróżnianie poszczególnych zmian od siebie, a w szczególności odróżnianie zmian nienowotworowych od nowotworów niezłośliwych i nowotworów złośliwych, najważniejsze przedstawiono w tabeli 4. Kolejne informacje, które należy określić w badaniu histopatologicznym, a które charakteryzuje przydatność rokownicza, to: typ histologiczny nowotworu, stopień histologicznej złośliwości, zajęcie naczyń oraz doszczętność zabiegu chirurgicznego.

Typ histopatologiczny

Guzy gruczołu sutkowego psów charakteryzuje niejednorodna morfologia (różne pochodzenie histogenetyczne, występowanie tkanki chrzęstnej, kostnej), dlatego też nowotwory te zostały

Tabela 3. Parametry oceniające przeżycie psów z guzami gruczołu sutkowego w zależności od stadium zaawansowania klinicznego (TNM; P=0,003, n=94) – opracowano na podstawie 12

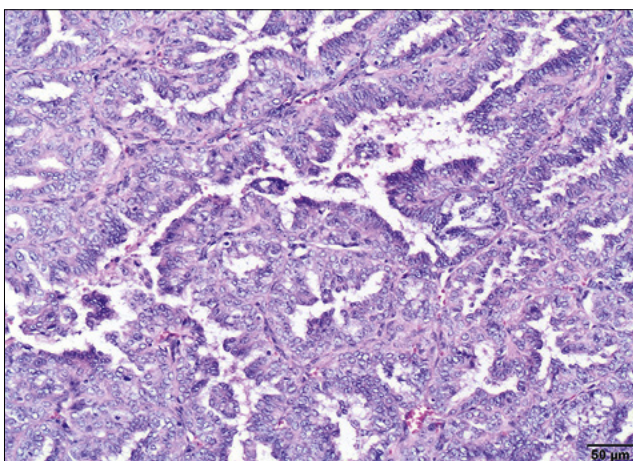
Stadium	Liczba psów	Mediana (dni)	Odsetek przeżyć 1 roku	Odsetek przeżyć 2 lat	Zakres
1	31	1226	61,3	61,3	4-3043
2	5	924	60,0	60,0	91-1011
3	13	287	30,8	10,3	9-872
4	37	165	28,0	14,4	11-1838
5	8	224	43,8	29,2	11-936

Tabela 4. Histologiczne cechy różnicowania niezłośliwych i złośliwych nowotworów gruczołu sutkowego u suk (6)

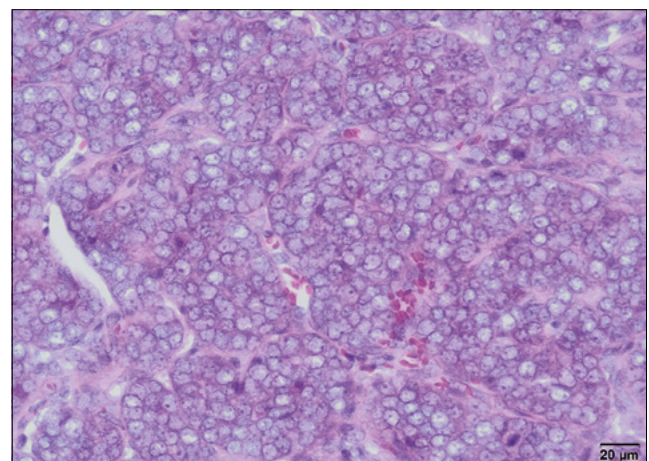
Niezłośliwe nowotwory gruczołu sutkowego	Złośliwe nowotwory gruczołu sutkowego
Dobrze odgraniczone o „równych/gładkich” brzegach	Słabo odgraniczone o „nieregularnych brzegach”, niekiedy granica niewyraźna
Często uformowana torebka łącznotkankowa otaczająca guz	Torebka łącznotkankowa, o ile jest utworzona, często z niedojrzałej luźnej tkanki łącznej
Brak naciekania tkanek otaczających	Naciekanie tkanek otaczających, torebki łącznotkankowej
Brak (niewidoczna) lub niska aktywność mitotyczna	Aktywność mitotyczna od niskiej do wysokiej, możliwa obecność atypowych figur mitotycznych
Możliwa martwica w centralnej części guza	Często martwica, możliwa wieloogniskowa
Jądra komórkowe monomorficzne, z cechami łagodnej lub umiarkowanej atypii	Jądra komórkowe pleomorficzne
Brak zajęcia naczyń krwionośnych i/lub limfatycznych	Możliwe zajęcie naczyń krwionośnych i/lub limfatycznych
Brak zajęcia regionalnych węzłów chłonnych	Możliwe zajęcie regionalnych węzłów chłonnych

sklasyfikowane na liczne podtypy histopatologiczne (ryc. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Co istotne, z punktu widzenia klinicznego, wykazano, że ta różnorodność morfologiczna wyraźnie koreluje z zachowaniem biologicznym guzów sutka, co przejawia się między innymi odmiennym rokowaniem dla poszczególnych typów histopatologicznych. Do najczęściej rozpoznawanych typów histopatologicznych złośliwych nowotworów gruczołu sutkowego należą: rak prosty, rak lity, rak w guzie mieszanym oraz rak złożony, inne typy rozpoznawane są zdecydowanie rzadziej (3, 11, 15). W 2011 r. (14) zaproponowano nową

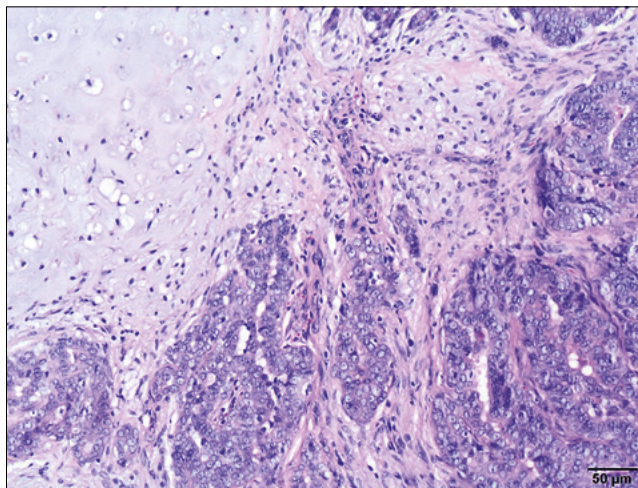
klasyfikację histologiczną guzów gruczołu sutkowego psów, obejmującą: nowotwory niezłośliwe oraz poszczególne typy histologiczne nowotworów złośliwych (nowotwory pochodzenia nabłonkowego – raki i typy szczególne, nowotwory pochodzenia mezenchymalnego – mięsaki, złośliwe guzy mieszane), zmiany rozrostowe/dysplastyczne, guzy brodawki sutka. Według ostatnich badań opartych na analizie wieloczynnikowej 229 guzów gruczołu sutkowego suk klasyfikacja ta została uznana jako niezależny wskaźnik prognostyczny, skorelowany z zachowaniem biologicznym tych nowotworów.



