



UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Patologii
Zakład Patomorfologii i Weterynarii Sądowej

LEK. WET. JOANNA BUBAK

**EKSPRESJA SOX 10 I TESTYNY W RAKACH I GRUCZOLAKACH
GRUCZOŁU SUTKOWEGO U SUK**

PRACA DOKTORSKA

PROMOTOR: PROF. DR HAB. MARCIN NOWAK,
PROMOTOR: PROF. DR HAB. PIOTR DZIĘGIEL

WROCLAW 2023

Spis treści

Podziękowania	4
1. Wykaz skrótów	5
2. Wstęp.....	7
2.1. Nowotwory sutka u kobiet, a nowotwory gruczołów sutkowych u suk - dane statystyczne.....	7
2.2. Nowotwory gruczołu sutkowego u suk – model badań raka sutka u kobiet	7
2.3. Gruczoł sutkowy prawidłowa budowa anatomiczna i histologiczna	9
2.4. Nowotwory gruczołu sutkowego u suk – etiologia, predyspozycje i leczenie	10
2.5. Nowotwory gruczołu sutkowego u suk – klasyfikacja histologiczna	13
2.6. Klasyfikacja TNM raka gruczołu sutkowego u suk.....	15
2.7. EMT w procesie karcynogenezy raka gruczołu sutkowego	16
2.7.1. Biologiczne mechanizmy EMT.....	18
2.7.2. EMT w procesie karcynogenezy raka sutka.....	19
2.8. SOX 10.....	22
2.9. Testyna (TES).....	23
2.10. Antygen Ki-67	24
2.11. Receptor HER2.....	24
2.12. Wimentyna (VIM)	25
3. Cel pracy	26
4. Materiały i metody	27
4.1. Charakterystyka grupy badanej.....	27
4.2. Badanie histopatologiczne	29
4.3. Ocena stopnia histologicznej złośliwości.....	29
4.3.1. Ocena zajęcia naczyń krwionośnych	31
4.4. Badania immunohistochemiczne.....	31
4.4.2. Ocena ekspresji markerów komórkowych.....	34
4.5. Izolacja RNA	37
4.5.1. Izolacja całkowitego RNA za pomocą zestawu „RNeasy Mini”	38
4.5.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji za pomocą zestawu „High capacity cDNA reverse transcription kit” (Thermo Fisher Scientific).....	38
4.5.3. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR)	38
4.6. Immunoblotting	39
4.7. Mikrofotografie	39
4.8. Analiza statystyczna	39

5. Wyniki	40
5.1 Wiek i rasa pacjentów	40
5.2 Ocena histopatologiczna guzów z wykorzystaniem barwienia hematoksyliną i eozyną (H&E).....	41
5.3 Ocena stopnia złośliwości (grading, G)	41
5.4 Ocena zajęcia naczyń krwionośnych.....	41
5.5 Ocena immunohistochemiczna	42
5.5.1 Ki-67.....	42
5.5.2 HER2.....	42
5.5.3. VIM.....	43
5.5.4 SOX 10.....	44
5.5.5 Testyna	51
5.6 PCR w czasie rzeczywistym.	55
5.7 Immunoblotting	55
6. Podsumowanie wyników	57
6.1. SOX 10.....	57
6.2. TES.....	57
7. Dyskusja.....	59
8. Podsumowanie i wnioski	67
9. Streszczenie.....	68
10. Summary.....	70
11. Bibliografia	72
12. Lista tabel.....	87
13. Lista rycin	88

Podziękowania

Dziękuję moim Promotorom: prof. dr hab. Marcinowi Nowakowi oraz prof. dr hab. Piotrowi Dzięgielowi oraz pracownikom Katedry Patologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz pracownikom Katedry Morfologii i Embriologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, za udzieloną pomoc w trakcie przygotowania niniejszej pracy doktorskiej.

Pragnę również podziękować Wszystkim, bez których ta praca by nie powstała.

1. Wykaz skrótów

ASCO (ang. American Society of Clinical Oncology) – Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej

BL (ang. basal-like) – podtyp podstawny raka piersi

CAF (ang. cancer associated fibroblasts) – fibroblasty towarzyszące nowotworom

CAP (ang. College of American Pathologists) – Kolegium Patologów Amerykańskich

CMT (ang. canine mammary cancer) – rak gruczołu sutkowego u suk

CSC (ang. cancer stem cells) – nowotworowe komórki macierzyste

DFS (ang. disease-free survival) – czas przeżycia wolny od choroby

DMFS (ang. distant metastasis free survival) – czas przeżycia wolny od przerzutów odległych

EGFR (ang. epidermal growth factor receptor) – receptor czynnika wzrostu naskórka

EMT (ang. epithelial mesenchymal transition) – przejście epitelialno-mezenchymalne

ER (ang. estrogen receptor) – receptor estrogenowy

G (ang. grade) – stopień histologicznej złośliwości nowotworu

HBC (ang. human breast cancer) – rak sutka u kobiet

HER2 (ang. human epidermal growth factor receptor-2) – receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu

HMG (ang. high mobility group) – grupy o wysokiej mobilności

IDC (ang. invasive ductal carcinoma) – inwazyjny rak przewodowy

IF (ang. intermediate filaments) – filamenty pośrednie

IHC (ang. immunohistochemistry) – badanie immunohistochemiczne

LIM (ang. Lim-domain protein family) – rodzina białek LIM

LOH (ang. loss of heterozygosity) – utrata heterozygotyczności

MaSC (ang. mammary stem cells) – komórki macierzyste gruczołu sutkowego

MET (ang. mesenchymal epithelial transition) – przemiana mezenchymalno-nabłonkowa

MBC (ang. metaplastic breast cancer) – metaplastyczny rak piersi

NBL (ang. non-basal-like) – podtyp niepodstawny raka piersi

NOTCH4 (ang. Notch receptor-4) – receptor Notch 4

OS (ang. overall survival) – ogólny czas przeżycia

PBP (ang. peroxisome proliferator-activated receptor) – receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów

PCR (ang. polymerase chain reaction) – łańcuchowa reakcja polimerazy

PR (ang. progesteron receptor) – receptor progesteronowy

SOX 10 (ang. sry-like high-mobility group box-10) – białko SOX 10

TCF4 (ang. transcription factor-4) – czynnik transkrypcyjny 4

TAD (ang. transactivation domain) – domena transaktywacji

TES (ang. testin) – testyna

TGF- β (ang. transforming growth factor beta) – transformujący czynnik wzrostu beta

TNBC (ang. triple negative breast cancer) – potrójnie negatywny rak piersi

TNM (ang. tumour noduli metastasis) – system klasyfikacji TNM

VIM (ang. vimentin) – wimentyna

2. Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się coraz więcej zachorowań na nowotwory u ludzi oraz u zwierząt towarzyszących. Budzi to konieczność poszukiwania nowych metod diagnostycznych i prognostycznych. Znaczny postęp w szeroko pojętej medycynie, w tym również onkologii, pozwala na poznanie i lepsze zrozumienie procesów leżących u podłoża kancerogenezy występującej zarówno u człowieka, jak i u zwierząt. Badania eksperymentalne z wykorzystaniem modelu zwierzęcego mogą przyczynić się również do opracowania nowych metod diagnostyki onkologicznej, stworzenia nowych leków cytostatycznych oraz opracowania nowych schematów terapeutycznych zarówno w medycynie weterynaryjnej, jak i medycynie człowieka.

