

Role of inflammatory cells in mammary gland neoplasms in bitches

Badowska-Kozakiewicz A.M.¹, Malicka E.², Rodo A.², Zieliński J.¹, Department of Biophysics and Human Physiology, Warsaw Medical University¹, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine², Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The purpose of this study was the estimation of cellular infiltrate in canine mammary gland tumors in the context of histological type, degree of histological malignancy and proliferative activity of neoplasms. Studies were performed on specimens collected during surgery. Histopathological, histochemical and immunohistochemical methods were used. There were 161 tumors collected and 150 neoplasms were identified. 138 neoplasms were of epithelial origin. In total, 14 adenomas, 66 complex carcinomas, 47 simple carcinomas and 6 solid carcinomas were characterized. The intensity of infiltration was different in various types of mammary gland tumors but no significant correlation has been established.

Keywords: mammary gland tumor, cellular infiltrate, bitches.

Rola komórek nacieku zapalnego w nowotworach gruczołu sutkowego suk

Anna M. Badowska-Kozakiewicz¹, Elżbieta Malicka², Anna Rodo², Jakub Zieliński¹

z Zakładu Biofizyki i Fizjologii Człowieka Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego¹ oraz Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie²

Rola komórek układu immunologicznego w chorobie nowotworowej nie jest do końca wyjaśniona. Brak jest bezpośrednich dowodów na to, że komórki te mają wpływ na rozwój nowotworu. Informacji na ten temat dostarczają jednak obserwacje kliniczne i badania doświadczalne, które potwierdzają ich aktywność w odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym. W obronie przeciwnowotworowej bierze udział zarówno odpowiedź humoralna, jak i komórkowa (1). Do najważniejszych mechanizmów efektorowych odpowiedzi przeciwnowotworowej należą: cytotoksyczność limfocytów Tc, aktywność cytokin wydzielanych przez limfocyty T, aktywność komórek NK, a także cytotoksyczność pobudzonych makrofagów oraz granulocytów

obojętnochłonnych. Dotychczasowe badania wskazują na ważną rolę w odpowiedzi komórkowej i humoralnej, głównie limfocytów CD4⁺ i CD8⁺, a także cytokin, które są wydzielane przez limfocyty obecne w rozroście nowotworowym (2).

Rola limfocytów T cytotoksycznych (cytotoxic lymphocytes – CTL) polega na odróżnianiu i niszczeniu komórek nowotworowych. Do limfocytów cytotoksycznych należą w większości limfocyty CD8⁺, które rozpoznają antygeny nowotworowe obecne na cząsteczce MHC klasy I poprzez receptor TCR (T cell receptor). Aktywacja tych limfocytów odbywa się przez pobudzone limfocyty T pomocnicze – Th CD4⁺ (3). Pobudzone limfocyty Th mają zdolność do wydzielania cytokin. Cytokiny te pełnią istotną rolę w odporności

przeciwnowotworowej. Do grupy tych cytokin zaliczane są: interleukiny, interferon, czynniki martwicy nowotworu oraz czynniki wzrostu. Z dotychczasowych badań wynika, że u chorych z nowotworami dochodzi do upośledzenia mechanizmów obrony immunologicznej. Brak lub nieadekwatna odpowiedź immunologiczna na pojawienie się w organizmie komórek nowotworowych spowodowana jest tzw. ucieczką spod nadzoru immunologicznego.