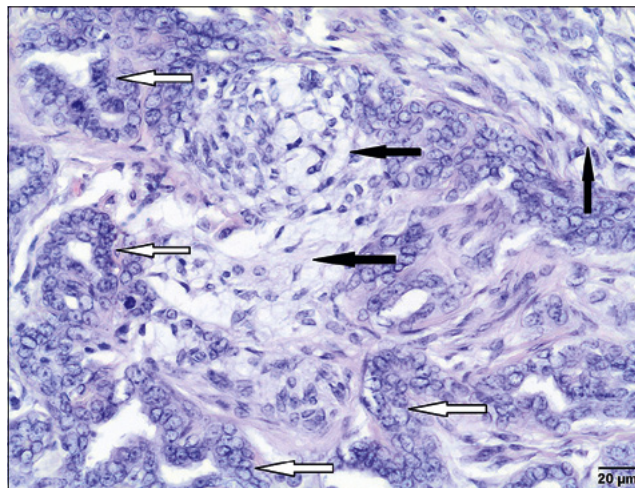
Ryc. 3. Rak prosty, cewkowo-brodawkowaty, umiarkowanego (II) stopnia złośliwości histologicznej (pies, samica, 7 lat, mieszańiec) – miąższ nowotworu jest utworzony z jednego typu komórek nabłonka gruczołowego i tworzy struktury cewkowo-brodawkowate. Barwienie hematoksylina-eoZYna, powiększenie 100×



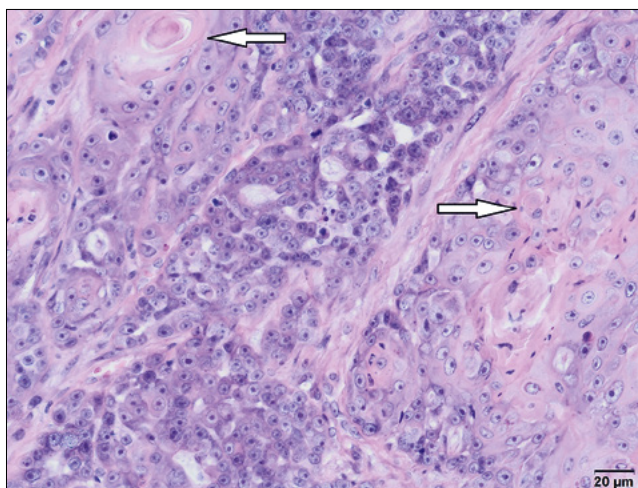
Ryc. 4. Rak lity o wysokim (III) stopniu złośliwości histologicznej (pies, samica, 12 lat, owczarek niemiecki) – miąższ nowotworu jest utworzony z jednego typu komórek nabłonka gruczołowego, które tworzą lite pola. Barwienie hematoksylina-eoZYna, powiększenie 400×



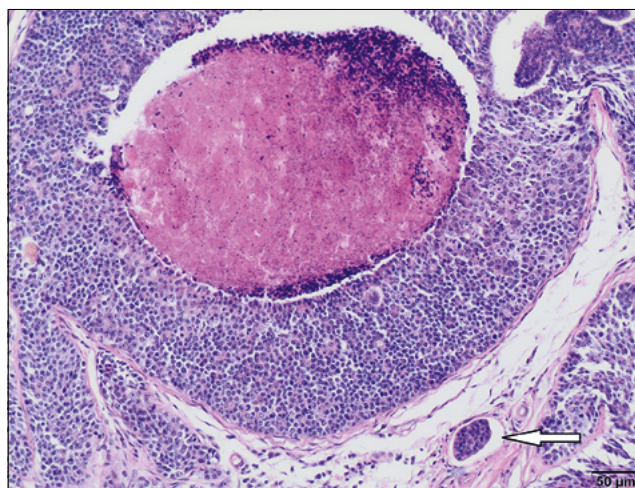
Ryc. 5. Rak powstający z niezłośliwego guza mieszanego o niskim (I) stopniu złośliwości histologicznej (pies, samica, 9 lat, jamnik) – mięsz nowotworu utworzony z obszarów chrząstki (po lewo i na górze) oraz komponenty nabłonkowej (na dole i po prawo). Barwienie hematoksylina-eoizyna, powiększenie 200×



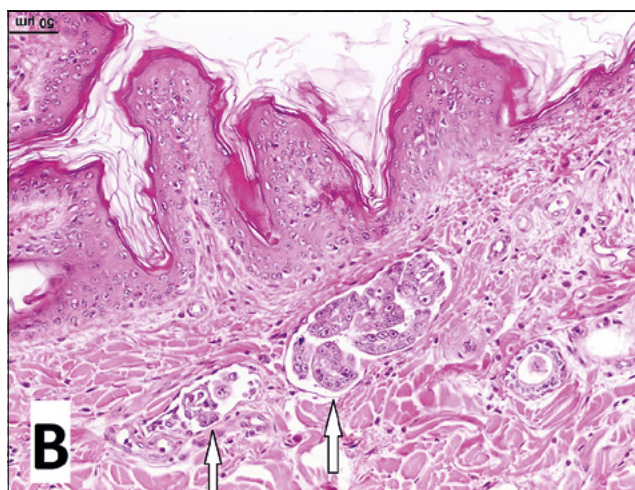
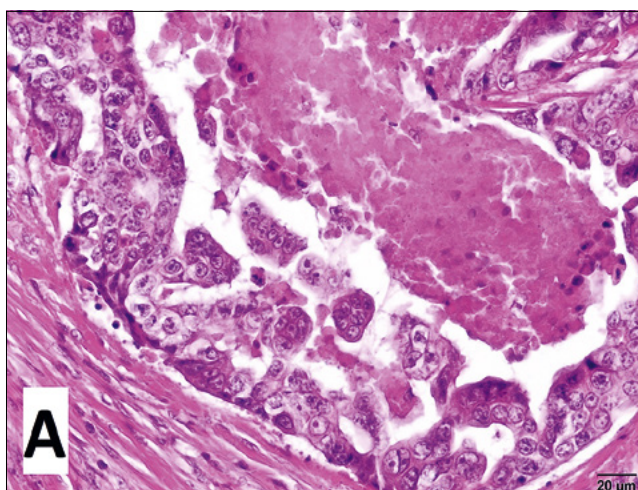
Ryc. 6. Rak złożony o umiarkowanym (II) stopniu złośliwości histologicznej (pies, samica, 9 lat, mieszaniec) – na mięsz nowotworu składa się komponenta nabłonkowa, która tworzy struktury cewkowe (białe strzałki) oraz komponenta mioepitelialna (czarne strzałki). Barwienie hematoksylina-eoizyna, powiększenie 200×



Ryc. 7. Rak gruczołowo-płaskonabłonkowy (adenosquamous carcinoma), o wysokim (III) stopniu złośliwości histologicznej (pies, samica, 6 lat, west highland white terier) – mięsz nowotworu otworzony z komórek nabłonkowych tworzących struktury cewkowe oraz obszary różnicowania w kierunku nabłonka płaskiego rogowaciejącego (strzałki). Barwienie hematoksylina-eoizyna, powiększenie 200×



Ryc. 8. Rak czopiasty (comedocarcinoma), o wysokim (III) stopniu złośliwości histologicznej (pies, samica, 8 lat, yorkshire terier) – mięsz nowotworu tworzy lite pola z widocznymi centralnymi obszarami martwicy (ciemno różowe masy), widoczne też skupisko komórek nowotworowych w naczyniu chłonnym (oznaczone strzałką). Barwienie hematoksylina-eoizyna, powiększenie 100×



