

Nowotwory gruczołu sutkowego u suk – model badań raka piersi u kobiet

Izabella Dolka¹, Tomasz Motyl², Elżbieta Malicka¹, Rafał Sapieryński¹

z Zakładu Patomorfologii Zwierząt Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej¹, oraz Zakładu Fiziologii Zwierząt Katedry Nauk Fizjologicznych² Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Choroby cywilizacyjne, a zwłaszcza nowotwory, są obecnie głównym problemem w patologii nie tylko ludzi, ale także zwierząt towarzyszących człowiekowi – psów i kotów. Częstość występowania chorób nowotworowych u psów wydaje się wciąż wzrastać, co po części związane jest z faktem dokładniejszej diagnostyki, statystycznego wydłużenia życia zwierząt trzymanyh w domu, a także prawdopodobnie, jak to jest u ludzi, wiąże się z narażeniem na większą ilość czynników o działaniu rakotwórczym. Warto też zaznaczyć, że zwierzęta domowe są narażone na działanie tych samych czynników

rakotwórczych co człowiek, ponieważ często przebywają w zbliżonych lub takich samych warunkach środowiskowych, co z jednej strony może przyczyniać się do wzrostu zachorowalności na nowotwory, a z drugiej stanowi przesłankę do prowadzenia badań porównawczych.

Od lat psy pomagają ludziom i ratują im życie na wiele sposobów, jako psy ratownicze, policyjne, asystujące osobom niepełnosprawnym lub chorym. Według doniesień z ostatnich lat, po odpowiednim szkoleniu mogą za pomocą węchu wykrywać nowotwory (1). Zważywszy, że w świetle współczesnej wiedzy etiopatogeneza niektórych

nowotworów spotykanych u psa i człowieka jest zbliżona oraz podobieństwo genomu psiego do ludzkiego wynosi około 80%, rozwój onkologii weterynaryjnej ma szczególnie istotne znaczenie dla patologii porównawczej, jak również dla praktyki klinicznej (2). W związku z tym, że podobieństwa odnośnie do etiopatogenezy, morfologii i zachowania biologicznego nowotworów gruczołu sutkowego u psów i u ludzi są bardzo duże, już w latach 50. XX wieku zaproponowano wykorzystanie psa jako modelu w badaniach raka piersi u kobiet (2, 3, 4; **tab. 1**).

Nowotwory gruczołu sutkowego psów stanowią około 13,4% wszystkich zmian nowotworowych rozpoznawanych u tego gatunku i zajmują drugie miejsce, po nowotworach skóry, pod względem częstości występowania (3, 4, 5). Z kolei uwzględniając płeć, guzy te u suk są nowotworami występującymi najczęściej (stanowią 42–52% spośród wszystkich rozpoznawanych nowotworów) i dodatkowo stanowią częstą przyczynę śmierci tych zwierząt (4). Częstość występowania nowotworów gruczołu sutkowego suk jest wyższa niż w innych

Canine mammary tumors – a model for studying breast cancer in women

Dolka I.¹, Motyl T.², Malicka E.¹, Sapieryński

R.¹, Division of Animal Pathomorphology, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics¹, Division of Animal Physiology, Department of Physiological Sciences², Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The aim of this paper was to describe features that may enable to employ the canine mammary cancer as a reliable model for women breast cancer investigations. Mammary gland tumors are the most frequent neoplasms both in women and bitches. Most sources describe approximately 50% of canine mammary tumors as malignant. In both host species these neoplasms are age dependent, rarely occurring before 5 (bitch) and 25 (woman) years with a median of 10–11 years for dogs and during or after menopause for people. Although the classification schemes for breast tumors and canine mammary tumors are different, the histopathological patterns are frequently similar. Also, canine and human mammary tumors are both hormone dependent. These similarities have prompted some investigators to postulate that canine mammary gland tumors may provide an important model for the study of human breast cancer. In bitches with mammary neoplasms many molecular markers have been studied but their use in diagnosis and evaluation of tumor pathogenesis, progress and treatment is still limited. Some markers have already been in use for establishing accurate histological diagnosis and prognosis of canine mammary tumors, namely the tumor size and its histological type and grade. Some others should soon be firmly established by the immunohistochemical methods, namely the steroid sex hormones receptors and markers for apoptosis, angiogenesis and metastasis. Canine mammary tumors are challenging for clinicians and pathologists, because the value of this cancer model may open up new perspectives not only for the development of prognostic and diagnostic biomarkers but also for testing and evaluation of novel cancer therapeutics.

Keywords: canine mammary gland neoplasia, human breast cancer, tumor markers.

gatunków zwierząt i trzykrotnie przewyższa wartości obserwowane u kobiet. Szacuje się, że nawet u 20% suk w ciągu ich życia może dojść do rozwoju nowotworu złośliwego w obrębie gruczołu sutkowego. Według badań przeprowadzonych na dużej grupie psów wykazano, że standardowy wskaźnik zachorowalności wynosi 162–198 przypadków na 100 000 psów rocznie lub 260 na 100 000 psów niepoddanych kastracji (3, 4).

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet zarówno w Europie, jak i w Stanach Zjednoczonych. Według Krajowego Rejestru Nowotworów

i biuletynu „Nowotwory złośliwe w Polsce” z 2006 r. Polska należy do krajów o średniej zachorowalności na nowotwory złośliwe piersi w skali światowej (standaryzowany współczynnik zachorowalności wynosi 44/100 000; 6). W 2006 r. zarejestrowano ok. 13 000 nowych przypadków oraz ok. 5000 zgonów. Rak piersi stanowi 21,5% wszystkich nowotworów złośliwych u kobiet oraz najczęstszą przyczynę zgonów z powodu choroby nowotworowej (13,1%). Nowotwór ten jest bardzo rzadki wśród mężczyzn, stanowi około 1% wszystkich przypadków. Interesujący jest fakt, że w ostatnim dziesięcioleciu wśród kobiet w średnim wieku (45–64 lata) liczba zgonów z powodu raka płuc i raka piersi wyrównała się, a u starszych kobiet (powyżej 65 lat) po raz pierwszy liczba zgonów z powodu raka płuc przekroczyła liczbę zgonów z powodu raka piersi. Pozytywną obserwacją jest powiększanie się różnicy między wskaźnikiem zachorowalności a śmiertelności, zwłaszcza w ostatnich latach. Fakt ten może świadczyć o lepszej (i wcześniejszej) diagnostyce oraz skuteczniejszym leczeniu tych nowotworów. Przewiduje się, że jeśli w Polsce nie wprowadzi się na szerszą skalę badań przesiewowych, w tym badań genetycznych, to w 2010 r. na raka piersi zachoruje ponad 17 000 kobiet, z czego ponad 6000 umrze.