Wpływ odpowiedzi immunologicznej na progresję nowotworu od lat budzi wielkie zainteresowanie, zwłaszcza w kontekście podejmowanych prób leczenia nowotworów metodami immunologicznymi. Przemawiają za tym badania przeprowadzone na nowotworach indukowanych czynnikami chemicznymi lub wirusami. Nowotwory te wywołują odpowiedź immunologiczną, która doprowadza do eliminacji guza (4). Nie zawsze wyniki te można odnieść do nowotworów powstających spontanicznie. Przyjęło się uważać, że wyrazem odpowiedzi immunologicznej przeciwko antygenom guza nowotworowego jest obecność w nim nacieku komórek jednojądrzastych – limfocytów. Nacieki takie są charakterystyczne dla niektórych nowotworów ludzi takich, jak czerniak, nasieniak i rak rdzeniasty sutka. W badaniach dotyczących raka sutka wykazano, że obecność intensywnego nacieku limfocytarnego była dobrym czynnikiem prognostycznym (5), a więc obecność tych komórek uważa się za wyraz podjętej przez organizm próby ograniczenia wzrostu guza (6). Bhan (5) analizował skład komórkowy nacieków w raku sutka u kobiet i stwierdził, że dominują wśród nich limfocyty T zarówno pomocnicze, jak i supresorowe. Wykazał on przewagę limfocytów CD4⁺ nad CD8⁺, natomiast Giorno (7) stwierdził odwrotne proporcje. Dużo mniejszy odsetek stanowiły inne komórki: limfocyty B, makrofagi, komórki NK oraz komórki Langerhansa CD6⁺ (5, 7). Różne wyniki przyniosły badania wyjaśniające znaczenie intensywności i składu komórkowego nacieku dla przebiegu choroby nowotworowej. Został wykazany wyraźny związek między obecnością nacieków w zapalnych a dobrym rokowaniem (8), złym rokowaniem (9), ale nie stwierdzono zależności pomiędzy tymi dwoma czynnikami (10).

Również niejednoznaczne wyniki uzyskano, badając przydatność prognostyczną samego nacieku limfocytarnego. Niektóre prace potwierdzają związek pomiędzy naciekiem limfocytarnym a dobrym rokowaniem (11), w innych takiego związku nie zaobserwowano (10, 12) lub rokowanie w przypadku intensywnego nacieku było złe (wysokie ryzyko nawrotu; 10).

Przy uwzględnieniu czasu przeżycia pacjentów analiza obecności limfocytów

okazała się przydatna w guzach szybko się dzielących. Elton (13) potwierdził prognostyczną wartość nacieków limfocytarnych w nowotworach o najwyższym stopniu histologicznej złośliwości. W guzach szybko dzielących się, bez zajęcia węzłów chłonnych, limfocyty okazały się bardzo ważnym czynnikiem prognostycznym, w guzach wolniej namnażających się bardziej przydatne były wymiary jąder komórkowych (14). Na podstawie tych danych można stwierdzić, że nacieki limfocytarne jest przydatny jako czynnik prognostyczny tylko w guzach dzielących się bardzo szybko. Może to być wynikiem tego, iż komórki w takich guzach na swojej powierzchni mają więcej antygenów nowotworowych niż guzy namnażające się wolno. Mogą one także produkować immunogenne białka do macierzy międzykomórkowej, co wywołuje odpowiedź immunologiczną, a także mogą tworzyć bardziej homogenne grupy komórek i wówczas odpowiedź może być bardziej skuteczna (14). W badaniach dużo uwagi poświęca się też makrofagom, będącym komórkami efektorowymi w odporności przeciwnowotworowej. Wyniki w tej kwestii również nie są jednoznaczne. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stopniem złośliwości raka piersi, klinicznym stopniem zaawansowania choroby i rokowaniem a liczbą makrofagów w nacieku komórkowym (15), chociaż An i wsp. (16) wykazali, że u pacjentek z nowotworem z dużą liczbą makrofagów istnieje mniejsze ryzyko powstania przerzutów. Bardzo istotną informacją jest fakt, iż nie wszystkie zjawiska odpornościowe hamują wzrost nowotworu. Komórki nacieku zapalnego mogą także wpływać na angiogenezę poprzez uwalnianie czynników, które stymulują ten proces. Mogą też uwalniać enzymy, które trawią substancję międzykomórkową i ułatwiają w ten sposób tworzenie nowych naczyń i przerzutowanie (17). Makrofagi wydzielają substancje wzrostowe dla komórek nowotworowych (np. EGF i PDGF), mogą również osłabić odpowiedź immunologiczną przy udziale prostaglandyn i TGF- β (1). Brak jest wystarczającej liczby opracowań charakteryzujących nacieki komórkowe w nowotworach gruczołu sutkowego suk. Z dotychczasowych badań wynika, że obecność nacieków komórkowych i ich intensywność wydaje się pozytywnym czynnikiem rokowniczym, lecz zależy to w dużej mierze od rodzaju nowotworu (18, 26). Dlatego też bardzo interesujące wydawało się podjęcie takiego tematu.