2.1. Nowotwory sutka u kobiet, a nowotwory gruczołów sutkowych u suk - dane statystyczne

Rak sutka (łac. *carcinoma mammae*) jest najczęstszym nowotworem występującym u kobiet, w 2020 roku było to około 2,3 miliona nowych zachorowań, co stanowiło około 11,7 % wszystkich zdiagnozowanych nowotworów (1). Guzy sutka u psów (CMT) są najczęściej diagnozowanym nowotworem u samic psa domowego, stanowiąc prawie połowę wszystkich nowotworów u psów (2) i są jednymi z najczęstszych guzów występujących u tego gatunku zwierząt domowych, zaraz po nowotworach skóry (3). W ciągu roku stwierdza się ok. 198 przypadków na 100 000 psów na świecie (4), a wskaźnik ten jest wyższy niż obserwowany u ludzi.

Rak sutka jest piątą najczęstszą przyczyną śmierci kobiet na świecie. Z tego powodu rocznie umiera na niego 685 tys. chorych (1). Najnowsze dane pokazują, że w krajach rozwiniętych, w których programy przesiewowe są bardziej dostępne, a nowotwór rozpoznany jest we wczesnym stadium rozwoju możliwy jest dobór odpowiedniej terapii celowanej, co poprawia rokowanie u pacjentów (5-7). Podobne warunki życia oraz przebieg choroby nowotworowej, a także szereg prowadzonych w tym zakresie badań, wskazują na to, iż nowotwory gruczołu sutkowego u psów są dobrym modelem badań nad rakiem sutka u kobiet (8-13).

2.2. Nowotwory gruczołu sutkowego u suk – model badań raka sutka u kobiet

W ostatnich latach zidentyfikowano liczne kliniczne i molekularne podobieństwa między rakiem sutka u kobiet HBC (ang. human breast cancer) oraz nowotworami gruczołu

sutkowego u psów (CMT) (ang. canine mammary tumor) (8-13). Częstość rozpoznawania, HBC i CMT wzrosła w ostatnich latach, prawdopodobnie z powodu coraz bardziej powszechnego dostępu do diagnostyki onkologicznej oraz zwiększonej świadomości opiekunów zwierząt domowych. Wielu autorów wskazuje podobieństwa w patogenezie raka sutka u kobiet i raka gruczołu sutkowego u samic psów, w tym etiologię hormonalną, wiek zachorowania, przebieg choroby oraz tendencję do przerzutowania. Wielu badaczy sugeruje, że gruczoł sutkowy psa jest dobrym modelem badania nad rakiem sutka u kobiet zwłaszcza potrójnie ujemnym rakiem sutka TNBC (14).

Histologicznie raki gruczołu sutkowego CMT są klasyfikowane jako złośliwe zmiany nabłonkowe. W celu diagnozy określa się typ histologiczny nowotworu oraz histologiczne cechy złośliwości takie jak zdolność do tworzenia cewek, pleomorfizm jąder komórkowych oraz liczba figur podziału mitotycznego w polu widzenia w mikroskopie. W rutynowej praktyce lekarsko-weterynaryjnej nie stosuje się oznaczenia receptorów estrogenowego ER (ang. estrogen receptor), progesteronowego PR (ang. progesterone receptor), receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (ang. epidermal growth factor receptor) w tym typu 2 HER2 (ang. human epidermal growth factor receptor 2), jednak w badaniu zaproponowanym przez Abadie i wsp. (11) podjęto się klasyfikacji wg oznaczania wyżej wspomnianych receptorów na grupie 350 raków sutka u psów oraz zakwalifikowano je jako luminalny A (14,3%), luminalny B (9,4%), bez nadekspresji HER2 i potrójnie negatywne TNBC (ang. triple negative breast cancer) (76,3%) albo typu podstawnego BL (ang. basal-like; ER- i PR-, HER2 i/lub CK5/6+) (58,6%) lub typu niepodstawnego NBL (ang. non-basal like; ER- i PR-, HER2 i CK5/6-) (17,7%) (15).

Psy są zatem dobrym modelem badawczym, który może posłużyć do testowania nowych metod terapeutycznych, szczególnie w przypadku potrójnie ujemnego raka sutka u ludzi. Im i wsp. wykazali, że rak prosty cewkowy oraz rak złożony i mieszany były często klasyfikowane jako luminalny A, podczas gdy rak lity był często klasyfikowany jako typ podstawny (16).

Ze względu na wysoki koszt badań opartych na profilowaniu genów, nie są one standardowo wykorzystywane w praktyce klinicznej medycyny człowieka, jak również medycyny weterynaryjnej, a rutynowa klasyfikacja histopatologiczna poszczególnych typów raka jest dokonywana głównie przy pomocy badań immunohistochemicznych (IHC) (17). W przypadku raka sutka opiera się głównie na wykrywaniu ekspresji receptora estrogenowego (ER), receptora progesteronowego (PR), receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu

2 (HER2) i markera proliferacji Ki-67 (18-21). Różne wzorce ekspresji tych biomarkerów zapewniają prosty system klasyfikacji klinicznej a także pozwalają na określenie możliwych do zastosowania metod terapeutycznych (22-23). Tabela I przedstawia i porównuje najczęściej występujące parametry u pacjentów w medycynie człowieka i w weterynarii (24).

Tabela I. Podobieństwa między rakiem sutka u kobiet, a rakiem gruczołu sutkowego u suk, na podstawie Abdelmegeed 2018 (24).

Parametr	Człowiek	Pies
występowanie	spontaniczne	spontaniczne
wiek zachorowania	62 lata mediana wieku	~10,5 lat (10,5-letni pies, odpowiednik 65,5-letniej pacjentki)
przebieg choroby	identyczny u człowieka i psa	identyczny u człowieka i psa
wielkość guza	podobny u człowieka i psa	podobny u człowieka i psa
przerzuty do węzłów chłonnych	identyczne u ludzi i psów	identyczne u ludzi i psów
najczęstszy spontaniczny nowotwór złośliwy	nowotwór sutka	nowotwór sutka
zależność od estrogenów	długa ekspozycja na estrogen zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworu	psy niekastrowane mają czterokrotnie większe ryzyko wystąpienia nowotworu niż psy wykastrowane w wieku poniżej 2 lat
najczęstszy typ histologiczny	inwazyjny rak przewodowy IDC (ang. invasive ductal carcinoma)	złośliwe zmiany nowotworowe pochodzenia nabłonkowego
markery molekularne	zidentyfikowano kilka genów odgrywających kluczową rolę w karcynogenezie guzów sutka	zidentyfikowano kilka genów odgrywających kluczową rolę w karcynogenezie guzów sutka
nieprawidłowości stwierdzone podczas badania mammograficznego	nowotwór sutka psa i człowieka ma podobne mikrozwapnienia i makrozwapnienia	nowotwór sutka psa i człowieka ma podobne mikrozwapnienia i makrozwapnienia

2.3. Gruczoł sutkowy prawidłowa budowa anatomiczna i histologiczna

U samic psów sutek (*mamma*) składa się z dziesięciu gruczołów sutkowych (*glandulae mammae*), które leżą symetrycznie w dwóch szeregach po obu stronach ciała. Noszą one nazwy związane z ich położeniem (tj. gruczoły piersiowe, brzuszne doczaszkowe, brzuszne doogonowe i pachwinowe). Każdy gruczoł składa się z pięciu do dwunastu płatów gruczołu sutkowego (*lobi glandulae mammae*), którym odpowiada odpowiednia liczba przewodów brodawkowych (*ductus papillares*) otwierających się na szczycie brodawki sutkowej (*papilla*

mammae) oddzielnymi ujściami. Liczba gruczołów sutkowych może być zmienna i wynosić od ośmiu do dwunastu (25).