Istnieje wiele hipotez starających się wyjaśnić etiologię nowotworów gruczołu sutkowego u suk, przy czym większość z nich podkreśla znaczny udział czynników hormonalnych. Wiadomo również, że u suk występują guzy zależne od hormonów, natomiast u samców powstają często w powiązaniu z ginekomastią na tle zaburzeń hormonalnych, np. z jednoczesnym występowaniem hormonalnie czynnych nowotworów jąder wywodzących się z komórek Sertolego (zespół feminizujących jąder; 3, 6). W tabeli 2 zestawiono dane, które przemawiają za istotnym udziałem czynników hormonalnych w rozwoju nowotworów gruczołu sutkowego u suk (5, 7).

W rozwoju guzów gruczołu sutkowego u suk mogą uczestniczyć również czynniki środowiskowe i genetyczne. Przykładowo, na rozwój guzów gruczołu sutkowego może mieć wpływ dieta. Wykazano, że spożywanie dużych ilości tłuszczów i otyłość, zwłaszcza u młodych suk (do 1 roku życia, sterylizowanych lub nie), oraz spożywanie czerwonego mięsa zwiększają ryzyko rozwoju nowotworów (8). Wiadomo też, że sprzyjającym czynnikiem w nowotworzeniu jest łatwość, z jaką tkanki gruczołowa i tłuszczowa gromadzą substancje rakotwórcze. Jak wykazały badania przeprowadzone u kobiet, otyłość prowadzi do wzrostu stężenia wolnej formy insulinopodobnego czynnika wzrostu – IGF-I oraz estradiolu w surowicy, i tym samym do

wzrostu ryzyka raka piersi (9). Szczególnie interesujące są doniesienia dotyczące mikotoksyn o działaniu estrogennym, występujących w żywności pochodzenia roślinnego, w płatkach zbożowych, a ostatnio, co się sugeruje, w komercyjnej karmie dla psów. Ponadto stwierdzono między innymi, że estrogenne działanie zearalenonu stymuluje wzrost komórek ludzkiego raka piersi linii MCF-7 (10).

W jednym z doświadczeń prowadzonych na młodych sukach rasy beagle wykazano wzrost ryzyka pojawienia się zmian nowotworowych w obrębie gruczołu sutkowego po naświetlaniu promieniami X (11). Nie potwierdzono natomiast udziału wirusów w patogenezie nowotworów gruczołu sutkowego u suk, a także predyspozycji genetycznych (wystąpienie mutacji w genie *BRCA-1* i/lub *BRCA-2*) do występowania tych nowotworów. W jednym z badań podobne zależności, jak w przypadku rodzinnego raka piersi u ludzi, zaobserwowano w linii hodowlanej cocker spanieli (12). W procesie transformacji nowotworowej gruczołu sutkowego zasadniczą rolę przypisuje się genomowi supresorowemu, z których najważniejszym jest gen *p53*. Gen *p53* odpowiedzialny jest za utrzymanie integralności genomu, a jego rola polega na zapobieganiu przekazywaniu zaburzeń genetycznych komórkom potomnym poprzez zatrzymanie uszkodzonej komórki w fazie G1 cyklu komórkowego i naprawę jej DNA, a w przypadku gdy uszkodzenie jest zbyt poważne, *p53* kieruje komórkę na drogę apoptozy. Liczne badania potwierdziły występowanie mutacji genu *p53* w wielu spontanicznych nowotworach u psów (np. w rakach płaskonabłonkowych skóry, gruczolakorakach gruczołów okołoodbytowych, chłoniakach, gruczolakorakach jelita grubego, kostniakomięsakach). W następstwie takich mutacji dochodzi do inaktywacji genu, utraty zdolności regulacji proliferacji komórkowej, a w konsekwencji niekontrolowanego wzrostu komórek. Ponadto wykazano korelację pomiędzy występowaniem mutacji w obrębie genu *p53* a obecnością nieprawidłowej formy białka *p53* w jądrach komórek nowotworowych (4, 13). Obserwowany wzrost stężenia białka *p53*, jego identyfikacja metodami immunohistochemicznymi (IHC) jest przedmiotem zainteresowania wielu badań ze względu na znaczenie prognostyczne w nowotworach gruczołu sutkowego suk (14). W dotychczasowych badaniach dotyczących genetycznego podłoża procesu nowotworzenia potwierdzono również rolę zaburzeń funkcji innych genów supresorowych, takich jak *PTEN* oraz onkogenów, tj. *c-myc*, *c-yes*, *c-erbB-2* (15).

Przynajmniej powstawania raka piersi, mimo znacznej liczby prac i analiz, jakie przeprowadzono na świecie, w dalszym

ciągu nie są dostatecznie jasne. Jednak na podstawie badań epidemiologicznych, klinicznych i laboratoryjnych zidentyfikowano, z pewnym prawdopodobieństwem, grupę niezależnych czynników nazywanych czynnikami ryzyka. Do najważniejszych należą: wiek, rak piersi stwierdzony w wywiadzie rodzinnym, rozpoznane w przeszłości niektóre łagodne zmiany, jak hiperplazja czy zmiany niezłośliwe, którym towarzyszyła atypia komórkowa. Największą liczbę zachorowań obserwuje się u kobiet po 50 roku życia, aczkolwiek zdarzają się również zachorowania u kobiet młodszych (20–44 lata; 27% zachorowań, 19% zgonów). Około 5–10% przypadków raka piersi ma podłoże dziedziczne. Kobiety z mutacjami genów supresorowych *BRCA-1* i *BRCA-2* mają podwyższone ryzyko zachorowania (56–85%). Inaktywacja genu *p53* w wyniku mutacji powszechnie występuje w ponad 50% raków piersi u kobiet. Z kolei badania u emigrantek wskazują na większy wpływ czynników środowiskowych niż uwarunkowań genetycznych na zachorowanie (16). Zwiększona ekspozycja komórek gruczołu sutkowego na promieniowanie jonizujące, szczególnie w młodym wieku (np. radioterapia w leczeniu trądzika), jest związana z większym prawdopodobieństwem nowotworzenia. Ponadto do czynników ryzyka zalicza się również: alkohol, dietę bogatą w tłuszcze i czerwone mięso, ekspozycję na pestycydy, otyłość w wieku pomenopauzalnym, hiperestrogenizm, późną pierwszą ciążę lub jej brak. Stosowanie doustnych leków antykoncepcyjnych i hormonalnej terapii zastępczej po 50. roku życia przez 10 lat i dłużej jest przedmiotem wielu kontrowersji w aspekcie wpływu na rozwój raka piersi.