Cel pracy

Celem pracy było określenie lokalizacji i intensywności nacieków komórkowych w nowotworach nabłonkowych gruczołu

sutkowego oraz przydatności jako czynnika rokowniczego, w powiązaniu z wiekiem zwierzęcia, rodzajem nowotworu, stopniem jego histologicznej złośliwości oraz z aktywnością proliferacyjną.

Ze względu na dużą różnorodność morfologiczną nowotworów gruczołu sutkowego suk badania przeprowadzono na określonych grupach nowotworów pochodzenia nabłonkowego (gruczolaki, gruczolakoraki proste, gruczolakoraki złożone i raki lite).

Materiał badawczy

Materiał do badań stanowiły guzy gruczołu sutkowego suk. Materiał utrwalano w 8% formalinie buforowanej fosforanami, następnie odwadniano i zatapiano w parafinie. Skrawki parafinowe grubości 4 μ m barwiono metodą przegładową hematoksylina-eozyjna, a także metodami immunohistochemicznymi. W preparatach barwionych metodą hematoksylina-eozyjna określono:

- rodzaj nowotworu według klasyfikacji WHO (19),
- stopień histologicznej złośliwości, uwzględniając formowanie cewek, intensywność dzielenia się i stopień zróżnicowania komórek nowotworowych (20),
- indeks mitotyczny, który obliczano jako średnią liczbę mitoz w 10 polach widzenia przy powiększeniu obiektywu 40 \times (pole powierzchni 0,17 mm²),
- obecność i intensywność nacieków komórkowych w nowotworach według skali:
 - brak nacieku,
 - +/- nacieki minimalny,
 - + nacieki niewielki,
 - ++ nacieki o średniej intensywności,
 - +++ nacieki intensywne (21).

W reakcjach immunohistochemicznych użyto monoklonalnego przeciwciała w odpowiednim rozcieńczeniu w 1% BSA (Sigma): mysie monoklonalne przeciw ludzkiemu antygenowi jądrowemu Ki-67 (Dako) w rozcieńczeniu 1:75 (22). Materiał badawczy poddawano obróbce termicznej w kuchence mikrofalowej (1 \times 5 min przy 600 W, 2 \times 5 min przy 300 W) w celu odsłonięcia ich epitopu. Do wizualizacji reakcji immunohistochemicznej stosowano zestaw En Visio +TM System (Dako). Do interpretacji wyników zastosowana została komputerowa analiza obrazu i program Lucia v. 4.21, za pomocą których zliczano zabarwione jądra komórek nowotworowych w 1000 komórek nowotworowych. Wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych (\pm SD). Wyniki opracowano przy użyciu programu SPSS v. 12.0 PL Windows. Różnice uznano za istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$.