Gruczoły sutkowe nie produkujące mleka, mają krótką brodawkę, w czasie laktacji ilość tkanki gruczołowej zwiększa się, jest to zmienne osobniczo i może zależeć również od rasy psa. Zmiany zachodzące podczas cyklu jajnikowego wpływają również na gruczoł sutkowy. Obejmuje on wzrost i namnażanie się komórek, nawet w przypadku, gdy samica nie zachodzi w ciążę. Ciągłe zmiany hormonalne, powiększenie a następnie involucja gruczołu, predysponuje do wystąpienia nowotworów w tej lokalizacji (26).

Gruczoł sutkowy pod względem histologicznym, jest zmodyfikowanym apokrynowym gruczołem skóry, cewkowo-pęcherzykowym. W obrazie mikroskopowym wyróżniamy: komórki nabłonkowe, komórki mioepitelialne (mięśniowo-nabłonkowe), których skurcz kieruje wydzielinę gruczołową w kierunku przewodów wyprowadzających. Nabłonek gruczołu sutkowego spoczywa na błonie podstawnej zbudowanej z kolagenu typu IV, lamininy, nidogenu oraz proteoglikanu siarczanu heparyny (25-26). Zrąb gruczołu sutkowego tworzy tkanka łączna wiotka i włóknista (zbita), tkanka tłuszczowa, naczynia krwionośne oraz chłonne, a także włókna i zakończenia nerwowe.

Gruczoł sutkowy jest narządem który ulega bardzo dynamicznym przemianom. W okresie dojrzewania i cyklu płciowym przechodzi głębokie zmiany dotyczące morfologii nabłonka gruczołowego (26). Zmiany te są napędzane przez dedykowane komórki progenitorowe i macierzyste. W dorosłej tkance gruczołowej zidentyfikowano zarówno komórki prekursorowe oraz komórki macierzyste sutka MaSC (ang. mammary stem cells), będące pulą komórek multipotencjalnych. Różnorodność wśród populacji komórek macierzystych i progenitorowych nabłonka sutka prawdopodobnie wpływa na heterogeniczność charakteryzującą raka gruczołu sutkowego (27).

2.4 Nowotwory gruczołu sutkowego u suk – etiologia, predyspozycje i leczenie

Nowotwory gruczołu sutkowego u samic psów są zaraz po nowotworach skóry, najczęściej występującymi zmianami nowotworowymi u tego gatunku zwierząt (28). Jest to heterogenna grupa nowotworów, które jak wspomniano wcześniej w niniejszej pracy, mają wiele cech wspólnych z ludzkim rakiem sutka. Podobieństwa te obejmują etiologię, klasyfikację histologiczną i kliniczną oraz podobną aktywację szlaków sygnałowych w procesie karcynogenezy (11,29). Na wystąpienie nowotworu najbardziej narażone są suki niesterylizowane lub sterylizowane w późnym wieku (29). Zabieg owariohisterektomii może

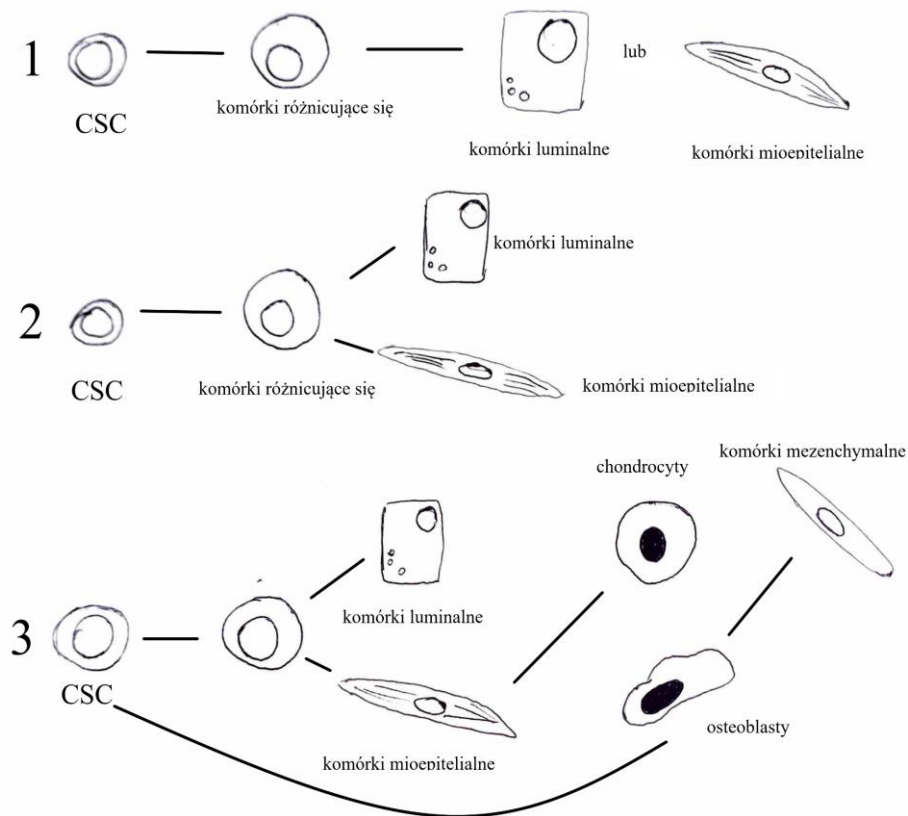
służyć jako metoda prewencji wystąpienia zmian w gruczole sutkowym w przyszłości, a przeprowadzenie go przed pierwszą rują, redukuje możliwość ich wystąpienia do 0,05%, oraz odpowiednio o 8 i 26% w kolejnych cyklach jajnikowych (30). Ciągłe zmiany na tle hormonalnym, cykliczny przerost i inwolucja gruczołu, predysponują do wystąpienia różnych patologii w tym nowotworów. Najbardziej narażone na pojawienie się zmian nowotworowych są gruczoły brzuszne i pachwinowe. (4. i 5. para). Diagnozowane są zarówno pojedyncze guzy, jak i nowotwory rozsiane w wielu gruczołach w obrębie jednej lub obu stron ciała (31-32).

Część badań wskazuje na genetyczną predyspozycję poszczególnych ras psów do wystąpienia guzów gruczołu sutkowego. Wśród najczęściej wymienianych ras zalicza się przede wszystkim przedstawicieli ras małych i miniaturowych, takich jak pudle miniaturowe, jamniki, maltańczyki, yorkshire terriery, cocker spaniele, zaś wśród ras dużych są to owczarki niemieckie, doberman, setery angielskie, angielskie springer spaniele, bokser (33).