Zarówno w medycynie, jak i w weterynarii prowadzone są intensywne, różnokierunkowe badania zmierzające do poznania niezwykle złożonej etiopatogenezy i opracowania profilaktyki oraz terapii nowotworów gruczołu sutkowego. Dlatego też niezbędne stało się określenie markerów nowotworowych pozwalających na wczesne wykrywanie przerzutów, przewidywanie ryzyka wznowy i lepszą ocenę stopnia zaawansowania procesu nowotworowego, co może stanowić podstawę rokowania, jak również wdrażania określonej terapii, tj. chemioterapii lub hormonoterapii. Pojęcie definiujące marker nowotworowy jest bardzo szerokie. Jest to obiektywny wyróżnik (znacznik) używany do identyfikacji choroby nowotworowej, oceny dynamiki już toczącego się procesu (proliferaacja, różnicowanie, apoptoza) lub do oceny reakcji na leczenie. Stosuje się wiele klasyfikacji, jedną z nich używaną w diagnostyce i terapii chorych na raka piersi jest podział na markery prognostyczne i predykcyjne. Markery prognostyczne wskazują na potencjalny

Tabela 1. Przykłady podobieństw między nowotworami gruczołu sutkowego psów i ludzi

1. Stanowią znaczny odsetek wszystkich nowotworów i występują spontanicznie
2. Występują predyspozycje płciowe (u samic zajmują zdecydowanie pierwsze miejsce)
3. Zachorowalność wzrasta wraz z wiekiem
4. Raki są najczęściej spotykane wśród nowotworów złośliwych
5. Budowa histologiczna nowotworów jest zbliżona, pomimo różnych metod klasyfikacji
6. Istnieje podobna lokalizacja przerzutów (regionalne węzły chłonne, płuca)
7. Znany jest wpływ hormonów płciowych oraz predyspozycje genetyczne (np. mutacja genu <i>p53</i> , <i>c-erbB-2</i>)
8. Komórki nowotworowe wykazują ekspresję receptorów dla płciowych hormonów steroidowych (ERα, PR)
9. Istnieje znaczne podobieństwo reakcji immunohistochemicznych

Tabela 2. Fakty potwierdzające udział czynników hormonalnych w etiopatogenezie nowotworów gruczołu sutkowego suk

1. Swoistość cyklu rujowego: u suk nieciążarnych, w przeciwieństwie do innych gatunków, brak luteolitycznego działania prostaglandyny pochodzenia macicznego, faza lutealna jest dłuższa niż fizjologiczna długość ciąży, luteinizacja ścian pęcherzyków jajnikowych zachodzi przed owulacją – jest to zjawisko niespotykane u innych gatunków; długie okresy oddziaływania estrogenów i progesteronu w poszczególnych fazach
2. Obecność receptorów dla estrogenów, progesteronu, androgenów, prolaktyny, glikokortykosteroidów i mineralokortykosteroidów w gruczole sutkowym suk oraz nowotworach tego narządu
3. Wczesne pojawienie się pierwszej rui jest związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju zarówno niezłośliwych, jak i złośliwych nowotworów gruczołu sutkowego
4. Wczesna ovariostektomia zmniejsza ryzyko wystąpienia nowotworów, znosząc rakotwórcze działanie hormonów płciowych. Ovariostektomia wykonana przed pierwszym cyklem zmniejsza ryzyko wystąpienia nowotworu do 0,5%, a przed drugim cyklem do 8% w porównaniu do suk kontrolnych z prawidłowymi cyklami. U suk, które poddano temu zabiegowi po drugim cyklu ryzyko nowotworu jest takie, jak u zwierząt niekastrowanych i wynosi 26%. Według innych badań ochronne działanie zabiegu zmniejsza się z każdą kolejną ruią, a po czwartej rui lub po ukończeniu 2½ lat ovariostektomia pozostaje bez wpływu na rozwój choroby
5. Ryzyko wzrasta u suk, u których objawy ciąży urojonej występowały wielokrotnie. Długotrwała aktywność wydzielnicza gruczołów sutkowych i zaleganie wydzieliny może sprzyjać procesowi nowotworzenia
6. Długotrwałe stosowanie progestagenów w celu blokady cyklu jajnikowego stymuluje wzrost guzów gruczołu sutkowego

przebieg choroby, natomiast predykcyjne są wskaźnikami związanymi z prawdopodobieństwem wystąpienia odpowiedzi na poszczególne schematy terapii przeciwnowotworowej. Do najważniejszych czynników prognostycznych, potencjalnie użytecznych w ocenie nowotworów gruczołu sutkowego, należą czynniki kliniczne, patomorfologiczne, markery immunohistochemiczne i inne (oznaczane za pomocą różnych metod, innych niż IHC).

Czynniki kliniczne

Wiek

Jest istotnym czynnikiem prognostycznym u ludzi. Rozpoznanie raka piersi u kobiet w wieku poniżej 35 lat oraz powyżej 55 roku życia jest czynnikiem niekorzystnym rokowniczo, natomiast w przypadku suk dane są niejednoznaczne. Większość badań potwierdza jednak, że częstość pojawiania się nowotworów gruczołu sutkowego wzrasta wraz z wiekiem. Nowotwory gruczołu sutkowego stwierdzane są głównie u starszych suk, najczęściej w przedziale wiekowym od 9 do 11 lat i zdecydowanie

rzadziej guzy te obserwowane są u suk poniżej 2 lat (4, 17). U starszych psów, ze względu na związane z wiekiem obniżone rezerwy czynnościowe i obciążenie współistniejącymi chorobami, należy ostrożnie interpretować wskaźniki przeżycia po mastektomii, dlatego też śmiertelność tylko pośrednio odpowiada wynikom leczenia. Ponadto zaawansowany wiek sprawia, że nie wszystkie możliwości postępowania terapeutycznego mogą być zastosowane u takich psów (5, 18, 19). Według wielu autorów zaawansowany wiek suk i nowotworem gruczołu sutkowego jest skorelowany z gorszym rokowaniem i krótszym okresem przeżycia po operacji usunięcia guza (4, 19), chociaż są badania, w których nie wykazano takiej zależności (20).

Stan hormonalny i wiek wykonania ovariostektomii

Jak dotąd nie potwierdzono, aby długość cyklu rujowego, liczba przeżytych ciąży lub zaburzenia cyklu (np. ciąży urojone) wpływały na rokowanie u suk z guzami gruczołu sutkowego. Z kolei wykazano, że okres przeżycia jest dłuższy u suk, u których

zabieg owariohisterektomii wykonano w okresie krótszym niż 2 lata od zabiegu usunięcia guza lub w tym samym czasie (20). Natomiast z innych badań wynika, że owariektomia i mastektomia przeprowadzona w tym samym czasie nie ma wpływu na czas przeżycia (21).