Tabela 1. Udział nowotworów pochodzenia nabłonkowego z określoną intensywnością nacieków komórkowych w poszczególnych grupach wiekowych suk

Przedział wiekowy suk (lata)	Intensywność nacieków komórkowych wyrażona w pięciostopniowej skali					Ogółem
	-	-/+	+	++	+++	
<8 (n=23)	4 (17,4%)	0 (0,0%)	9 (39,1%)	6 (26,1%)	4 (17,4%)	23 (100%)
8-12 (n=90)	9 (10,0%)	1 (1,1%)	45 (50,0%)	24 (26,7%)	11 (12,2%)	90 (100%)
>12 (n=20)	3 (15,0%)	1 (5,0%)	6 (30,0%)	8 (40,0%)	2 (10,0%)	20 (100%)
Ogółem	16 (12,0%)	2 (1,5%)	60 (45,1%)	38 (28,6%)	17 (12,8%)	133 (100%)

n - liczebność grupy

Tabela 2. Intensywność nacieków komórkowych w poszczególnych rodzajach nowotworów

Rodzaj nowotworu pochodzenia nabłonkowego	Intensywność nacieków komórkowych wyrażona w pięciostopniowej skali					Ogółem
	-	-/+	+	++	+++	
Gruczolak (n=14)	3 (21,4%)	0 (0,0%)	10 (71,4%)	0 (0,0%)	1 (7,1%)	14 (100%)
Rak lity (n=6)	3 (50,0%)	0 (0,0%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	6 (100%)
Rak prosty (n=47)	5 (10,6%)	2 (4,3%)	23 (48,9%)	12 (25,5%)	5 (10,6%)	47 (100%)
Rak złożony (n=66)	5 (7,6%)	0 (0,0%)	25 (37,9%)	25 (37,9%)	11 (16,7%)	66 (100%)
Ogółem n=133	16 (12,0%)	2 (1,5%)	60 (45,1%)	38 (28,6%)	17 (12,8%)	133 (100%)

n - liczebność grupy

Wyniki

W większości przypadków nacieki zapalne umiejscowione były w podścielisku głównie na obwodzie guzów, tylko w nielicznych przypadkach nacieki występowały okołonaczyniowo lub w pęcherzykach gruczołu. W skład nacieków zapalnych wchodziły limfocyty, granulocyty obojętnochłonne i makrofagi. Intensywność nacieków komórkowych oceniano w oparciu o pięciostopniową skalę: -, -/+, +, ++, +++.

Analiza statystyczna wyników wskazuje na brak zależności między wiekiem zwierzęcia a stopniem intensywności nacieków komórkowych w nowotworach. Na uwagę zasługuje fakt, iż najwięcej nowotworów wykazywało intensywność nacieków na poziomie + u suk w przedziale wiekowym od 8 do 12 lat, co stanowiło 50% nowotworów w tej grupie wiekowej (tab. 1).

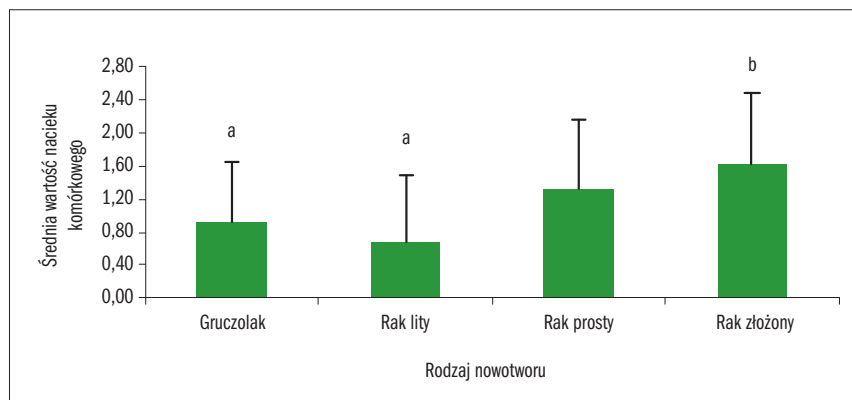
Stwierdzono istotną zależność między stopniem intensywności nacieków komórkowych a rodzajem nowotworu. W 50% raków litych nie stwierdzono występowania

nacieków komórkowych, tylko 33% tych nowotworów wykazywało obecność nacieków komórkowych na poziomie +, zaś 16,7% na poziomie ++. Wśród raków złożonych najliczniejszą grupę stanowiły raki złożone, w których stwierdzono obecność nacieków komórkowych na poziomie + i ++. Najliczniejszą grupą wśród poszczególnych rodzajów nowotworów wykazującą +++ poziom intensywności nacieków komórkowych była grupa raków złożonych (16,7%). Z całej puli (133 nowotworów) największy udział procentowy (45,1%) wykazywały nowotwory, w których stwierdzono obecność nacieków komórkowych na poziomie + (tab. 2).