Ryc. 9. Rak mikrobrodawkowy o wysokim (III) stopniu złośliwości histologicznej. Na ryc. A widoczne ognisko nowotworowe z centralnym obszarem martwicy oraz komórkami, które tworzą struktury brodawkowe bez podtrzymującego je łącznotkankowego zrębu – typowa cecha raka mikrobrodawkowego; barwienie hematoksylina-eoizyna, powiększenie 200×. Na rycinie B widoczna inna typowa cecha raka mikrobrodawkowego – zajęcie naczyń chłonnych (czopy komórek nowotworowych oznaczono strzałkami); barwienie hematoksylina-eoizyna, powiększenie 100×

Najkorzystniejsze rokowanie obserwowane jest rzecz jasna w przypadku rozrostów nienowotworowych nowotworów niezłośliwych, ale także u suk z rakiem powstającym w guzie niezłośliwym. W badaniach nowotworów złośliwych sutka psów obejmujących 10 różnych typów histologicznych stwierdzono, że u psów z rakiem prostym cewkowo-brodawkowatym, rakiem wewnątrzprzewodowym brodawkowatym oraz rakiem i złośliwą mioepiteliomą było 10-krotnie wyższe ryzyko śmierci związanej z guzem sutka niż z rakiem prostym kanalikowym czy rakiem złożonym. Z kolei gorsze rokowanie obserwuje się w przypadku raka gruczołowo-płaskonabłonkowego (adenosquamous carcinoma), raka czopiastego (comedocarcinoma) oraz raka litego (solid carcinoma). Najbardziej niekorzystnie rokują takie typy histologiczne, jak: rak anaplastyczny (anaplastic carcinoma), mięsak (włókniakomięsak, kostniakomięsak; fibrosarcoma, osteosarcoma) oraz mięsakorak (złośliwy guz mieszany, carcinosarcoma, malignant mixed tumor; 11). W innym badaniu (16) wykazano, że najkrótszy czas przeżycia cechuje psy z rakiem litym ($228,2 \pm 253,4$ dni), mięsakorakiem ($163,3 \pm 115,7$ dni) oraz grupą rzadko spotykanych guzów złośliwych ($227,1 \pm 235,2$ dni), w porównaniu z psami z rakiem w guzach mieszanych ($485,5 \pm 259,4$ dni) i rakiem prostym cewkowo-brodawkowatym ($401,7 \pm 196,8$ dni). Stosunkowo nowym typem histopatologicznym guzów sutka psów, opisywanym jak dotąd u kotów i u kobiet (7, 17), charakteryzującym się złym rokowaniem, jest rak mikrobrodawkowaty (inaczej drobno-brodawkowaty), inwazyjny (invasive micropapillary carcinoma – IMPC; 18).

Specyficzną formą kliniczną złośliwego nowotworu gruczołu sutkowego u suk, charakteryzującego się wybitnie agresywnym zachowaniem biologicznym, jest rak zapalny (inflammatory mammary carcinoma – IMC). Jego nazwę warunkuje specyficzny obraz kliniczny (owrzodzenie skóry, rumień, obrzęk, ciepłota skóry), związany z masywnym wysiewem komórek nowotworowych do naczyń limfatycznych skóry.

Tabela 5. Czasy przeżycia psów po resekcji chirurgicznej złośliwych guzów sutka w zależności od rozpoznanego typu histopatologicznego nowotworu (opracowano na podstawie: 2, 6, 11, 16, 18, 22, 23)

Typ histopatologiczny	Rokowanie
Rak prosty	21 mies. (OS)
Rak prosty cewkowo-brodawkowaty	21 mies. (OS)
Rak lity	16 mies. (OS) 8 mies. (MST)
Rak gruczołowo-płaskonabłonkowy	18 mies. (MST)
Rak czopiasty	14 mies. (MST)
Rzadko spotykane nowotwory złośliwe	6 mies. (MST)
Rak anaplastyczny	2,5 mies. (OS) 3 mies. (MST)
Mięsakorak	3–6 mies. (MST)
Mięsak	10 mies. (OS)
Kostniakomięsak	3 mies. (MST)
Rak mikrobrodawkowaty inwazyjny	2 mies. (MST)

Objaśnienia: OS – overall survival – całkowity czas przeżycia; MST – median survival time – mediana czasu przeżycia

Określenie rak zapalny jest pojęciem klinicznym/makroskopowym, z kolei histologicznie w takich przypadkach rozpoznaje się raka anaplastycznego, raka czopiastego czy raka bogatego w lipidy (14).

Liczne prace potwierdziły istotną zależność pomiędzy typem histopatologicznym a naciekaniem naczyń limfatycznych, występowaniem wznowy miejscowej po leczeniu chirurgicznym oraz przerzutów nowotworowych (19, 20). Przykładowo, największą częstość wznowy miejscowej (50%) wykazywał rak gruczołowo-płaskonabłonkowy; rak czopiasty oraz rak lity najczęściej dawały przerzuty (89% i 100%, odpowiednio) (11). W innej pracy wznowy lub przerzuty najczęściej były związane z występowaniem raka litego (40,0%), raka czopiastego (20%), raka prostego (13%), raka gruczołowo-płaskonabłonkowego (13%) oraz raka złożonego (6,7%; 19). W badaniach własnych przerzuty do węzłów chłonnych były notowane najczęściej w przypadku raka prostego cewkowo-brodawkowatego (15). Wysoką dynamiką dawania przerzutów do węzłów chłonnych cechuje się rak mikrobrodawkowaty inwazyjny (18). Naciekanie naczyń limfatycznych oraz jednocześnie występowanie przerzutów w regionalnych węzłach

chłonnych najczęściej było związane z rozpoznaniem raka anaplastycznego, raka mikrobrodawkowatego inwazyjnego, raka gruczołowo-płaskonabłonkowego, raka bogatego w lipidy, raka czopiastego, raka litego i raka prostego cewkowo-brodawkowatego. Z kolei zdecydowanie rzadziej lub w ogóle przerzuty nie były notowane w przypadku raka złożonego, raka przewodowego i raka powstającego w nowotworach niezłośliwych (20). Mięsaki gruczołu sutkowego, chociaż rzadko spotykane w tej lokalizacji (21), skutkują częstymi przerzutami do płuc (62,5%; 22). Podsumowanie znaczenia rokowniczego typu histologicznego złośliwych nowotworów gruczołu sutkowego u suk zaprezentowano w tabeli 5.