Stopień zaawansowania nowotworu

Według klasyfikacji TNM obejmuje ocenę wielkości guza (T), stanu regionalnych węzłów chłonnych (N) i obecności przerzutów odległych (M). W badaniach nad oceną przydatności klasyfikacji TNM w nowotworach gruczołu sutkowego u suk wykazano korelację wielkości guza z prawdopodobieństwem stwierdzenia przerzutów do węzłów chłonnych i narządów odległych (7, 19, 21, 22).

Wielkość guza pierwotnego

Jest czynnikiem prognostycznym o niewątpliwie ustalonej wartości zarówno w medycynie, jak i weterynarii. Wieloletnie obserwacje Martin De Las Mulas i wsp. (23) wykazały, że współczynnik śmiertelności suk z nowotworem gruczołu sutkowego zmniejsza się i jest to związane z wcześniejszym wykrywaniem małych guzów, co ma korzystny wpływ na czas przeżycia. U kobiet chorych na raka piersi w miarę zwiększania średnicy guza wzrasta ryzyko wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, przerzutów odległych, a także wzrasta prawdopodobieństwo skrócenia czasu przeżycia bezobjawowego i całkowitego, przykładowo, zmiany o średnicy 0,1–0,5 cm dają przerzuty w 28,6% przypadkach, natomiast guzy o średnicy powyżej 5 cm – w 64% (24). W przypadku nowotworów gruczołu sutkowego suk wiele badań wykazało, że wielkość guza jest niezależnym czynnikiem prognostycznym. Stwierdzono, że u psów z małymi guzami (<3 cm) rokowanie odnośnie do długości czasu przeżycia jest znacznie lepsze niż u psów z guzami większymi, tj. ≥3 cm (5, 25, 26).

Ocena węzłów chłonnych wartowniczych (tj. zlokalizowanych najbliżej guza i w pierwszej kolejności zajmowanych przez komórki nowotworowe)

Stwierdzenie przerzutu w tych węzłach wiąże się z bardzo wysokim prawdopodobieństwem wystąpienia przerzutów w węzłach odległych (4).

Objawy kliniczne guza

Są to tempo wzrostu, konsystencja, ruchość względem skóry, mięśni piersiowych i ściany klatki piersiowej, stan torebki

łącznotkankowej, bolesność, wyciek, zmiany skórne, np. owrzodzenie powierzchni guza, rumień, obrzęk; w przypadku raka zapalnego gruczołu sutkowego u suk obserwuje się objawy zapalenia, owrzodzenie skóry związane z obecnością komórek nowotworowych w naczyniach limfatycznych skóry; są one czynnikami prognostycznie niekorzystnymi (27).

Czynniki patomorfologiczne:

Typ histologiczny nowotworu

Określone typy histologiczne nowotworów gruczołu sutkowego pozwalają na lepsze rokowanie, np. u suk raki złożone rokują lepiej niż raki proste, te z kolei rokują lepiej niż raki lite czy zapalne. Gorsze rokowanie wiąże się z występowaniem mięsaka i raka anaplastycznego. Ocenia się, że średni czas przeżycia po wycięciu raka litego, mięsaka i raka anaplastycznego wynosi odpowiednio 9, 6 i 3 miesiące (4, 20, 27).

Stopień histologicznej złośliwości

Według kryteriów opracowanych przez Misdorp (4) w ocenie stopnia histologicznej złośliwości uwzględnia się w obrazie histologicznym takie cechy, jak: zdolność tworzenia cewek, hiperchromazję (intensywne zabarwienie jąder komórkowych), liczbę figur mitotycznych oraz polimorfizm. Każdy z tych elementów oceniany jest w skali trójstopniowej (od 1 do 3) i suma punktów stanowi podstawę określenia stopnia złośliwości histologicznej – od I do III. Metoda ta umożliwia wyodrębnienie grup o różnym rokowaniu.

Naciekanie przez komórki nowotworowe podścieliska, naczyń krwionośnych i limfatycznych

Wskazuje na inwazyjny charakter nowotworu i jest kliniczną oznaką dużej złośliwości. Wykazano, że spośród suk z nowotworami naciekającymi sąsiednie tkanki od 50 do ponad 80% nie przeżywa 2 lat od zabiegu usunięcia guza, natomiast gdy nowotwór rośnie w sposób ekspansywny, wskaźnik ten wynosi ok. 40% (25).

Obecność nacieków limfocytarnych i ich intensywność

Wydaje się pozytywnym czynnikiem rokowniczym będącym wyrazem odpowiedzi przeciwnowotworowej, lecz zależy to w dużej mierze od typu nowotworu (26, 28).

Obecność ognisk martwicy

Świadczy o dysproporcji pomiędzy aktywnością proliferacyjną a unaczynieniem

nowotworu, co pogarsza rokowanie. W jednym z badań zaobserwowano, że ogniska martwicy występowały w nowotworach z wysoką aktywnością proliferacyjną (29).

Markery immunohistochemiczne

Markery aktywności proliferacyjnej – antygen jądrowy Ki-67 oraz PCNA (proliferating-cell nuclear antigen)

Nowotworom, których komórki dzielą się częściej przypisuje się niski stopień zróżnicowania oraz wysoki stopień złośliwości. W badaniach nowotworów gruczołu sutkowego suk prowadzonych w oparciu o materiał tkankowy, jak i cytologiczny stwierdzono, że zwiększona ekspresja Ki-67 wiąże się z wysokim stopniem histologicznej złośliwości guzów, skróceniem czasu całkowitego przeżycia oraz okresu wolnego od nawrotu choroby (28, 29, 30, 31).

Białka biorące udział w replikacji DNA (minichromosome maintenance proteins – MCM)

Ich obecność w komórkach nowotworowych gruczołu sutkowego suk może być przydatnym markerem proliferacji komórkowej, zróżnicowania histologicznego, a ich nadekspresja wiąże się z niekorzystnym rokowaniem (32).

Receptory estrogenowy α (ERα) i progesteronowy (PR)

Ich znaczenie prognostyczne w nowotworach gruczołu sutkowego u suk nie zostało dotychczas jednoznacznie określone i, w przeciwieństwie do raka piersi u kobiet, w onkologii weterynaryjnej oznaczenie ekspresji ERα i PR nie jest rutynowym postępowaniem, a także nie stosuje się terapii hormonalnej, chociaż podejmowano takie próby (22). Większość autorów jest zgodna, że obecność receptorów ERα i PR w nowotworach gruczołu sutkowego pozostaje w odwrotnej zależności ze stopniem jego histologicznej złośliwości, nasileniem jego proliferacji i jest korzystnym czynnikiem rokowniczym, jednakże w innych badaniach nie miała ona znaczenia rokowniczego. Zarówno w medycynie, jak i w weterynarii uważa się, że odsetek guzów gruczołu sutkowego wykazujących ekspresję receptorów estrogenowego i progesteronowego zależy od wieku chorej oraz jej statusu hormonalnego (18, 23).

Receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu – EGFR (c-erbB-1)

Liczne prace zarówno z zakresu medycyny, jak i weterynarii potwierdzają, że nadekspresja EGFR w nowotworach gruczołu

sutkowego jest związana ze złym rokowaniem (33).

Receptor HER-2 (c-erbB-2)

Nadekspresja HER-2 jest wskaźnikiem agresywnego przebiegu raka piersi u kobiet, a jej oznaczenie jest przydatne w wyborze metody leczenia. W przypadku badań prowadzonych u suk wykazano, że koreluje ona z wysoką aktywnością proliferacyjną oraz stopniem histologicznej złośliwości, lecz nie ma związku z lokalnym naciekiem czy przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych. Ostatnie badania wskazują jednak na wydłużenie czasu przeżycia suk po chirurgicznym usunięciu guza z nadekspresją receptora HER-2 (19, 28).

Receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I (IGF-IR)

Jak dotąd nie ma jednoznacznych opinii na temat związku ekspresji IGF-IR z innymi czynnikami uważanymi za markery prognostyczne i predykcyjne w nowotworach gruczołu sutkowego u suk. Natomiast w pracach dotyczących raka piersi u kobiet większość autorów potwierdza, że występowanie ekspresji IGF-IR oraz ER α wiąże się z dobrym rokowaniem, jednakże w przypadku guzów IGF-IR(+) dających przerzuty do węzłów chłonnych rokowanie jest niekorzystne (34). Z kolei dane dotyczące korelacji IGFs z receptorem progesteronowym (PR) są nieliczne i niejednoznaczne. Niektórzy autorzy sugerują, że istnieje podobny „cross-talk” IGF z PR, który ma korzystne znaczenie prognostyczne (35).

Receptory dla erytropoetyny (EpoR)

Ich nadekspresja może być związana z niekorzystnym rokowaniem. Przypuszcza się, że miejscowe działanie erytropoetyny wpływa na unaczynienie guza i podtrzymanie przeżycia komórek nowotworowych w warunkach niedotlenienia (36).

Onkogeny i geny supresorowe – p53, PTEN

W rokowaniu nowotworów gruczołu sutkowego u suk próbuje się także wykorzystać ocenę ekspresji białka p53. Jak dotąd wykazano, że w przypadku jej stwierdzenia rokowanie jest gorsze i jest równoznaczne ze skróceniem okresu przeżycia oraz dużym prawdopodobieństwem wystąpienia wznowy (13). Podobne wnioski przyniosły badania dotyczące raka piersi u ludzi, gdzie obecność białka p53 w komórkach nowotworowych jest silnie skorelowana z występowaniem przerzutów i z krótszym czasem przeżycia (24).

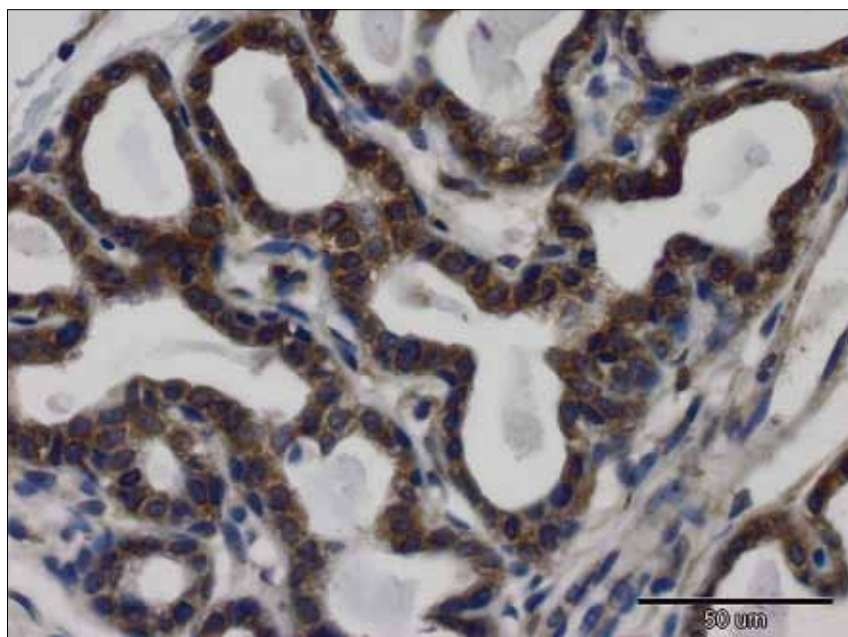
Jednym z genów, który wzbudza zainteresowanie w prognozowaniu jest gen supresorowy *PTEN*. W raku piersi utrata jego aktywności jest wiązana również z negatywnym rokowaniem, podobne wyniki otrzymano odnośnie do suk. W badaniach immunohistochemicznych stwierdzono brak ekspresji *PTEN* w 33% nowotworów gruczołu sutkowego suk i wykazano korelację z krótszym okresem przeżycia, pojawieniem się wznowy miejscowej i przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych oraz narządów (37).

Białka związane z procesem apoptozy – Bcl-2, Bax, kaspaza-3

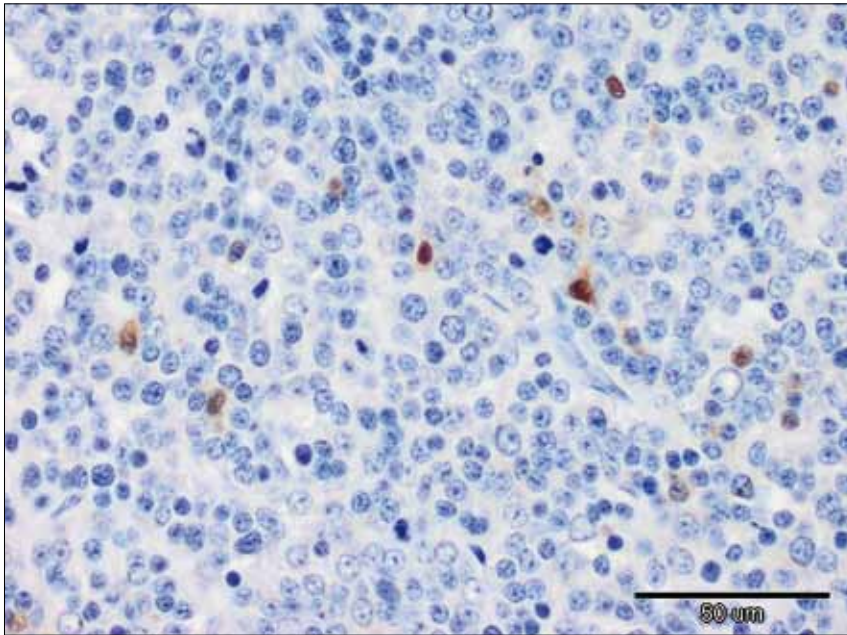
Dowiedziano, że w raku piersi u kobiet nadekspresja białka antyapoptotycznego Bcl-2 stwarza możliwość przewidywania skutków terapii hormonalnej i/lub cytotoksycznej. Wysoka ekspresja białka Bcl-2 była stwierdzana w rakach piersi estrogenozależnych oraz związanych z receptorem progesteronowym, o niskim stopniu histologicznej złośliwości. Najlepiej opisanym promotorem apoptozy jest białko Bax. Pomimo licznych badań kliniczna rola tego białka nadal nie została jednoznacznie ustalona. W rakach piersi stwierdzono, że przywrócenie ekspresji białka Bax hamuje rozwój nowotworu, powoduje wzrost liczby komórek w stanie apoptozy i zwiększa wrażliwość na cytostatyki, ale też związane jest wysokim stopniem histologicznej złośliwości i gorszym rokowaniem (38). Według innych badań redukcja ekspresji Bax jest negatywnym czynnikiem prognostycznym w rakach piersi, gdyż koreluje ze złą odpowiedzią na chemioterapię i krótszym okresem przeżycia (39). W medycynie weterynaryjnej istnieją stosunkowo nieliczne