Nowotwory gruczołu sutkowego charakteryzują się skłonnością do tworzenia przerzutów (*metastases*). Miejscami predylekcyjnymi są przede wszystkim okoliczne węzły chłonne oraz płuca. Rzadko przerzuty stwierdzane są w kościach oraz w nerkach, sercu, nadnerczach, wątrobie czy skórze. (34-36). Leczenie onkologiczne oparte jest przede wszystkim na chirurgicznym usunięciu zmian (lumpectomia, hemimastektomia) lub radykalnym postępowaniu polegającym na usunięciu całej listwy mlecznej wraz z przynależnymi węzłami chłonnymi (mastektomia) (37-38). Dobra znajomość zlewiska chłonki dla każdego z kompleksów sutkowych jest ważna klinicznie. Chłonka z gruczołu piersiowego odprowadzana jest do węzłów chłonnych pachowych oraz węzłów chłonnych szyjnych powierzchownych. Z gruczołów brzusznych doczaszkowych do węzłów chłonnych pachowych lub pachwinowych powierzchownych, natomiast gruczoły brzuszne doogonowe, do węzłów chłonnych biodrowych przyśrodkowych (39-40).

W zależności od stanu klinicznego psa oraz wyniku badania histopatologicznego usuniętej zmiany nowotworowej, podejmuje się lub nie decyzję o terapii adjuwantowej polegającej na chemioterapii i/lub radioterapii (41). Wstępne rozpoznanie oraz zakres działań terapeutycznych może być zaplanowany w oparciu o wynik badania biopsyjnego (BAC: biopsja aspiracyjna cienkoigłowa), jednak ostateczne rozpoznanie stawiane jest w trakcie analizy obrazu preparatów histologicznych (42). Gdy postawienie rozpoznania tą drogą jest utrudnione, stosuje się identyfikację markerów nowotworowych w badaniu immunohistochemicznym (IHC), a badanie to pozwala również w wielu przypadkach pomóc w doborze terapii, w tym terapii celowanej oraz umożliwia określenie rokowania.

Procesy kancerogenezy mogą obejmować zarówno komórki nabłonkowe, jak i komórki podścieliska (9-15). W obrazie mikroskopowym guzów gruczołu sutkowego obserwujemy dużą różnorodność komórek nowotworowych, stąd w klasyfikacji histologicznej wyróżniamy różne typy nowotworów (9-10,15). Większość diagnozowanych u suk nowotworów gruczołu sutkowego ma pochodzenie nabłonkowe, jednak występują również guzy pochodzące z komórek mioepitelialnych, z komórek podścieliska oraz guzy o charakterze mieszanym (2-5, 8-10,15). W najnowszych badaniach dotyczących histogenezy poszczególnych nowotworów zaproponowano hipotezę rozwoju guza w nowotwory typu prostego, typu złożonego i raka mieszanego w obrębie gruczołu sutkowego psa (rycina 1):



Ryc 1. Ilustracja prezentująca proliferację poszczególnych komórek w zależności od typu histologicznego raka sutka (opracowanie własne).

(1) w guzach typu prostego nowotworowe komórki macierzyste CSC (ang. cancer stem cells) różnicują się w nowotworowe komórki luminalne lub komórki mioepitelialne;

- (2) w nowotworach typu złożonego CSC różnicują się zarówno w nowotworowe komórki luminalne, jak i komórki mioepitelialne;
- (3) w guzach mieszanych CSC różnicują się w nowotworowe komórki luminalne i mioepitelialne, a następnie różnicują się w nowotworowe chondrocyty i osteoblasty. Alternatywnie lub dodatkowo, CSC mogą bezpośrednio różnicować się w chondrocyty lub osteoblasty. Inną możliwością jest to, że komórki zrębowe (mezenchymalne) obecne w tkance gruczołu sutkowego (lub mobilizowane ze szpiku kostnego) różnicują się w chondrocyty lub osteoblasty. Zatem guzy składają się z nowotworowych komórek luminalnych i mezenchymalnych z obecnością lub nie, komórek mioepitelialnych (43).

2.5. Nowotwory gruczołu sutkowego u suk – klasyfikacja histologiczna

Do określenia typu histologicznego badanych guzów wykorzystano aktualnie obowiązującą w 2011 roku klasyfikację wg Goldschmidt i wsp. (44).

Tabela II. Klasyfikacja histologiczna nowotworów gruczołu sutkowego (za Goldschmidt, 2011).

Nowotwory gruczołu sutkowego pochodzenia nabłonkowego
Rak miejscowy
Raki proste
<ul style="list-style-type: none"> a. cewkowe b. cewkowo-brodawkowate c. torbielowato- brodawkowy d. sitowaty
Rak mikrobrodawkowaty inwazyjny
Rak lity
Rak czopiasty
Rak anaplastyczny
Rak powstający w złożonym gruczolaku/guzie mieszanym
Rak typ złożony
Rak i złośliwa mioepithelioma
Rak typ mieszany
Rak przewodowy

Wewnątrzprzewodowy rak brodawkowy
Złośliwe nowotwory nabłonkowe — szczególne typy
Rak kolczystokomórkowy
Rak gruczolakowaty
Rak śluzowy
Rak bogaty w lipidy
Raki wrzecionowatokomórkowe
Złośliwa forma myoepithelioma
Rak płaskonabłonkowy – wariant komórek wrzecionowatych
Wariant komórek rakowo-wrzecionowatych
Rak zapalny
Złośliwe nowotwory mezenchymalne — mięsaki
Kostniakomięsak
Chrzęstniakomięsak
Włókniakomięsak
Naczyniakomięsak
Inne mięsaki
Nowotwory łagodne
Gruczolak – proste
Gruczolak brodawkowy wewnątrzprzewodowy (brodawczak przewodowy)
Gruczolak przewodowy (gruczolak podstawnokomórkowy)
Ze zróżnicowaniem płaskonabłonkowym
Gruczolakowłókniak
Mioepitelioma
Złożony gruczolak (adenomyoepithelioma)
Łagodny guz mieszany

2.6 Klasyfikacja TNM raka gruczołu sutkowego u suk

W celu oceny stopnia zaawansowania klinicznego choroby oraz ustalenia rokowania u chorych zwierząt stosuje się klasyfikację zgodną z systemem zaadaptowanym z medycyny człowieka – TNM (ang. tumour noduli metastasis). System ten opiera się na ocenie wielkości guza pierwotnego T (łac. *tumor*), badaniu okolicznych węzłów chłonnych N (łac. *noduli*) oraz wystąpieniu przerzutów odległych M (łac. *metastasis*). (42,46) W tabeli III zamieszczono schemat klasyfikacji TNM.

Tabela III. Schemat klasyfikacji stadium/stopnia zaawansowania klinicznego nowotworów gruczołu sutkowego u suk (klasyfikacja TNM) na podstawie opracowania Owen i wsp. (46).

T – guz pierwotny
T1 Największa średnica guza <3 cm
T2 Największa średnica guza 3–5 cm
T3 Największa średnica guza >5 cm
N – regionalne węzły chłonne
N0 Brak dowodów na obecność przerzutów do węzłów
N1 Przerzuty do węzłów chłonnych
M – przerzuty odległe
M0 Brak dowodów na przerzuty odległe
M1 Obecność przerzutów odległych
Stadium zaawansowania klinicznego TNM
1 T1 N0 M0
2 T2 N0 M0
3 T3 N0 M0
4 Każdy T N1 M0
5 Każdy T Każdy N M

W wielu badaniach analizowano wartość rokowniczą systemu TNM, wykazując iż wzrost stopnia zaawansowania nowotworu wiąże się z niekorzystnym rokowaniem. Ze względu na złożoność procesu onkogenezy, system TNM nie zawsze okazuje się wystarczający by określić rokowanie (47). Z tego względu stosowane są badania z zakresu

immunohistochemii oraz badania molekularne, celem ustalenia podtypu molekularnego zmian nowotworowych (48).