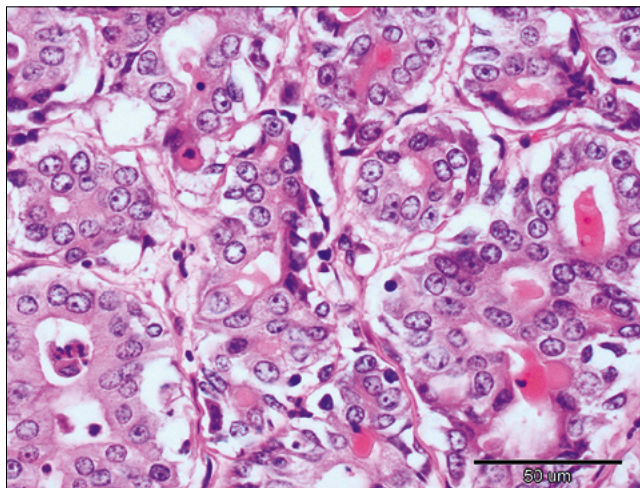
Ocena stopnia złośliwości histologicznej

Badanie histopatologiczne złośliwych nowotworów gruczołu sutkowego u suk umożliwia też określenie oceny stopnia złośliwości histologicznej (histologic grade) nowotworów pochodzenia nabłonkowego (raków i gruczolakoraków bez względu na ich podtyp histologiczny). W ostatnio opublikowanych badaniach Nguyen i wsp. (5) potwierdzili, że stopień histologicznej złośliwości

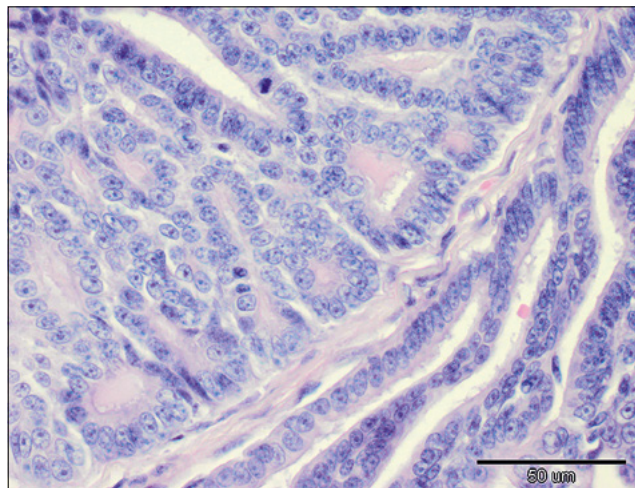
Tabela 6. System oceny stopnia złośliwości histologicznej nowotworów złośliwych suk (na podstawie 25)

Punkty	Formowanie cewek	Pleomorfizm jądrowy	Łączna liczba mitoz w 10 HPF
1 pkt	Cewki w > 75% obszarze wycinka	Nieznaczny: jądra komórkowe jednolitego kształtu i wielkości, jąderka widoczne okazjonalnie	0–9
2 pkt	Cewki w 10–75% obszarze wycinka (zmieszane z obszarami litymi)	Średni: umiarkowane zróżnicowanie wielkości i kształtu jądra; hiperchromazja jąder; obecne jąderka (niektóre wyraźne)	10–19
3 pkt	Brak cewek lub nieliczne (<10%)	Znaczny: różny kształt i wielkość jąder komórkowych; hiperchromazja jąder; liczne, wyraźne jąderka	20 i więcej
Stopień złośliwości histologicznej		Suma punktów	
I		3–5 pkt	
II		6–7 pkt	
III		8–9 pkt	

Objaśnienie: HPF – high power field, obraz w dużym powiększeniu (obiektyw 40×, okular 10×, FN 22)



Ryc. 10. Rak prosty cewkowy o niskim (I) stopniu złośliwości histologicznej – cewki nowotworowe są mniej liczne, jądra komórkowe umiarkowanie, a figury mitotyczne są nieliczne; barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 200×



Ryc. 11. Rak prosty cewkowy o umiarkowanym (II) stopniu złośliwości histologicznej – komórki nowotworowe tworzą liczne cewki, jądra komórkowe są jednolite (brak pleomorfizmu jądrowego), a figury mitotyczne są niewidoczne; barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 200×

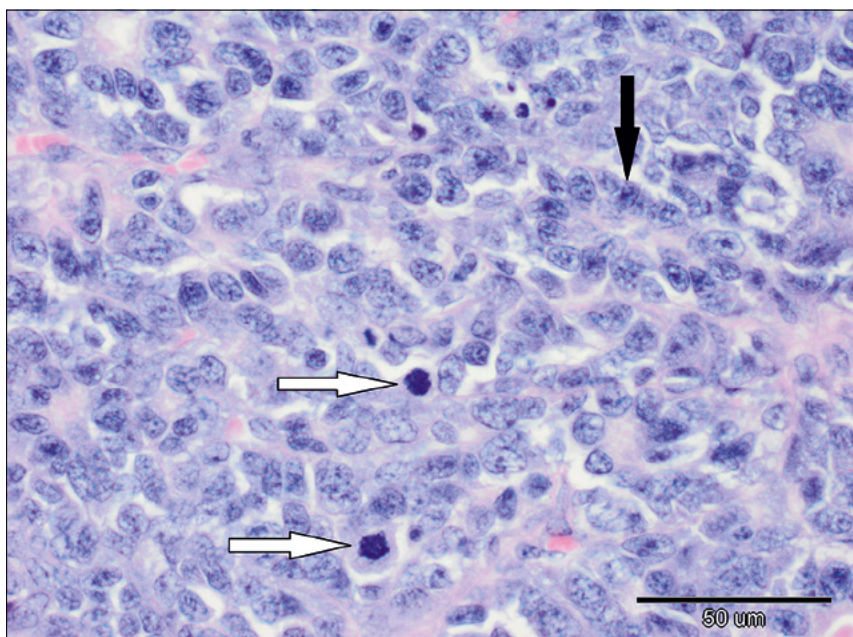
inwazyjnych raków sutka u suk jest niezależnym czynnikiem rokowniczym, który pozwala z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć losy pacjentki. Skala ta została wprowadzona dla oceny rokowania w przypadku raka piersi u kobiet w 1957 r., a następnie wielokrotnie modyfikowana i zaadaptowana do stosowania u psów (19, 24, 25). Polega ona na ocenie trzech cech mikroskopowych komórek nowotworowych: zdolności komórek nowotworowych do tworzenia cewek, pleomorfizmu jąder komórkowych oraz liczby mitoz ocenianej w 10 polach widzenia przy powiększeniu 400-krotnym. Każda z ww. cech jest oceniana w skali od 1 do 3 punktów – im wyższa jest suma punktów za każdą z cech, tym jest wyższy stopień histologicznej złośliwości

(**tab. 6**). W nowotworach złośliwych pochodzenia nabłonkowego wyodrębnia się trzy stopnie histologicznej złośliwości: I stopień (niski stopień złośliwości histologicznej; nowotwory/komórki dobrze zróżnicowane; **ryc. 10**), II (średni/umiarkowany stopień złośliwości histologicznej; umiarkowanie zróżnicowane; **ryc. 11**) oraz III (wysoki stopień złośliwości histologicznej; źle/słabo zróżnicowane; **ryc. 12**). Liczne badania prowadzone na nowotworach gruczołu sutkowego potwierdziły znaczenie prognostyczne tej klasyfikacji, która umożliwia wyodrębnienie pacjentów o różnym rokowaniu, wiąże się z ryzykiem naciekania struktur sąsiadujących (naczyn, podścieliska) oraz wystąpienia przerzutów (14, 15, 19, 20, 26). W badaniach własnych wykazano krótszy

czas przeżycia psów (16 miesięcy) z nowotworami złośliwymi o III stopniu złośliwości histologicznej, w porównaniu z sukami z guzami o I i II stopniu złośliwości histologicznej (22 miesiące; 26). Według innych danych występowanie raka o III stopniu złośliwości aż 21-krotnie zwiększa ryzyko śmierci suki w okresie 2 lat po mastektomii, w porównaniu z rakiem o I i II stopniu (26). Jednakże, nie stwierdzono istotnych różnic w odniesieniu do przeżycia psów z rakiem prostym II czy III stopnia – w obu przypadkach rokowanie było złe; ryzyko zgonu spowodowane rakiem prostym III stopnia było 10-krotnie większe w porównaniu z rakiem prostym o I stopniu złośliwości. Zgodnie z oczekiwaniami odnotowano wzrastającą tendencję do naciekania naczyń limfatycznych i przerzutów od stopnia I do III (20, 26). Podsumowanie rokownicze znaczenia oceny stopnia złośliwości histologicznej złośliwych nowotworów nabłonkowych raków gruczołu sutkowego u suk zaprezentowano w **tabeli 7**.