doniesienia dotyczące znaczenia prognostycznego markerów apoptozy w nowotworach gruczołu sutkowego suk. W badaniach własnych, podobnie jak w badaniach innych autorów, wykazano, że ekspresja Bcl-2 jest wyższa w nowotworach niezłośliwych wykazujących ekspresję ER α i wiąże się z korzystnym rokowaniem (14, 17; ryc. 1). W przypadku białka Bax wykazano jedynie jego rolę w procesie nowotworzenia, natomiast ustalenie jego wartości prognostycznej w nowotworach gruczołu sutkowego wymaga dalszych badań (14). Poczynione obserwacje sugerują jednak, że po to, aby uzyskać pełny obraz procesu apoptozy w guzie, powinno się uwzględnić łącznie ekspresję Bax, Bcl-2 oraz białka p53, i dopiero łączna ocena tych wskaźników może mieć wartość prognostyczną.

Głównymi efektorami procesu apoptozy są proteazy cysteinowe, tzw. kaspazy. Kluczową rolę w przebiegu efektorowej, nieodwracalnej fazy apoptozy przypisuje się kaspazie-3. Rokownicze znaczenie występowania ekspresji kaspazy-3 w komórkach guzów gruczołu sutkowego pozostaje przedmiotem kontrowersji. Jakkolwiek w części prac uważa się, że w raku piersi zwiększony odsetek komórek wykazujących ekspresję kaspazy-3 ma związek ze złym rokowaniem (40), to w innych badaniach potwierdzono, że dla nowotworzenia charakterystyczne jest zmniejszenie nasilenia apoptozy i zahamowanie aktywacji kaspazy-3, które wiążą się z chemioopornością i gorszym rokowaniem (41). Dyskusyjne wydają się wyniki badań mające wyjaśnić przydatność oceny ekspresji kaspazy-3 jako czynnika prognostycznego w nowotworach gruczołu sutkowego u suk. W jednej pracy autorzy stwierdzili, że niska ekspresja kaspazy-3 odwrotnie



Ryc. 1. Komórki wykazujące ekspresję białka Bcl-2 (brązowe). Gruczolak gruczołu sutkowego psa, pow. 400 \times , IHC



Ryc. 2. Komórki wykazujące ekspresję kaspazy-3 (brązowe). Rak lity gruczołu sutkowego psa, pow. 400×, IHC

koreluje z poziomem białek szoku cieplnego i białka Bcl-2 w komórkach nowotworowych gruczołu sutkowego suk (42). W badaniach własnych zwiększoną ekspresję kaspazy-3 oznaczaną metodą IHC obserwowano w komórkach raków prostych i litych w porównaniu do gruczolaków i raków złożonych (ryc. 2).

Markery potencjału guza do naciekania i inwazyjności – β -katenina, E-kadheryna, metaloproteinazy – matrix metalloproteinases – MMPs

W raku piersi stwierdza się wiele nieprawidłowości dotyczących białek adhezyjnych (kadheryn, katenin), odpowiedzialnych za wzajemne przyleganie komórek, jak również za przyleganie do macierzy pozakomórkowej. U psów wykazano istnienie zależności pomiędzy zmniejszoną ekspresją E-kadheryny a wielkością i typem histologicznym nowotworu, stopniem histologicznej złośliwości, aktywnością proliferacyjną oraz obecnością przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych oraz krótszym okresem przeżycia (28). Badano także związek proliferacji z ekspresją cząsteczek adhezyjnych β -kateniny i E-kadheryny, a także występowanie MMPs w kontekście inwazyjności, powstawania przerzutów, lecz nie ma jeszcze danych na temat ich wartości prognostycznej (43).

Markery angiogenezy – VEGF

Istnieją doniesienia podkreślające znaczenie prognostyczne neoangiogenezy w obrębie guzów gruczołu sutkowego suk. Niektóre dane wskazują na istnienie zależności pomiędzy ekspresją VEGF, gęstością naczyń w obrębie guza a stopniem

histologicznej złośliwości, występowaniem przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, a także długością przeżycia całkowitego, natomiast według innych brak korelacji przemawia przeciwko przydatności tego markera w nowotworach gruczołu sutkowego suk (15, 26).

W piśmiennictwie weterynaryjnym opisywano również inne badania z zastosowaniem metod immunohistochemicznych, celem ustalenia nowych markerów prognostycznych w nowotworach gruczołu sutkowego u suk, np.:

- cyklooksygenaza (COX) – niekorzystny czynnik prognostyczny (31),
- białka szoku cieplnego, tj. Hsp-27, Hsp-70 – niekorzystny czynnik prognostyczny (42),
- metalotioneiny – dyskusyjna wartość prognostyczna (44),
- maspina – dyskusyjna wartość prognostyczna (45),
- markery oporności wielolekowej, tj. glikoproteina P (Pgp), gen *MDR-1* – niekorzystny czynnik prognostyczny (46).

Inne markery (oznaczane za pomocą różnych metod odmiennych niż IHC)

Markery aktywności proliferacyjnej

Należą do nich: indeks mitotyczny (MI), indeks znakowanej tymidyny (TLI), odsetek komórek w fazie S cyklu komórkowego i liczba tzw. organizatorów jąderkowych (AgNOR). Pomimo swojej prostoty, ustalenie wartości indeksu mitotycznego w preparatach barwionych metodą H-E jest jednym z kryteriów morfologicznych w ocenie stopnia histologicznej złośliwości raków gruczołu sutkowego i może mieć znaczenie rokownicze (4). Wysoki odsetek komórek

będących w fazie S cyklu komórkowego wskazuje na wysoką złośliwość guza, nieprawidłową zawartość DNA w jądrach komórkowych (aneuploidia), również wykazano korelację między zwiększeniem liczby AgNORs (organizatorów jąderkowych wybarwionych metodą srebrzenia) a wysokim stopniem złośliwości nowotworu. Jednak wartość prognostyczna oznaczeń AgNOR w nowotworach gruczołu sutkowego u suk nie została jednoznacznie potwierdzona i według autorów niezbędna jest bardziej precyzyjna standaryzacja tej metody (30).