Wykazano różnice w średniej intensywności nacieków komórkowych w poszczególnych rodzajach nowotworów. Największa średnia intensywność nacieków komórkowych była w rakach złożonych, następnie w rakach prostych, gruczolakach i rakach litych, a szczególnie różnice widoczne są pomiędzy gruczolakami a rakami złożonymi ($p=0,007$) oraz między rakami litymi a rakami złożonymi – $p=0,05$ (ryc. 1).

W badaniach zależności intensywności nacieków komórkowych od stopnia histologicznej złośliwości nie wykazano istotnych różnic, lecz można zauważyć, iż wśród nowotworów o I, II i III stopniu histologicznej złośliwości najliczniejszą grupę stanowiły raki, w których intensywność nacieków komórkowych określona została na poziomie + (tab. 3).

Analizując średnie wartości intensywności nacieków komórkowych w poszczególnych stopniach histologicznej złośliwości raków stwierdzono, że grupy badane nie różniły się od siebie, z wyjątkiem nowotworów o III stopniu histologicznej złośliwości, gdzie obserwowana była istotna różnica ($p=0,023$; ryc. 2). Nowotwory o III stopniu histologicznej złośliwości wykazywały najwyższą średnią wartość intensywności nacieków komórkowych wśród badanych raków (tab. 4).

**Ryc. 1.** Średnia intensywność nacieków komórkowych (\pm SD) w poszczególnych rodzajach nowotworów. Różne litery nad słupkami odnoszą się do tego samego parametru i świadczą o różnicy istotnej statystycznie ($p \leq 0,05$) między średnimi

Omówienie wyników

W badaniach własnych nowotwory pochodzenia nabłonkowego stanowiły 92%, z czego 89,8% stanowiły raki. Najwięcej zdiagnozowanych zostało raków złożonych – 66 i raków prostych – 47, najmniej liczną grupę stanowiły raki lity – 6. Materiał badawczy pochodził od suk należących do 18 ras, w wieku od 3 do 16 lat.

W medycynie weterynaryjnej nieustannie poszukuje się czynników rokowniczych i predykcyjnych, które umożliwiają prawidłową ocenę przebiegu choroby, czasu przeżycia, podatności na leczenie oraz ryzyka nawrotu choroby. Uznawanymi czynnikami są: wiek zwierzęcia, stan

wartowniczego węzła chłonного, typ histologiczny nowotworu, stopień histologicznej złośliwości oraz ploidea DNA. Poza podstawową metodą, jaką jest badanie histopatologiczne w rozpoznawaniu nowotworu, dodatkowych informacji przydatnych w tym zakresie dostarczają badania dotyczące biologii nowotworów, w tym między innymi badania markerów nowotworowych. W ocenie histologicznej nowotworu brane są również pod uwagę markery aktywności proliferacyjnej, takie jak: indeks mitotyczny, indeks znakowanej tymidyny, odsetek komórek w fazie S cyklu komórkowego oraz ekspresja antygenu jądrowego Ki-67 i antygenu jądrowego komórek dzielących się PCNA. Badane są także: ekspresja receptorów estrogenowych, receptory dla czynników wzrostowych: naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGFR), hormonu wzrostu (GH) oraz markery wysokiego ryzyka przerzutowania: aktywator plazminogenu i katepsyna D; onkogeny i geny supresorowe: *c-erbB-2*, *c-myc*, *p53*, *BRCA-1*, *BRCA-2*, markery angiogenezy guza oraz białka szoku cieplnego (23, 24, 25).