Ocena podtypu molekularnego

W ostatnich latach, podobnie jak w przypadku raka piersi u kobiet (30), podjęto badania z zakresu biologii molekularnej (mikromacierze cDNA, badania immunohistochemiczne – IHC oraz, w niektórych przypadkach, z wykorzystaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* – FISH) do identyfikacji podtypów molekularnych nowotworów gruczołu sutkowego psów (4). Podtyp molekularny określany jest na podstawie ekspresji genów receptora estrogenowego (ER), progesteronowego (PR), ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2), cytokeratyn, typowych dla komórek światła przewodów, pęcherzyków (luminalnych), np. CK7, CK8, CK18, CK19 oraz markerów



Ryc. 12. Rak prosty cewkowy o wysokim (III) stopniu złośliwości histologicznej – komórki nowotworowe tworzą pojedyncze struktury cewkowe (czarna strzałka), jądra komórkowe pleomorficzne, a figury mitotyczne są liczne (białe strzałki); barwienie hematoksylina-eozyna, powiększenie 200×

Tabela 7. Rokowanie dla psów w zależności od stopnia histologicznej złośliwości złośliwego nowotworu gruczołu sutkowego (opracowano na podstawie 7, 9, 11, 14, 15, 23, 26, 27, 28, 29)

Stopień histologicznej złośliwości	Odsetek zgonów	Okres wolny od choroby – DFS	Okres przeżycia – OS	Współczynnik przeżywalności po 1 roku	Współczynnik przeżywalności po 2 latach	Ryzyko wznowy	Ryzyko przerzutów
I (niski)	0% ^a 19% (I+II)	37,3 19,3 (I+II)	MST: 22 – długa, nieosiągalna mST>38 mST: 21,8–47,4 (I+II)	81% 77,8% (I+II)	69–100%	12%	19%
II (umiarkowany)	46,4% ^a ≥ II, 43,3% ^a	32,7	mST: 33 MST: 13 – długa, nieosiągalna	96%	53,6–78%	9%	30% ≥ II, 46,7% ^a
III (wysoki)	40,7–86,7% ^a	7,8–15,5	mST: 8–20,4 MST: 6	24,2–27%	0–13,5%	32%	87% 61,1% ^a

^a – po 2 latach; DFS – disease free survival, czas przeżycia bez objawów choroby (miesiące); OS – overall survival – całkowity czas przeżycia (miesiące); MST – mediana survival time – mediana czasu przeżycia (miesiące); mST – mean survival time – średni czas przeżycia (miesiące).

bazalnych dla komórek warstwy podstawnej w prawidłowej tkance gruczołu sutkowego, np. CK5, CK6, CK14, CK17, p63, aktywna mięśni gładkich, wimentyna, kalponina). Ponadto w niektórych sytuacjach może być oceniany indeks proliferacji – immunoekspresja Ki67. W zależności od otrzymanego wyniku badania wyróżniono podtypy: luminalny A (ER+ i/lub PR+, HER2-, markery luminalne +, bazalne + lub -), luminalny B (ER+ i/lub PR+, HER2+, markery luminalne +, bazalne + lub -), bazalny lub bazalno-podobny (basal-like) (ER- i/lub PR-, HER2-, markery luminalne -, bazalne +), nadekspresja HER2 (ER- i/lub PR-, HER2+, markery luminalne + lub -, bazalne + lub -) oraz charakterystyczny dla komórek prawidłowego gruczołu (normal-like; wszystkie markery negatywne). Badania immunohistochemiczne guzów sutka psów wykazały, że rak w niezłośliwym guzie mieszanym (carcinoma in benign-mixed tumor – CBMT) oraz rak złożony były w przeważającej mierze o tzw. fenotypie (podtypie) luminalnym A, natomiast rak lity, rak prosty i mięsiorak najczęściej o fenotypie bazalnym. Podobnie jak w raku piersi u kobiet, stwierdzono, że podtyp luminalny A był powiązany z niskim stopniem histologicznej złośliwości oraz lepszym rokowaniem, natomiast podtyp bazalny z III stopniem złośliwości i gorszym rokowaniem, co jednocześnie może sugerować, że klasyfikacja histologiczna guzów sutka suk była związana z podtypem molekularnym (31, 32, 33). Z kolei w innych badaniach wykazano, że o ile takie cechy jak stopień histologicznej złośliwości, naciekanie naczyń oraz podścieliska wpływały na gorsze rokowanie, to podtypy molekularne guzów sutka u suk nie miały związku z rokowaniem (4). Ze względu na rozbieżne dane wynikające m.in. z różnorodności badanej próby, jak dotąd wykorzystanie podtypów molekularnych nadal pozostaje w fazie eksperymentu naukowego i poznawczego. Stąd też badanie histopatologiczne pozostaje złotym standardem w diagnostyce guzów gruczołu sutkowego psów

– dostarcza cennych informacji o znaczeniu rokowniczym.

Ocena zajęcia naczyń

Zajęcie naczyń krwionośnych lub chłonnych przez proces nowotworowy (obecność czopów utworzonych z komórek nowotworowych w świetle naczyń krwionośnych) rokuje niekorzystnie, podobnie jak przypadki, w których komórki nowotworowe obserwowano na granicy lub w bliskości granicy cięcia (niedoszczętny zabieg chirurgiczny; 5). W jednym z ostatnio opublikowanych badań MST dla suk, u których nie stwierdzono zajęcia naczyń krwionośnych/chłonnych przez komórki nowotworowe, wyniosła 1098 dni, a odsetek suk, które przeżyły 2 lata od zabiegu, wyniósł 62,9%, z kolei parametry te dla suk, u których histologicznie obserwowano zajęcie naczyń, wyniosły odpowiednio 179 dni i 13,2% (12). Inwazja naczyń przez komórki nowotworowe obserwowana jest najczęściej w przypadkach nowotworów o najwyższym stopniu złośliwości histologicznej i była też negatywnym czynnikiem rokowniczym (krótsze okresy przeżycia) dla suk z rakami sutka w innym badaniu (10). W prospektywnym badaniu obejmującym dużą populację suk z nowotworami sutka stwierdzono, że inwazja układu limfatycznego (naczyń chłonnych lub/i węzłów chłonnych) była czynnikiem rokowniczo niekorzystnym i korelowała z takimi parametrami, jak: okres całkowitego przeżycia, przeżycie 1 roku i 2 lat po operacji, ryzyko przerzutów odległych i ryzyko wznowy miejscowej (7 miesięcy, 19%, 0%, 88% i 31%; u pacjentek bez zajęcia układu chłonnego parametry te wynosiły odpowiednio: powyżej 30 miesięcy, 84%, 69%, 25% i 13%; 11).