2.7. EMT w procesie karcynogenezy raka gruczołu sutkowego

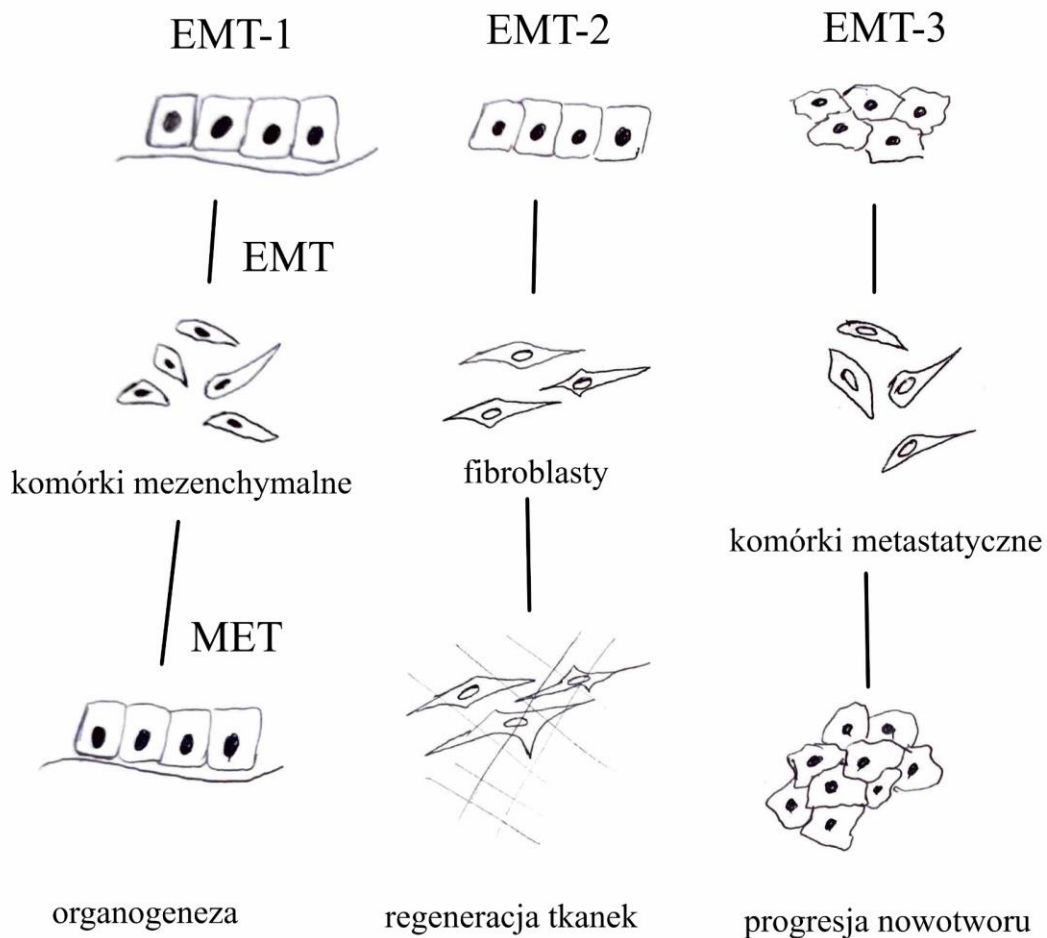
Karcynogeneza jest skomplikowanym procesem, w którym mechanizmy odpowiedzialne za podział zdrowych komórek oraz zaprogramowaną śmierć komórki zostają zaburzone. Jednym z procesów biorących udział w rozroście komórek nowotworowych jest tzw. przekształcenie epitelialno-mezenchymalne (EMT; ang. epithelial mesenchymal transition), gdzie komórki tracą swoją zorganizowaną strukturę, dochodzi do przerwania ich połączeń międzykomórkowych, zdobywają one zdolność do migracji (49).

Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna (EMT) jest procesem fizjologicznym, biorącym udział w rozwoju prenatalnym i organogenezie oraz procesach naprawczych tkanek. Może również odgrywać istotną rolę w procesie nowotworzenia, jak również tworzeniu przerzutów nowotworowych (49-52).

Komórka nabłonkowa zachowuje biegunowość wierzchołkowo-podstawną i kontakt z sąsiednimi komórkami przez połączenia przylegające, połączenia ścisłe i desmosomy. Komórki mezenchymalne natomiast są oddzielone od siebie macierzą zewnątrzkomórkową, nie posiadają blaszki podstawnej oddzielającej je od sąsiednich tkanek i nie mają charakterystycznej biegunowości wierzchołkowo-podstawno-bocznej, jak komórki nabłonkowe.

Greenburg i Hay jako pierwsi wykazali, że w procesie EMT komórki nabłonkowe tracą swoją polarność oraz nabywają cech komórek mezenchymalnych, i nazwali to zjawisko „transformacją nabłonkową w mezenchymalną” (53).

Przejścia nabłonkowo-mezenchymalne (EMT) czyli nabywanie cech mezenchymalnych przez komórki nabłonkowe zachodzą podczas niektórych procesów biologicznych. EMT jest procesem fizjologicznym koniecznym do prawidłowego rozwoju embrionalnego. Aktywacja EMT może również wystąpić w stanach patologicznych takich jak włóknienie narządów lub progresja choroby nowotworowej. Ze względu na różne konteksty biologiczne oraz konsekwencje procesu EMT wyróżniono trzy jego typy (rycina 2) (54).



Ryc 2. Ilustracja prezentująca trzy typy EMT. MET (ang. mesenchymal epithelial transition) przemiana mezenchymalno-nabłonkowa (opracowanie własne).

Podtyp I EMT (rozwojowy) odgrywa zasadniczą rolę w procesie embriogenezy, organogenezy i morfogenezy tkanek organizmów wielokomórkowych. Co więcej, EMT odbywa się także w późniejszych etapach rozwojowych. Ma wpływ na formowanie się zastawek serca, tworzenie zrębu podniebienia twardego, zanik przewodów przyśródniczych (daw. przewodów Müllera) u samców (55). Ponadto przemijające, podobne procesy jak w przebiegu EMT typu I zaobserwowano podczas rozwoju gruczołu sutkowego, a dokładniej podczas formowania się rozgałęzień przewodów mlecznych (56).