Z dotychczasowych badań wynika, że czynnikiem rokowniczym może być też obecność lub brak komórkowych nacieków zapalnych (26). Badania raka płaskonabłonkowego u kotów sugerowały, że komórki stwierdzone w naciekach, a więc limfocyty T CD3⁺, jak i limfocyty B CD79⁺, miały udział w hamowaniu wzrostu guzów dobrze zróżnicowanych i średnio inwazyjnych. Podobnie największy udział limfocytów T w nacieku stwierdzono w raku płaskonabłonkowym u kotów czy w guzie wenerycznym u psów (27).

Dane dotyczące częstości występowania nacieków komórkowych w nowotworach gruczołu sutkowego suk są bardzo skąpe. Gilbertson (18) stwierdził nacieki komórkowe w 35% badanych zmianach przedrakowych i raków inwazyjnych. W badaniach własnych procent nowotworów, w których występowały nacieki był wyższy – 88%, większą intensywność nacieku wykazywały nowotwory o wyższym stopniu histologicznej złośliwości. Podobne rezultaty przedstawiła Skrzypczak w nowotworach gruczołu sutkowego suk (26), a także Kelly (15) w nowotworach sutka u kobiet. Autorzy uważają, że obecność nacieków ma pozytywne znaczenie w hamowaniu wzrostu nowotworu. Część badań dowiodła, że obecność nacieków wiąże się z dobrym (8) lub złym rokowaniem (9), a inne, że nie ma żadnej wartości rokowniczej (10). W badaniach własnych nie wykazano związku nacieków komórkowych z innymi markerami nowotworowymi, jak ekspresja antygenu jądrowego Ki-67, podobnie jak

Tabela 3. Intensywność nacieku komórkowego w rakach o różnym stopniu histologicznej złośliwości

Stopień histologicznej złośliwości nowotworu	Intensywność nacieków komórkowych wyrażona w pięciostopniowej skali					Ogółem
	-	-/+	+	++	+++	
I° (n = 48)	6 (12,5%)	0 (0,0%)	20 (41,7%)	17 (35,4%)	5 (10,4%)	48 (100%)
II° (n = 39)	2 (5,1%)	2 (5,1%)	19 (48,7%)	12 (30,8%)	4 (10,3%)	39 (100%)
III° (n = 66)	5 (15,6%)	0 (0,0%)	11 (34,4%)	9 (28,1%)	7 (21,9%)	32 (100%)
Ogółem	16 (12,0%)	2 (1,5%)	60 (45,1%)	38 (28,6%)	17 (12,8%)	133 (100%)

n – liczebność grupy

Tabela 4. Średnia intensywność nacieków komórkowych w rakach o różnym stopniu histologicznej złośliwości

Stopień histologicznej złośliwości nowotworu	Liczebność grupy	Średnia wartość intensywności nacieków komórkowych	Odchylenie standardowe (SD)
I°	48	1,44	0,85
II°	39	1,44	0,78
III°	32	1,56	1,01
Ogółem	133	1,41	0,87

w badaniach Rodo (21). Warto zwrócić uwagę na obecność w niektórych guzach ognisk martwicy, co może zaciierać prawdziwość wyników. Ogniskowa martwica w guzach nowotworowych jest skutkiem dysproporcji pomiędzy dużą aktywnością proliferacyjną a unaczynieniem nowotworu i może inicjować komórkowe odczyny zapalne.