W przypadku uzyskania doszczętności zabiegu resekcji złośliwego guza sutka potwierdzonej badaniem mikroskopowym mediana okresu przeżycia wyniosła w jednym z badań 872 dni, a odsetek suk, które przeżyły 2 lata od zabiegu, wyniósł 51,3%. Z kolei u suk, u których zabieg chirurgiczny

nie był doszczętny, MST wyniosła 70 dni i żadna z tych pacjentek (18 suk) nie przeżyła 2 lat (okres 1 roku przeżyło 14,8% suk; 12). W badaniu tym stwierdzono także, że fakt doszczętności/niedoszczętności zabiegu był istotny jedynie u suk, które były w 1–3 stadium zaawansowania klinicznego, a nie był istotny u suk, u których choroba była bardziej zaawansowana (stadia 4 i 5; 12). W nowszym badaniu niedoszczętność zabiegu chirurgicznego wpływała niekorzystnie na ryzyko pojawienia się wznowy miejscowej (29% ryzyko przy niedoszczętniej resekcji i 15% ryzyko przy resekcji doszczętniej), jednak nie wpływała na takie parametry jak ryzyko powstania przerzutów, długość całkowitego okresu przeżycia czy 1- i 2-letnie okresy przeżycia (11).

Inne czynniki o znaczeniu rokowniczym

Pośród czynników o znaczeniu rokowniczym u suk ze złośliwymi nowotworami sutka należy wymienić **markery biochemiczne** (substancje chemiczne, które są patologicznymi lub prawidłowymi produktami metabolizmu komórek, których stężenie zwiększa się w przebiegu toczącego się procesu patologicznego, w tym nowotworowego – źródłem owych produktów są komórki nowotworowe lub komórki prawidłowe w odpowiedzi na proces nowotworowy). Do takich potencjalnych markerów należy antygen rakowy CA 15.3 (glikoproteina, która jest produktem genu *MUC1* i bierze udział w regulacji procesów proliferacji, apoptozy, adhezji i inwazji), którego stężenie w surowicy (mierzone za pomocą komercyjnego testu ELISA, używanego u ludzi) suk ze złośliwymi guzami sutka, w przebiegu których doszło do zajęcia regionalnych węzłów chłonnych, było istotnie wyższe niż u pacjentów bez przerzutów (34).

W licznych badaniach wykazano, że w ocenie rokowania u suk ze złośliwymi nowotworami sutka istotne znaczenie mają **markery immunohistochemiczne** (różnorodne białka, których ekspresję lub jej brak można wykazać, stosując barwienia

immunohistochemiczne z zastosowaniem specyficznych przeciwciał mono- i poliklonalnych). Niestety, ze względu na koszty i małą dostępność przeciwciał barwienia immunohistochemiczne nie są rutynowo wykonywane u pacjentów weterynaryjnych, chociaż w tym względzie odnotowuje się istotny postęp (szczególnie większa dostępność wybranych przeciwciał coraz częściej stanowi komercyjną ofertę laboratoriów weterynaryjnych). Dodatkowo dla wielu przeciwciał metoda immunohistochemiczna nie została wystandaryzowana do stosowania dla psów, a ponadto nie dopracowano jak dotąd indywidualnie dobranych metod leczenia (terapii celowanej – leczenie ukierunkowane molekularnie, tj. polegające na blokowaniu receptorów dla hormonów płciowych czy innych specyficznych antygenów) dla tego gatunku, jakie stosuje się rutynowo w onkologii medycznej (6). Przykładowo, wyniki immunokspresji receptorów dla estrogeny w komórkach nowotworowych (wykrywane w 16% raków inwazyjnych sutka) i progesteronu (wykrywane 11% raków inwazyjnych sutka) nie pozwalają jeszcze na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków w ich ocenie jako markerów prognostycznych, wydaje się jednak, że wyższa immunokspresja tych receptorów może być czynnikiem rokowniczo korzystnym (5, 6). U kobiet z rakiem piersi istotne znaczenie dla rokowania ma nasilenie immunokspresji HER-2 (HER-2 jest wykrywany w około 20% inwazyjnych raków sutka u suk), w jednym z badań wykazano, że u suk rokowanie jest bardziej korzystne (dłuższe okresy przeżycia) w przypadku raków HER-2 pozytywnych, w porównaniu z rakami HER-2 ujemnymi (6).

Stwierdzono też, że do niezależnych niekorzystnych czynników rokowniczych (krótszy okres przeżycia, wyższe ryzyko śmierci z powodu nowotworu, wyższe ryzyko wystąpienia wznowy i przerzutów odległych) u suk ze złośliwymi nowotworami sutka należy wysoka aktywność proliferacyjna mierzona za pomocą barwienia immunohistochemicznego z zastosowaniem przeciwciał MIB-1 (przeciwciała wykrywające antygen jąder komórkowych w cyklu podziałowym – Ki67). Przykładowo, u suk z immunokspresją Ki67 przekraczającą 40% komórek nowotworowych ryzyko pojawienia się wznowy miejscowej lub przerzutów odległych wyniosło 40%, a 42% pacjentek nie przeżyło okresu 2 lat od zabiegu mastektomii (6, 9). W innym badaniu krótsze okresy przeżycia notowano u suk, u których reakcję pozytywną obserwowano w powyżej 33,3% komórek inwazyjnych raków sutka (5). Do innych niezależnych czynników niekorzystnych rokowniczo należą: wysoka aktywność metaloproteiny-9 w fibroblastach otaczających miąższ

nowotworu (powyżej 50% fibroblastów wykazywało immunokspresję MMP-9), wysoka ekspresja COX-2, TIMP-2 oraz immunokspresja białka P53 (9, 35, 36). Z kolei krótsze okresy przeżycia odnotowano w przypadkach raków sutka, w których immunokspresja cząstek zaangażowanych we wzajemne przyleganie komórek nowotworowych do siebie była obniżona (kadheryna-E, kadheryna-P, katenina) (37).

W barwieniu immunohistochemicznym wykazano korelację pomiędzy immunokspresją COX-2 i VEGF, a także wysoką gęstością mikrounaczynienia (microvascular density – MVD – parametr, który określa intensywność tworzenia nowych naczyń krwionośnych) z takimi parametrami złośliwości histologicznej, jak: naciekowy wzrost, stopień atypii jąder komórkowych, obecność pól martwicy czy stopień nasilenia proliferacji (38). Jednak nie wykazano, aby immunokspresja VEGF mogła być używana jako marker związany z gorszym rokowaniem u suk ze złośliwymi nowotworami gruczołu sutkowego (9).

Badania ekspresji wybranych genów w komórkach nowotworowych pobranych od pacjentów z nowotworem oceniane za pomocą **techniki mikromacierzy** będą zapewne w przyszłości odgrywały istotną rolę w określaniu rokowania oraz doborze zindywidualizowanej terapii przeciwnowotworowej. Wykazano, że taka analiza pozwala wyselekcjonować przypadki, w których ryzyko rozwoju przerzutów jest wysokie. Analiza przeprowadzona przez zespół Klopfleischa (39) wykazała, że istnieją wyraźne różnice w ekspresji licznych genów pomiędzy nowotworami złośliwymi sutka, w przebiegu których dochodzi do powstania przerzutów, a przypadkami, w których przerzutów się nie obserwuje. W komórkach nowotworów przerzutowych obserwuje się nadekspresję genów, których produkty są zaangażowane w regulację cyklu komórkowego, naprawę DNA, kontrolę apoptozy, modelowanie macierzy pozakomórkowej. Badania przeprowadzone w ośrodku krajowym wykazały ponadto istotne różnice we wzorcach ekspresji mikroRNA (mikro-RNA to krótkie, jednoniciowe, niekodujące cząsteczki RNA regulujące ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym) pomiędzy sukami z rakami sutka, u których stwierdzono występowanie przerzutów, a pacjentkami, u których przerzutów nie wykrywano, co daje szansę na zastosowanie tej metody badawczej w przyszłości w określaniu rokowania u suk z rakami sutka (40). W badaniu tym wykazano też, że istnieją wyraźne różnice we wzorcach ekspresji mikroRNA sugerujące potencjał metastatyczny w nowotworach, które w badaniu mikroskopowym wykazują taki sam obraz histopatologiczny.