Ocena zawartości DNA w jądrach komórkowych (ploidia)

W nielicznych pracach, ze względu na fakt korelacji aneuploidii z wysoką aktywnością proliferacyjną oraz skróconym czasem przeżycia suk po mastektomii, wykazano wartość prognostyczną oznaczania ploiddii DNA w nowotworach gruczołu sutkowego u suk (26, 29).

Ustalenie markerów dla nowotworów gruczołu sutkowego od wielu lat jest przedmiotem licznych badań i nadal pozostaje w kręgu zainteresowań zarówno w onkologii medycznej, jak i weterynaryjnej. Jednakże dla większości z badanych markerów znaczenie rokownicze nie zostało dotychczas udowodnione, co pozwala dostrzec jak bardzo skomplikowany jest proces rozwoju oraz progresji nowotworów gruczołu sutkowego u suk. Jest mało prawdopodobne, aby analiza zaburzeń ekspresji jakiegokolwiek jednego genu pozwoliła na wyjaśnienie tego mechanizmu, gdyż złośliwy fenotyp jest odzwierciedleniem współdziałania produktów ekspresji wielu genów. Należy przypuszczać, że w niezbyt odległej przyszłości badane wskaźniki uzyskają znaczenie praktyczne w onkologii weterynaryjnej.

Piśmiennictwo

1. Gordon R.T., Schatz C.B., Myers L.J., Kosty M., Gonczy C., Kroener J., Tran M., Kurtzals P., Heath S., Koziol J.A., Arthur N., Gabriel M., Hemping J., Hemping G., Nesbitt S., Tucker-Clark L., Zaayer J.: The use of canines in the detection of human cancers. *J. Altern. Complement. Med.* 2008, **14**, 61-67.
2. Uva P., Aurisicchio L., Watters J., Loboda A., Kulkarni A., Castle J., Palombo F., Viti V., Mesiti G., Zappulli V., Marconato L., Abramo F., Ciliberto G., Lahm A., La Monica N., Rinaldis E. de: Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics.* 2009, **10**, 135.
3. Rutteman G.R., Withrow S.J., MacEwen E.G.: Tumors of the mammary gland. W: Withrow S.J., MacEwen E.G. (edit.): *Small Animal Clinical Oncology*, W. B. Saunders Company, Philadelphia 2001.
4. Misdorp W.: Tumors of the mammary gland. W: Meuten D. J. (edit.) *Tumors in Domestic Animals*, Iowa State Press, Iowa 2002, 575-606.
5. Sorenmo K.: Canine mammary gland tumors. *Vet. Clin. Small Anim.* 2003, **33**, 573-596.
6. Wojciechowska U., Didkowska J., Zatoński W.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2006 roku. *Biuletyn Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie*. Warszawa, 2008, 1-143.
7. Bostock D.E.: Canine and feline mammary neoplasms. *Br. Vet. J.* 1986, **142**, 506-515.

8. Pérez-Alenza M.D., Rutteman G.R., Peña L., Beynen A.C., Cuesta P.: Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J. Vet. Intern. Med.* 1998, **12**, 132-139.
9. Stoll B.A.: Oestrogen/insulin-like growth factor-1 receptor interaction in early breast cancer: clinical implications. *Ann. Oncol.* 2002, **13**, 191-196.
10. Goliński P. K., Nowak T.: Dietary origin of mycotoxins with estrogenic potential and possible health implications to female dogs. *Pol. J. Vet. Sci.* 2004, **7**, 337-341.
11. Anderson A.C., Rosenblatt L.S.: The effect of whole body X radiation on the median life span of female dogs (beagles). *Rad. Res.* 1969, **39**, 177-200.
12. Sourvinos G., Tsatsanis C., Spandidos D.A.: Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis. *Folia. Biol. (Praha)*. 2000, **46**, 226-232.
13. Lee C., Kim W., Lim J., Kang M., Kim D., Kweon O.: Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J. Vet. Sci.* 2004, **5**, 63-69.
14. 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**, 218-224.
15. Qiu C.W., Lin D.G., Wang J.Q., Li C.Y., Deng G.Z.: Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. *Vet. Res. Commun.* 2008, **32**, 463-472.
16. Andreeva V.A., Unger J.B., Pentz M.A.: Breast cancer among immigrants: a systematic review and new research directions. *J. Immigr. Minor. Health.* 2007, **9**, 307-322.
17. Yang W.Y., Liu C.H., Chang C.J., Lee C.C., Chang K.J., Lin C.T.: Proliferative activity, apoptosis, and expression of oestrogen receptors and Bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *J. Comp. Pathol.* 2006, **134**, 74-83.
18. Nieto A., Peña L., Pérez-Alenza M.D., Sánchez M.A., Flores J.M., Castaño M.: Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet. Pathol.* 2000, **37**, 239-247.
19. Pérez-Alenza M.D., Peña L., Del Castillo N., Nieto A.I.: Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. *J. Small Anim. Pract.* 2000, **41**, 287-291.
20. Chang S.C., Chang C.C., Chang T.J., Wong M.L.: Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005, **227**, 1625-1629.
21. Yamagami T., Kobayashi T., Takahashi K., Sugiyama M.: Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. *J. Small Anim. Pract.* 1996, **37**, 462-463.
22. Rutteman G.R., Withrow S.J., MacEwen E.G.: Tumors of the mammary gland. W: Withrow S.J., MacEwen E.G. (edit.): *Small Animal Clinical Oncology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia 2001, 455-477.
23. Martin De Las Mulas J., Dios R., Millán M.Y.: A 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**, 200-212.
24. Pierkowski T.: Rak piersi. W: Krzakowski M.: *Onkologia kliniczna*. Borgis, Warszawa, 2001, 87-101.
25. 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**, 1079-1083.
26. Skrzypczak M.: *Angiogeneza w nowotworach gruczołu sutkowego suk*. Praca doktorska. Wydział Medycyny Weterynaryjnej. SGGW, Warszawa, 2004.
27. Peña L., Pérez-Alenza M.D., Silvan G., Lopes C., Illera, Nieto A.: Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003, **84**, 211-216.
28. Rodo A.: *Ekspresja receptora HER-2, kadheryny E oraz białka p53 w nowotworach gruczołu sutkowego suk*. Praca doktorska. Wydział Medycyny Weterynaryjnej. SGGW, Warszawa, 2008.
29. Destexhe E., Bicker E., Coignoul E.: Image analysis evaluation of ploidy, S-phase fraction and nuclear area in canine mammary tumours. *J. Comp. Path.* 1995, **113**, 205-216.
30. Löhr C.V., Teifke J.P., Failing K., Weiss E.: Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors

by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Vet. Pathol.* 1997, **34**, 212-221.