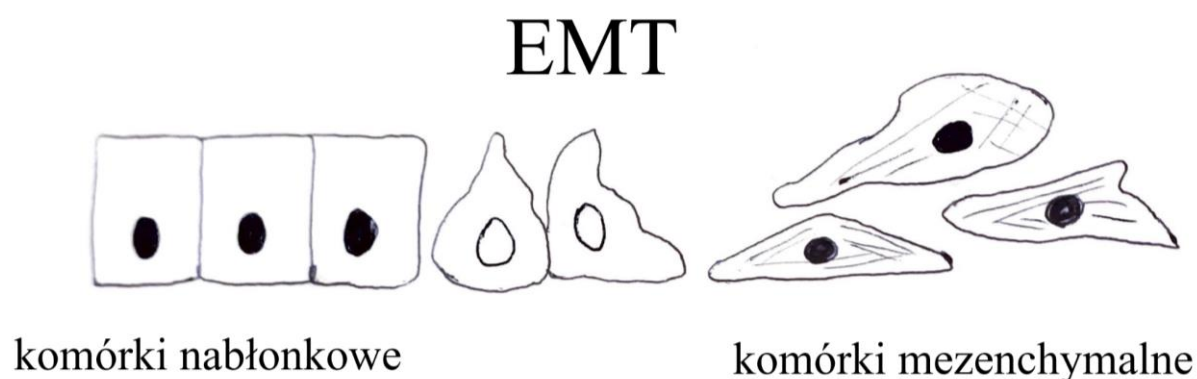
Podtyp II EMT odpowiada za utrzymanie homeostazy tkanek, dzięki zdolności do

indukcji ich regeneracji oraz przebudowy w przypadku zadziałania czynników szkodliwych. Głównie opisywany jest podczas procesów zapalnych, w których cytokiny prozapalne indukują przejście nabłonkowo-mezenchymalne. Ustanie działania czynnika uszkodzającego tkankę powoduje zatrzymanie transformacji EMT. Stałe narażenie komórek i tkanek na niekorzystne czynniki może powodować ciągłą aktywację EMT prowadząc do zwłóknienia i niewydolności narządów (57).

Podtyp III EMT jest ściśle związany z progresją wielu nowotworów złośliwych. W odróżnieniu od dwóch pierwszych typów, które przebiegają w komórkach prawidłowych, typ III jest konsekwencją genetycznych nieprawidłowości inicjujących powstanie procesu nowotworowego (58,59).

2.7.1. Biologiczne mechanizmy EMT

Zdarzenia występujące podczas EMT obejmują utratę połączeń międzykomórkowych oraz utratę przez komórki ekspresji cytokeratyn i E-kadheryny – markerów specyficznych dla nabłonka, a nabywaniem cech komórek mezenchymalnych takich jak ekspresja N- kadheryny oraz wimentyny. Wraz ze zmianą fenotypu komórek, zwiększa się ich zdolność do inwazji – tendencja do angioinwazji oraz do rozprzestrzeniania się komórek w organizmie, powodując powstawanie zmian przerzutowych (60). Przykłady markerów nabłonkowych oraz mezenchymalnych oraz fenotyp komórek przedstawiono na rycinie 3 i w tabeli IV.



Ryc 3. Ilustracja prezentująca fenotyp komórek ulegającym procesowi EMT (opracowanie własne).

Tabela IV. Tabela prezentuje markery procesu EMT.

Markery EMT	
Wzrost ekspresji	Spadek ekspresji
N- kadheryna	E- kadheryna
wimentyna	cytokeratyna
fibronektyna	okludyna
MMP-2, MMP-3, MMP-9	
SOX 10	

2.7.2. EMT w procesie karcynogenezy raka sutka

Zmiany EMT wpływają również na oporność na standardowe metody terapii nowotworowej. Przykładem opornych na leczenie nowotworów, mogą być rak podstawny oraz rak metaplastyczny (MBC; ang. metaplastic breast cancer), oba te podtypy raka sutka charakteryzują się niską ekspresją genów zaangażowanych w adhezję komórka-komórka, wykazują ekspresję markerów komórek macierzystych oraz EMT (61).

Ciekawą zdolnością procesu EMT jest to, że jest potencjalnie odwracalny w dowolnym momencie, wystarczy że dojdzie do zmiany ekspresji kluczowych składników molekularnych (np. cytokin). W związku z tym ostatnie badania wykazały, że przejście mezenchymalno-nabłonkowe (MET ang. mesenchymal–epithelial transition), odwrotny program EMT, obserwuje się w fibroblastach podczas wytwarzania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych. Dalsze badania wykazały, że wprowadzone do komórek nowotworowych czynniki przeprogramowujące są w stanie osłabić ich złośliwość, umożliwiając im odzyskanie właściwości nabłonkowych w procesie MET. Zmiany fenotypu komórek między stanem nabłonkowym i mezenchymalnym są częścią procesu progresji nowotworu, który prowadzi do rozprzestrzeniania się komórek nowotworowych w postaci przerzutów. Przejście nabłonkowo mezenchymalne jest niezbędne do uzyskania zdolności do migracji i inwazji (62-65).

Otwiera to potencjalne nowe możliwości, ponieważ dogłębnie analizując wszystkie ścieżki zaangażowane w proces EMT, możemy odkryć nowe biomarkery i środki terapeutyczne dla najbardziej agresywnych guzów sutka. Badania wykazały, że rak podstawny sutka u kobiet, który jest związany z cechami mezenchymalnymi, jest najbardziej złośliwym podtypem (66-68). Sposób utrzymywania fenotypu mezenchymalnego jest przedmiotem

intensywnych badań w medycynie człowieka i w medycynie weterynaryjnej. W procesie EMT w raku sutka uczestniczą zarówno endogenne, jak i egzogenne sygnały. Główne szlaki endogenne obejmują szlaki kierowane przez TGF- β , Notch, Wnt, Hedgehog i receptorowe kinazy tyrozynowe (69).

Szczególnie interesujące są interakcje molekularne i analiza sygnalizacji, które są wymagane w procesach karcynogenezy w celu zapewnienia właściwości progenitorowych nowotworowych komórek macierzystych (CSC, ang. cancer stem cells), wystąpienia przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT), inwazji komórek, różnicowania komórek i apoptozy (69-70).

Czynnik transkrypcyjny SOX 10 może odgrywać rolę regulacyjną w komórkach nabłonka gruczołu sutkowego. Stwierdzono, że wyciszenie SOX 10 obniża aktywność progenitorową, podczas gdy ektopowa aktywacja SOX 10 może indukować proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). SOX 10 reguluje szlak sygnałowy Wnt/ β katenina (71-77). Nadekspresja SOX 10 działa jak onkogen poprzez aktywację szlaku sygnałowego Wnt/ β -kateniny m.in. w raku wątrobowokomórkowym (71-72). Aktywacja szlaku Wnt/ β -kateniny bierze również udział w powstawaniu nowotworów gruczołu piersiowego u kobiet. Podczas procesu karcynogenezy czynniki SOX działają jako czynniki transkrypcyjne (77).

Innym szlakiem odgrywającym rolę w procesie nowotworzenia jest szlak sygnalizacyjny Notch. Aktywacja tego szlaku może sprzyjać rozwojowi i progresji wielu nowotworów. W gruczole piersiowym SOX 10 odgrywa rolę we wzroście komórek nabłonka sutka *in vitro*, w których pośredniczy NOTCH4 (Notch Receptor 4) i PBP (ang. peroxisome proliferator-activated receptor) (78).