Metody leczenia

Mało jest dobrze udokumentowanych badań, które wskazywałyby na wpływ zastosowanego schematu leczenia na parametry rokownicze u suk ze złośliwymi nowotworami gruczołu sutkowego. W niektórych pracach wykazano, że wdrożenie chemioterapii jako metody dodatkowej do zabiegu chirurgicznego może wydłużać życie suk ze złośliwymi nowotworami sutka. W jednym z badań mediana okresu przeżycia 8 suk z rakiem sutka, leczonych kombinacją zabiegu chirurgicznego z chemioterapią (5-fluorouracyl z cyklofosfamidem) wyniosła 24 miesiące, a u suk bez chemioterapii mediana ta wyniosła 6 miesięcy (41). W innym badaniu suk i guzami sutka z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych leczone za pomocą zabiegu chirurgicznego i chemioterapii (karboplatyna +/- niesteroidowe leki przeciwzapalne) przeżyły średnio 13 miesięcy, zdecydowanie dłużej niż pacjentki, u których nie zastosowano chemioterapii (mediana okresu przeżycia 2 miesiące; 42).

Ostatnio opublikowano badanie retrospektywne, w którym oceniano przydatność chemioterapii adiuwantowej u suk ze słabo rokującymi złośliwymi nowotworami sutka (pacjentki z zajęciem naczyń krwionośnych i wysokim stadium zaawansowania klinicznego) usuniętymi chirurgicznie i nie wykazano, aby chemioterapia w ogóle, a także zastosowanie takich leków, jak: piroksydam, karboplatyna, dokсорubicyna i mitoksantron miały jakiegokolwiek wpływ na poprawę efektów zabiegu chirurgicznego (12). W grupie 61 suk z grupy o złym rokowaniu, 33 nie otrzymały chemioterapii adiuwantowej (12 suk otrzymało piroksydam, dla których MST wyniosła 194 dni, a 2 lata od zabiegu przeżyło 13,3% zwierząt. Z kolei dla 28 pacjentek, u których wdrożono leczenie dodatkowe (głównie dokсорubicyna i karboplatyna, rzadziej mitoksantron i karboplatyna) MST wyniosła 128–228 dni, a 2 lata od zabiegu przeżyło 15,4–37,5%, suk – różnice te nie były istotne statystycznie (12). Jednak autorzy tej pracy konkludują, że u niektórych pacjentek stosowanie mitoksantronu lub jego połączenia z karboplatyną może przynieść pewne korzyści terapeutyczne.

Jak dotąd podejmowano pojedyncze próby hormonoterapii nowotworów gruczołu sutkowego u suk. W jednym z badań w grupie suk (z guzem sutka o średnicy minimum 3 cm), pomimo chemioterapii (mitoksantron) uzupełnionej o tamoksyfen (lek o działaniu antyestrogenowym), nie uzyskano jednak istotnej regresji guza (43). Ze względu na brak udokumentowanych informacji o korzystnym wpływie na rokowanie pacjentów (zaobserwowano natomiast skutki uboczne, jak obrzęk sromu,

zmiany zachowania, zapalenie ropne kikutu macicy) obecnie nie stosuje się tej metody (44, 45).

Chociaż znana jest prewencyjna rola **wczesnej owariohisterektomii** w zmniejszeniu ryzyka rozwoju guza sutka u suk, to nie wykazano jednoznacznego wpływu zabiegu przeprowadzonego w czasie resekcji złośliwego guza sutka na rokowanie – nawrót choroby nowotworowej. W ostatnio opublikowanych badaniach wykazano, że pewne korzyści z takiej procedury chirurgicznej mogą się pojawić u suk z rakami o II stopniu histologicznej złośliwości, wykazującymi ekspresję receptorów dla estrogenów oraz z wysokim stężeniem 17 β -estradiolu we krwi (46).

Chirurgia pozostaje złotym standardem leczenia dla nowotworów gruczołu sutkowego suk, z wyjątkiem zmian nieoperacyjnych (większość raków zapalnych). W zależności od rodzaju operacji i lokalizacji guza również odpowiednie węzły chłonne wartownicze powinny być rutynowo usuwane, np. podczas mastektomii jedno- lub dwustronnej lub w mastektomii regionalnej z udziałem pachwinowego gruczołu sutkowego – pachwinowe węzły chłonne.

Takie postępowanie jest wskazane ze względu na anatomiczny związek między tymi strukturami, a co istotne, badanie histopatologiczne takiego węzła pozwoli na ocenę stopnia zaawansowania klinicznej choroby (6).