31. Badowska-Kozakiewicz A.: *Immunohistochemiczna ocena ekspresji cyklooksygenazy-2 i białek szoku ciepłego w nowotworach gruczołu sutkowego suk*. Praca doktorska. Wydział Medycyny Weterynaryjnej. SGGW, Warszawa, 2009.
32. Nowak M., Madej J.A., Dzięgiel P.: Correlation between MCM-3 protein expression and grade of malignancy in mammary adenocarcinomas and soft tissue fibrosarcomas in dogs. *In Vivo* 2009, **23**, 49-54.
33. Gama A., Gärtner F., Alves A., Schmitt F.: Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tissues. *Res. Vet. Sci.* 2009, **87**, 432-437.
34. Henriksen K.L., Rasmussen B.B., Lykkesfeldt A.E., Møller S., Ejlersen B., Mouridsen H.T.: An ER activity profile including ER, PR, Bcl-2 and IGF-IR may have potential as selection criterion for letrozole or tamoxifen treatment of patients with advanced breast cancer. *Acta Oncol.* 2009, **48**, 522-531.
35. Shimizu C., Hasegawa T., Tani Y., Takahashi F., Takeuchi M., Watanabe T., Ando M., Katsumata N., Fujiwara Y.: Expression of insulin-like growth factor 1 receptor in primary breast cancer: immunohistochemical analysis. *Hum. Pathol.* 2004, **35**, 1537-1542.
36. Sfacteria A., Mazzullo G., Bertani C., Calabro P., Vico G. de, Macri B.: Erythropoietin receptor expression in canine mammary tumor: an immunohistochemical study. *Vet. Pathol.* 2005, **42**, 837-840.
37. Ressel L., Millanta F., Caleri E., Innocenti V., Poli A.: Reduced PTEN protein expression and its prognostic implications in canine and feline mammary tumours. *Vet. Pathol.* 2009, **46**, 860-868.
38. Veronese S., Mauri F.A., Caffo O., Scaioli M., Aldovini D., Perrone G., Galligioni E., Dogliani C., Dalla Palma P., Barbareschi M.: Bax immunohistochemical expression in breast carcinoma: a study with long term follow-up. *Int. J. Cancer. (Pred. Oncol.)* 1998, **79**, 13-18.
39. Krajewski S., Krajewska M., Turner B.C., Pratt C., Howard B., Zapata J.M., Frenkel V., Robertson S., Ionov Y., Yamamoto H., Peruchio M., Takayama S., Reed J.C.: Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 1999, **6**, 29-40.
40. Nakopoulou L., Alexandrou P., Stefanaki K., Panayotopoulou E., Lazaris A.C., Davaris P.S.: Immunohistochemical expression of caspase-3 as an adverse indicator of the clinical outcome in human breast cancer. *Pathobiology* 2001, **69**, 266-273.
41. Devarajan E., Sahin A.A., Chen J.S., Krishnamurthy R.R., Aggarwal N., Brun A.M., Sapino A., Zhang F., Sharma D., Yang X.H., Tora A.D., Mehta K.: Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* 2002, **21**, 8843-8851.
42. Kumaraguruparan R., Karunakaran D., Balachandran C., Manohar B.M., Nagini S.: Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clin. Chimica. Act.* 2006, **365**, 168-176.
43. Nowak M., Madej J.A., Dzięgiel P.: Expression of E-cadherin, β -catenin and Ki-67 antigen and their reciprocal relationships in mammary adenocarcinomas in bitches. *Folia Hist. Cytobiol.* 2007, **45**, 233-238.
44. Nowak M., Madej J.A., Dzięgiel P.: Ekspresja metalotioneiny i jej korelacja z antygenem Ki-67 w gruczolakorakach gruczołu sutkowego suk. *Medycyna Wet.* 2006, **62**, 427-431.
45. Zuccari D.A., Carmona J., Castro R., Frade C.S., Terzian A.C.B., Pivaro L.R., Gomes F.G., Ruiz C.M., Tajara E.H.: The immunohistochemical study of maspin as a prognostic marker in canine mammary tumours. *25th Annual Meeting ESVP*, Germany, 2007, 234.
46. Petterino C., Rossetti E., Bertonecello D., Martini M., Zappulli V., Bargelloni L., Castagnaro M.: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in canine mammary gland tumours. *J. Vet. Med.* A 2006, **53**, 174-178.

Dr Izabella Dolka, Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

PRODUKTY FUNKCJONALNE DLA BYDŁA Z DODATKIEM ZIOŁ

RUMEN ACTIVE

lepsza praca przedżołądków, pobudza perystaltykę, w zależności od dawki działa przeczyszczająco.

BOVI-SOMATIC

większa odporność wymienia, redukuje komórki somatyczne, wspomaga i przyspiesza proces leczenia gruczołu mlekowego.

BOVI-TYMPANIC

mniej wzdęć, przyspiesza procesy trawienne, działa przeciwwzdęciowo i wiatropędnie.

BOVI-APETIZER

wzmaga wydzielanie soków trawiennych, stymuluje odbudowę mikroflory żwacza, zapobiega wystąpieniu niestrawności, ketozy oraz kwasicy.

BOVI-ESTROFARM

więcej skutecznych zacieleń, pobudza cykl hormonalny, podawać przez 14 dni przed spodziewaną rują lub w trakcie leczenia (ciche ruje, brak rui).

BRONCHI-FARM

mniej problemów oddechowych, wspomaga proces leczenia schorzeń układu oddechowego.

BOVI-CALV

większe przyrosty cieląt, regeneracja kosmków jelitowych, regulator procesów trawienia, pobudza apetyt, preparat odżywczy dla rekonwalescentów.

Preparaty zawierają w swoim składzie m.in. związki biologicznie aktywne pozyskane z ziół, ekstrakty roślinne, mikroelementy w postaci łatwo przyswajalnych chelatów glicynowych, żywe kultury drożdży, aminokwasy chronione, witaminy, probiotyki i inne.

Unikalny skład pozwala na ich użycie w profilaktyce i wspomaganie leczenia schorzeń bydła takich jak zapalenia wymienia, niestrawności pokarmowe, zaburzenia w rozrodzie, schorzenia układu oddechowego i zahamowanie wzrostu cieląt.



07-410 Ostrołęka ul. Targowa 41
tel./faks 029 767 87 41
e-mail: biuro@jfarm.pl
www.jfarm.pl