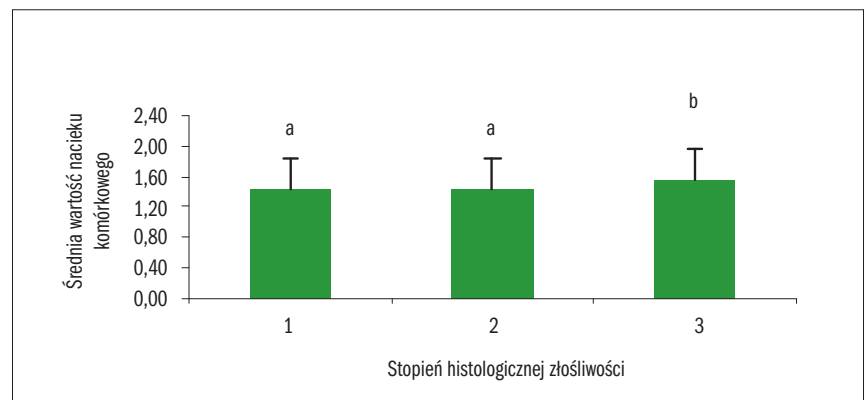
Przeanalizowano również rozmieszczenie nacieków komórkowych. Uzyskane wyniki są odmienne od badań innych autorów, gdyż nacieki obserwowano w podścielisku, a nie rozproszone, jak w badaniach Kelly (15) i Lee (17), ale podobnie było ich więcej na obwodzie guza. Gilbertson (18) stwierdził, że w rakach inwazyjnych, słabo zróżnicowanych obecny jest nacieki rozproszony, zaś w nowotworach *in situ*, dobrze zróżnicowanych obserwował okołonaczyniowy nacieki komórkowy. Warto zwrócić

uwagę na obecność w niektórych guzach ognisk martwicy, co może zaciierać prawdziwość wyników.

Rola nacieków komórkowych w obrębie guza pozostaje niewyjaśniona i kontrowersyjna, dlatego też konieczne są dalsze badania kliniczne, co w patologii porównawczej ma duże znaczenie poznawcze, ale również w aspekcie praktycznym jest bardzo interesujące.

Piśmiennictwo

- Gołąb J., Jakubisiak M., Lasek W.: *Immunologia*. PWN, 2004.
- Cho W.S., Chae C.: Expression of inflammatory cytokines (TNF-alpha, IL-1, IL-6 and IL8) in colon of pigs naturally infected with *Salmonella typhimurium* and *S. choleraesuis*. *J. Vet. Med. A* 2003, **50**, 484-487.
- Kowalczyk D.: Analiza różnorodności receptorów limfocytów T wiążących antygen w guzach litych. *Post. Biol. Kom.* 1996, **2**, 197-210.
- Old L.J., Cancer immunology: The search for specificity. G. H. A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res* 1981, **41**, 361-375.



Ryc. 2. Średnia intensywność nacieków komórkowych (± SD) w rakach o różnym stopniu histologicznej złośliwości. Różne litery nad słupkami odnoszą się do tego samego parametru i świadczą o różnicy istotnej statystycznie ($p \leq 0,05$) między średnimi