Piśmiennictwo

- Schneider R., Dorn C.R., Taylor D.O.: Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J. Natl. Cancer Inst.* 1969, **43**, 1249–1261.
- Philibert J.C., Snyder P.W., Glickman N., Glickman L.T., Knapp D.W., Waters D.J.: Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J. Vet. Intern. Med.* 2003, **17**, 102–106.
- Vascellari M., Capello K., Carminato A., Zanardello C., Baioni E., Mutinelli F.: Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. *Prev. Vet. Med.* 2016, **1**, 183–189.
- Sassi F., Benazzi C., Castellani G., Sarli G.: Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet. Res.* 2010, **28**, 6:5.
- Nguyen F., Pena L., Ibsch C., Loussouarn D., Gama A., Rieder N., Belusov A., Campono M., Abadie J.: Canine invasive mammary carcinomas as model of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Res. Treat.* 2017, doi:10.1007/s10549-017-4548-2.
- Goldschmidt M.H., Peña L., Zappulli V.: Tumors of the mammary gland. W: Meuten D.J., ed.: *Tumors in Domestic Animals*, wyd. 5, Wiley Blackwell, Ames, Iowa, 2017, 723–765.
- Peña L., De Andrés P.J., Clemente M., Cuesta P., Pérez-Alenza M.D.: 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**, 94–105.
- Lim Y.-H., Im K.-S., Kim N.-H., Kim H.-W., Shin J.-I., Yhee J.-Y., Sur J.-H.: Effects of obesity and obesity-related molecules on canine mammary gland tumors. *Vet. Pathol.* 2015, **52**, 1045–1051.
- Santos A.A., Lopes C.C., Ribeiro J.R., Martins L.R., Santos J.C., Amorim I.F., Gartner F., Matos A.J.: Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumors: a multivariable survival study. *BMC Vet. Res.* 2013, **9**, 1–11.
- Diessler M.E., Castellano M.C., Portiansky E.L., Burns S., Idiart J.R.: Canine mammary carcinomas: influence of histological grade, vascular invasion, proliferation, microvessel density and VEGFR2 expression on lymph node status and survival time. *Vet. Comp. Oncol.* 2016, **15**, 450–461.
- Rasotto R., Berlato D., Goldschmidt M.H., Zappulli V.: Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: an observational study of 229 cases. *Vet. Pathol.* 2017, **54**, 571–578.
- Tran C.M., Moore A.S., Frimberger A.E.: Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. *Vet. Comp. Oncol.* 2016, **14**, 252–262.
- Szczubial M., Lopuszynski W.: Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet. Comp. Oncol.* 2011, **4**, 296–303.
- Goldschmidt M., Peña L., Rasotto R., Zappulli V.: Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 2011, **48**, 117–131.
- Dolka I., Król M., Sapieryński R.: Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study. *Res. Vet. Sci.* 2016, **105**, 124–133.
- de Araújo M.R., Campos L.C., Ferreira E., Cassali G.D.: Quantitation of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2015, **29**, 1360–1367.
- Seixas F., Palmeira C., Pires M.A., Lopes C.: Mammary invasive micropapillary carcinoma in cats: clinicopathologic features and nuclear DNA content. *Vet. Pathol.* 2007, **44**, 842–848.
- Luna-Moré S., Gonzalez B., Acedo C., Rodrigo I., Luna C.: Invasive micropapillary carcinoma of the breast. A new special type of invasive mammary carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 1994, **190**, 668–674.
- Rasotto R., Zappulli V., Castagnaro M., Goldschmidt M.H.: A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Vet. Pathol.* 2012, **49**, 330–340.
- Gamba C.O., Dias E.J., Ribeiro L.G., Campos L.C., Estrela-Lima A., Ferreira E., Cassali G.D.: Histopathological and immunohistochemical assessment of invasive micropapillary mammary carcinoma in dogs: a retrospective study. *Vet. J.* 2013, **196**, 241–246.
- Dolka I., Sapieryński R., Król M.: Retrospective study and immunohistochemical analysis of canine mammary sarcomas. *BMC Vet. Res.* 2013, **9**, 9:248.
- Langenbach A., Anderson M.A., Dambach D.M., Sorenmo K.U., Shofer F.D.: Extraskeletal osteosarcomas in dogs: a retrospective study of 169 cases (1986–1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1998, **34**, 113–120.
- Pérez-Alenza M.D., Pena L., Nieto A.I., Castano M.: Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 1997, **33**, 581–585.
- Bloom H.J., Richardson W.W.: Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br. J. Cancer.* 1957, **11**, 359–377.
- Elston C.W., Ellis I.O.: 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**, 403–410.
- Karayannopoulou M., Kaldrymidou E., Constantinidis T.C., Dessiris A.: Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J. Comp. Pathol.* 2005, **133**, 246–252.
- Gama A., Alves A., Schmitt F.: Canine mammary gland tumours: clinical and pathological parameters as predictors of overall and disease-free survival – a univariate and multivariate analysis. W: Quaresma, Adelina Maria Gaspar Gama: Canine mammary tumours: new insights into prognosis and molecular classification. Departamento de Ciências Veterinárias Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro Vila Real, 2008.
- Betz D., Schoenrock D., Mischke R., Baumgärtner W., Nolte I.: Postoperative treatment outcome in canine mammary tumors. Multivariate analysis of the prognostic value of pre- and postoperatively available information. *Tierarztl. Prax. Ausg. K. Kleintiere. Heimtiere.* 2012, **40**, 235–242.
- Dolka I., Czopowicz M., Gruk-Jurka A., Wojtkowska A., Sapieryński R., Jurka P.: Diagnostic efficacy of smear cytology and Robinson's cytological grading of canine mammary tumors with respect to histopathology, cytomorphometry, metastases and overall survival. *PLoS One.* 2018, **13**: e0191595.
- Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L., Brown P.O., Botstein D.: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000, **406**, 747–752.
- 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**, 123–132.
- Ribeiro G.M., Bertagnolli A.C., Rocha R.M., Cassali G.D.: Morphological aspects and immunophenotypic profiles of mammary carcinomas in benign-mixed tumors of female dogs. *Vet. Med. Int.* 2012, **2012**: 432763.
- Im K.S., Kim N.H., Lim H.Y., Kim H.W., Shin J.I., Sur J.H.: Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Vet. Pathol.* 2014, **51**, 549–559.
- Campos L.C., Lavalle G.E., Estrela-Lima A., Melgaco de Faria J.C., Guimaraes J.E., Dutra A.P., Ferreira E., de Sousa L.P., Rabelo E.M.L., Viera da Costa A.F.D., Cassali G.D.: CA15.3, CEA, and LCD in dogs with malignant mammary tumors. *J. Vet. Intern. Med.* 2012, **26**, 1383–1388.
- Lee C.H., Kim W.H., Lim J.H., Kang M.S., Kim D.Y., Kweon O.K.: Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J. Vet. Sci.* 2004, **5**, 63–69.
- Queiroga F.L., Pérez-Alenza M.D., Silvan G., Peña L., Lopes C., Illera J.C.: Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Res.* 2005, **5**, 4269–4275.
- Gama A., Paredes J., Gärtner F., Alves A., Schmitt F.: Expression of E-cadherin, P-cadherin and beta-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Vet J.* 2008, **177**, 45–53.
- Queiroga F.L., Pires I., Parente M., Gregorio H., Lopes C.S.: COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumor angiogenesis in canine mammary cancer. *Vet. J.* 2011, **189**, 77–82.
- Klopffleisch R., Lenze D., Hummel M., Gruber A.D.: Metastatic mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC Cancer.* 2010, **10**, 6–18.
- Bulkowska M., Rybicka A., Mert Senes K., Ulewicz K., Witt K., Szymańska J., Taciak B., Klopffleisch R., Hellmen E., Dolka I., Gure A.O., Mucha J., Mikow M., Giziński S., Król M.: MicroRNA expression patterns in canine mammary cancer show significant differences between metastatic and non-metastatic tumors. *BMC Cancer.* 2017, **17**, 7–28.
- Karayannopoulou M., Kaldrymidou E., Constantinidis T.C., Dessiris A.: Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J. Vet. Med. A.* 2001, **48**, 85–96.
- Lavalle G.E., De Campos C.B., Bertagnolli A.C., Cassali G.D.: Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. *In Vivo* 2012, **26**, 375–379.
- Ankur S., Dhakate M.S., Upadhye S.V.: Chemotherapeutic management of canine mammary tumours. *Vetscan*, 2010, 5, http://www.vetscan.co.in/v5n1/chemotherapeutic_management_of_canine_mammary_tumors.htm.
- Morris J.S., Dobson J.M., Bostock D.E.: Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Vet. Rec.* 1993, **133**, 539–542.
- Tavares W.L., Lavalle G.E., Figueiredo M.S., Souza A.G., Bertagnolli A.C., Viana F.A., Paes P.R., Carneiro R.A., Cavalcanti G.A., Melo M.M., Cassali G.D.: Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. *Acta Vet. Scand.* 2010, **52**, 67.
- Kristiansen V.M., Pena L., Diez Cordova L., Illera J.C., Skjerve E., Breen A.M., Cofone M.A., Langeland M., Teige J., Goldschmidt M., Sorenmo K.U.: Effect of ovariectomy at the time of the tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial. *J. Vet. Intern. Med.* 2016, **30**, 230–241.

Dr Izabella Dolka; e-mail: izabella_dolka@sggw.pl