Podczas procesu EMT biologia i struktura komórek nabłonkowych zostaje zamieniona na cechy charakterystyczne dla komórek mezenchymalnych, tj. komórki tracą swoją polarność, zdolność do adhezji, tracą połączenia międzykomórkowe i zyskują właściwości migracyjne i inwazyjne. Niedawno wykazano, iż gen *TES* może być genem supresorowym w nowotworach złośliwych m.in.: raku jajnika, macicy oraz raku sutka u kobiet (79-83). Stwierdzono, że domeny w białku testynie odgrywają ważną rolę w adhezji komórek (84). testyna może wchodzić w interakcje z białkami cytoszkieletu a razem odgrywają znaczącą rolę w ruchliwości i adhezji komórek. Utrata ekspresji testyny zwiększa mobilność komórek. Na podstawie dostępnego piśmiennictwa można przypuszczać, iż testyna może mieć kluczowe znaczenie dla migracji i inwazji komórek oraz przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) (85). Zaobserwowano obniżenie poziomu genu *TES* przy zmniejszonej ekspresji markera

nabłonkowego – E-kadheryny i zwiększonej ekspresji markerów mezenchymalnych: N-kadheryny, wimentyny w przypadku raka szyjki macicy. Analiza immunohistochemiczna (IHC) wykazała zmniejszoną ekspresję testyny w przypadkach raka endometrium w porównaniu z sąsiadującą tkanką prawidłową. Zmniejszona ekspresja testyny korelowała z wyższym stopniem zaawansowania zmiany nowotworowej. W badaniach prowadzonych na nowotworach sutka u kobiet również stwierdzono iż niski poziom testyny koreluje z wyższymi stopniami złośliwości histologicznej i jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym (86). Zhu i wsp. (87) wykazali korelację między niską ekspresją genu *TES* a skróconymi wskaźnikami prognostycznymi m.in. czasem wolnym od choroby, czasem bez przerzutów odległych i czasem przeżycia całkowitego. Obecność ekspresji markerów EMT istotnie korelowała ze złym rokowaniem i inwazyjnością komórek nowotworowych. Immunoekspresja testyny była różna w różnych stadiach klinicznych i stopniach histologicznych.

Ostatnie doniesienia wskazują na znaczenie testyny oraz SOX 10 w wielu procesach nowotworowych, w tym w raku sutka u kobiet. Szczególne znaczenie odnotowano w przypadku raka potrójnie negatywnego TNBC. Rak ujemny pod względem receptorów ER, PR oraz HER2 jest molekularnym odpowiednikiem różnych podtypów histologicznych raków gruczołu sutkowego u samic psów (14).

Przejście nabłonkowo mezenchymalne jako jeden z elementów powstawania, jak również rozprzestrzeniania się nowotworu jest ważne z punktu widzenia klinicznego. Medycyna człowieka oraz medycyna weterynaryjna wymaga tego, aby poszukiwać nowych markerów, odpowiedzialnych za poszczególne etapy choroby nowotworowej, więc badanie poziomu ich ekspresji może przyczynić się do opracowania celowanych strategii terapeutycznych. Z tego względu moje zainteresowania naukowe skierowałam na raka gruczołu sutkowego, który jest dobrym modelem raka sutka u człowieka oraz na dwa białka testynę i SOX 10, których udział w onkogenezie jest opisywany w potrójnie negatywnym raku sutka u kobiet. Jest to szczególny typ nowotworu, najtrudniejszy pod względem diagnostyki i terapii. Złośliwe zmiany nowotworowe pochodzenia nabłonkowego gruczołu sutkowego u psów są uznawane za molekularne „odbicia lustrzane TNBC” u kobiet. Badania przeprowadzone na psach, mogą służyć lepszemu poznaniu procesów biorących udział w karcynogenezie oraz pozwolić na opracowanie nowych terapii w tym celowanych.

2.8. SOX 10

Białko SOX 10 należy do, rodziny czynników transkrypcyjnych (ang. sry-like high-mobility group box (SOX)) i lokalizuje się na chromosomie 23. SOX 10 składa się z 466 aminokwasów. Podobnie jak inne białka z rodziny SOX E, posiada N-końcową domenę dimeryzacji (DIM), domenę grupy o wysokiej mobilności (HMG; ang. high mobility group) zawierającą 79 reszt aminokwasowych, działającą jako miejsce wiązania DNA oraz domeny transaktywacyjne. Zarówno domena transaktywacji TAD (ang. transactivation domain) oraz HMG są niezbędne do interakcji z innymi białkami m.in. p53 (88-92), które zaangażowane są w wiele procesów biologicznych, m.in. embriogenezę, rozwój narządów, determinację płci, powstawanie mięśni szkieletowych, mieszków włosowych, hematopoezę, neurogenezę oraz rozwój grzebienia nerwowego (głównie melanocytów, oligodendrocytów, komórek glejowych) (88). SOX 10 może działać jako aktywator transkrypcji po utworzeniu kompleksów białkowych z innymi białkami. Proteina ta działa jako nukleocytoplazmatyczne białko wahadłowe i jest ważne dla rozwoju grzebienia nerwowego i obwodowego układu nerwowego. Mutacje w genie kodującym SOX 10 są związane z chorobą Waardenburg-Shah i Waardenburg-Hirschsprunga (93-94).

Ekspresję SOX 10 wykazano w wielu różnych komórkach i tkankach prawidłowych, w tym w komórkach Schwanna, melanocytach naskórka, oligodendrocytach kory mózgowej, komórkach tucznych, komórkach mioepitelialnych gruczołów oskrzelowych, gruczołów ślinowych oraz gruczole sutkowym oraz odpowiadających im nowotworach (88,95). W patologii onkologicznej służył pierwotnie do identyfikacji czerniaków (96-98). W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie poświęca się białkom z rodziny SOX, szczególnie w dziedzinie onkologii, zarówno onkologii człowieka, jak i onkologii weterynaryjnej. Intensywnie badano funkcje, jakie odgrywają czynniki SOX podczas proliferacji komórek, migracji, inwazji i przerzutów nowotworu w różnych typach nowotworów. Ekspresja SOX 10 została do tej pory opisana w guzach pochodzenia mioepitelialnego oraz w rakach pęcherza moczowego, żołądka, raku wątrobowokomórkowym, raku nosogardzieli, jajnika, prostaty, a także guzach gruczołów ślinowych oraz piersi (98-111). SOX 10 ulega silnej ekspresji w pierwotnych rakach sutka, głównie w typie podstawnym i niesklasyfikowanym potrójnie negatywnym raku piersi TNBC (112-113). SOX 10 i poziom jego ekspresji jest ściśle powiązany z progresją nowotworu i złym rokowaniem w przypadku wielu zmian onkologicznych.

Dokładny mechanizm działania SOX 10 nie jest do końca znany, aczkolwiek wiele

danych wskazuje na jego rolę w powstawaniu i rozprzestrzenianiu się nowotworów. Omówiono różne wzorce ekspresji i sprzeczne role SOX w progresji nowotworzenia (114). Oprócz amplifikacji genomu, zmiany poziomu SOX (mRNA i/lub białka) przypisuje się czynnikom transkrypcyjnym poprzedzającym transkrypcję. Ponadto mikroRNA pełni bardzo ważną rolę w regulacji ekspresji SOX i związanej z nią aktywności transkrypcyjnej. Szczególnie interesujące są interakcje molekularne i analiza sygnalizacji, które są konieczne w różnych procesach karcynogenezy w celu zapewnienia właściwości progenitorowych nowotworowych komórek macierzystych, wystąpienia przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego, inwazji komórek, różnicowania komórek i apoptozy (115-116).