5. Bhan A.K., DesMarais C.L.: Immunohistologic characterization of major histocompatibility antigens and inflammatory cellular infiltrate in human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1983, **71**, 507-516.
6. Naukkarinen A., Syrjänen K.: Quantitative immunohistochemical analysis of mononuclear infiltrates in breast carcinomas- correlation with tumour differentiation. *J. Pathol.* 1990, **160**, 217-222.
7. Giorno R.: Mononuclear cells in malignant and benign human breast tissue. *Arch Pathol. Lab. Med.* 1983, **107**, 415-422.
8. Rilke F., Colnaghi M.I., Cascinelli N., Andreola S., Baldini M.T., Bufalino R., Della Porta G., Menard S., Pierotti M.A., Testori A.: Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int. J. Cancer* 1991, **49**, 44-49.
9. Parl F.F., Dupont W.D.: Retrospective cohort study of histologic risk factor in breast cancer patient. *Cancer* 1982, **50**, 2410-2416.
10. Roses D.F., Bell D.A., Flotte T.J., Taylor R., Ratech H., Dubin N.: Pathologic predictors of recurrence in stage I (T1NOMO) breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 1982, **78**, 817-820.
11. Black M.M., Hankey B.F., Barclay T.H.C.: Intrastage prognostic heterogeneity: implication for adjuvant chemotherapy of breast cancer. *J. Natl. Canc. Inst.* 1982, **68**, 445-447.
12. Dawson P.J., Karrison T., Ferguson D.J.: Histologic features associated with longterm survival in breast cancer. *Hum. Pathol.* 1986, **17**, 1015-1021.
13. Elton C.W., Gresham G.A., Rao G.S.: The cancer research campaign (King's/Cambridge) trial for early breast cancer. *Br. J. Cancer* 1982, **45**, 655-669.
14. Aaltoma S., Lipponen P., Eskelinem M., Kosma V-M., Marin S., Alhava E., Syrjänen K.: Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur. J. Cancer* 1992, **28A**, 859-864.
15. Kelly P.M.A., Davison R.S., Bliss E., McGee J.O.D.: Macrophages in human breast disease: a quantitative immunohistochemical study. *Br. J. Cancer* 1988, **57**, 174-177.
16. An T., Sood U., Pietruk T., Cummings G., Hashimoto K., Crissman J.D.: In situ quantitation of inflammatory mononuclear cells in ductal infiltrating breast carcinoma. Relation to prognostic factors. *Am. J. Pathol.* 1987, **128**, 52-60.
17. Lee A.H.S., Happerfield L.C., Millis R.R., Bobrow L.G.: Inflammatory infiltrate in invasive lobular and ductal carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer* 1996, **74**, 796-801.
18. Gilbertson S.R., Kurzman I.D., Zachran R.E., Hurvitz H.J., Black M.M.: Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet. Pathol.* 1983, **20**, 127-142.
19. Misdorp W., Else R.W., Hellmen E., Lipscomb T.P. *Histological classification of mammary tumors of the dog and cat.* World Health Organization, Geneva 1999.
20. Misdorp W.W. Meuten D. (edit.). *Tumors in Domestic Animals.* Iowa State Press, Black Publishing Company. 4th ed., 2002, s. 575-606.
21. Rodo A.: *Ekspresja receptorów HER-2, kadheryny E oraz białka p53 w nowotworach gruczołu sutkowego suk.* Rozprawa na stopień doktora, SGGW Warszawa 2007.
22. Nieto A., Pena L., Perez-Alenza M.D., Sanchez M.A., Flores J.M., Castano M.: Immunohistologic detection of estrogen receptor alfa in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet. Pathol.* 2000, **37**, 239-247.
23. Koda M., Sulkowski S., Surmacz E., Kanczuga-Koda L., Sulkowska M.: Expression of the insulin-like growth factor I receptor during breast carcinogenesis. *Materiały Konferencji: Physiology and Pathology of Mammary Cell Proliferation and Death.* Warsaw Agricultural University 2004, s. 73-74.
24. Niwińska A.: Nowe czynniki prognostyczne u chorych na raka sutka. *Nowotwory* 1995, **45**, 459-469.
25. Olszewski W.: Wybrane zagadnienia z patomorfologii raka sutka. *Nowotwory* 1994, **44**, (supl. 2), 10-16.
26. Skrzypczak M.: Angiogeneza w nowotworach gruczołu sutkowego suk. Rozprawa na stopień doktora, SGGW, Warszawa 2004.
27. Perez J., Day M.J., Martin M.P., Gonzalez S., Mozos E.: Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate and associated with feline cutaneous squamous cell carcinomas and precancerous lesions (actinic keratosis). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999, **69**, 33-46.

Badania zostały wykonane w Zakładzie Patomorfologii Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie.

Dr Anna M. Badowska-Kozakiewicz, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, e-mail: abadowska@op.pl