2.9. Testyna (TES)

Testyna jest białkiem o masie 47 kDa, złożonym z 421 aminokwasów, kodowanym przez gen *TES* zlokalizowany w miejscu wrażliwym FRA7G w pozycji 7q31.2 (117). Jest członkiem rodziny białek domeny LIM, które są składowymi cytoszkieletu odpowiedzialnymi za interakcje białko-białko i koordynację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Wyróżniamy trzy domeny LIM (Lin1-1, Isl-1, Mec-3). Każda z nich składa się z dwóch palców cynkowych (118). Wykazano, że części N- i C-końcowe mogą ze sobą oddziaływać, dzięki czemu testyna może wchodzić w interakcje z innymi białkami cytoszkieletu, takimi jak zyklyna, talin, paksylina, VASP (119). Razem odgrywają znaczącą rolę w adhezji i mobilności komórek (120). Sugeruje to, że testyna wydaje się mieć kluczowe znaczenie w regulacji migracji, inwazji i procesie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). Zmniejszona ekspresja testyny wiąże się również z utratą przez komórki morfologii nabłonka oraz nabyciem przez komórki właściwości migracyjnych i inwazyjnych. Ekspresja testyny dodatnio koreluje z odsetkiem komórek w fazie G1, podczas gdy nadekspresja może indukować apoptozę i zmniejszać zdolność tworzenia kolonii. Ekspresję testyny obserwuje się w prawie wszystkich prawidłowych tkankach ludzkich (121), ale zmniejszoną ekspresję testyny stwierdzono w wielu ludzkich nowotworach złośliwych. W onkologii człowieka obniżenie poziomu ekspresji testyny obserwowano w nowotworach złośliwych jajnika, płuc, żołądka, głowy i szyi oraz sutka (123-129). Dokładny wpływ na kancerogenezę pozostaje nieznanym, ale w niektórych badaniach wykazano, że obniżony poziom testyny zwiększa mobilność komórek (130). Niektórzy autorzy wskazują hipermetylację genu jako główny czynnik, ale utrata heterozygotyczności (LOH; ang. loss of heterozygosity) może również odgrywać ważną rolę.

W raku sutka u kobiet ekspresja testyny była obniżona w 74,7% badanych próbek (131). Znaczące obniżenie poziomu testyny zaobserwowano w podtypienpotrójnie ujemnym i

luminalnym B. Niski poziom testyny koreluje z wyższymi stopniami złośliwości i aspektami kliniczno-patologicznymi, takimi jak skrócone wskaźniki przeżycia, czas wolny od przerzutów odległych (DMFS; ang. distant metastasis free survival) oraz całkowite przeżycie (OS; ang. overall survival) w medycynie człowieka.

W wielu badaniach wykazano, że testyna uczestniczy w procesach progresji nowotworu, takich jak wzrost guza, angiogeneza i przerzuty (132). Wielu badaczy twierdzi, że poznanie molekularnych funkcji testyny może mieć kluczowe znaczenie w opracowaniu spersonalizowanego leczenia (133).

2.10 Antygen Ki-67

Antygen Ki-67 jest białkiem, w którym wyróżniamy 2 izoformy o masie 320 i 350 kDa wyizolowanym jako antygen w jądrach komórek chłoniaka Hodgkina. Antygen Ki-67 jest białkiem uznanym za marker proliferacji komórek i parametr ten jest wykorzystywany do oceny rokowania w przypadku wielu procesów rozrostowych. Ekspresję Ki-67 stwierdzono w komórkach podczas fazy G1 cyklu komórkowego, która wzrastała następnie w fazie S i G2. Najwyższy poziom ekspresji występuje w fazie M cyklu komórkowego (134-136). W fazie G0 nie stwierdzono ekspresji markera Ki-67. Z tego powodu białko to znalazło szerokie zastosowanie diagnostyczne w różnych typach nowotworów.

Ekspresja białka Ki-67 koreluje dodatnio z rozmiarem guza, przerzutami oraz skróconym czasem przeżycia u kobiet z nowotworem sutka. Ekspresja markera Ki-67 dodatnio koreluje ze stopniem zaawansowania złośliwości histologicznej, wielkością guza, obecnością zmian przerzutowych oraz krótszym czasem przeżycia u suk z nowotworem gruczołu sutkowego (137-138). Dostępne piśmiennictwo sugeruje, że białko Ki-67 ma wartość prognostyczną jako niekorzystny czynnik rokowniczy w nowotworach gruczołu sutkowego u suk (139-140).

2.11 Receptor HER2

Receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2) nazywany również receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej (ERBB2) jest glikoproteiną, która została odkryta w 1984 roku przez Weinberga i wsp. (141). HER2 należy do rodziny receptorów transbłonowych. Białko receptorowe zbudowane jest z trzech części: części zewnątrzkomórkowej, odpowiedzialnej za wiązanie ligandu, domeny przezbłonowej oraz części cytoplazmatycznej (142). Działanie HER2 polega na wiązaniu ligandu z powierzchniowym kompleksem receptorowym oraz uaktywnieniu kinazy tyrozynowej. W

medycynie człowieka ocena ekspresji receptora HER2 ma duży wpływ na ustalenie późniejszej terapii raka sutka. Amerykańskie Towarzystwo Onkologów Klinicznych (ASCO) i Kolegium Patologów Amerykańskich (CAP) opublikowało wytyczne i zalecenia dotyczące m.in. metody badań oraz oceny ekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu (HER2), które ciągle ulegają aktualizacji (143-144). Białko to wykazuje lokalizację błonową w komórkach nowotworowych (143-144). W przypadku raka gruczołu piersiowego obecność białka receptorowego HER2 szacuje się na około 10-25% przypadków badanych guzów (145-147). Nadekspresja receptora HER2 jest powiązana z niekorzystnym rokowaniem, zwiększoną częstotliwością przerzutów nowotworu, nasileniem angiogenezy, a także szybszym wzrostem guza. HER2 ze względu na znaczenie w terapii jest istotnym markerem wykorzystywanym w ustaleniu typu molekularnego oraz w zaplanowaniu terapii nowotworów piersi u kobiet. Jest również częściej używanym białkiem w badaniach immunohistochemicznych w medycynie weterynaryjnej, a jego ekspresja została wykazana między innymi w rakach gruczołu mlekowego u suk (8,11).

2.12 Wimentyna (VIM)

Wimentyna jest białkiem o masie ok. 57 kDa należących do rodziny białek filamentów pośrednich (IF; ang. intermediate filaments) (104). Wśród filamentów pośrednich wyróżnia się pięć klas IF, a wimentyna należy do typu III. Wimentyna produkowana jest przez następujące komórki tj. fibroblasty, makrofagi, komórki endotelialne oraz komórki mięśni gładkich (148).

Wimentyna jest białkiem związanym zarówno z procesami fizjologicznymi, jak i patologicznymi w organizmie człowieka. Ekspresję wimentyny obserwuje się głównie w cytoplazmie komórek mezenchymalnych, dlatego pierwotnie uważano to białko jako marker diagnostyczny do odróżniania nowotworów pochodzenia nienabłonkowego od nabłonkowych (149-150). Aktualnie ekspresję wimentyny stwierdzono w wielu typach nowotworów nabłonkowych u człowieka m.in. w raku gruczołu piersiowego, prostaty, płuc. W większości wymienionych zmian złośliwych pochodzenia nabłonkowego ekspresja wimentyny koreluje z cechami związanymi z agresywnością raka, np.: wzrostem guza, nasiloną inwazją, zwiększoną ilością przerzutów, zatem nasilenie ekspresji wimentyny jest związane z gorszą prognozą dla pacjentów onkologicznych (151-155).

3. Cel pracy

A. Badanie immunohistochemiczne (IHC) z określeniem poziomu ekspresji nowych w medycynie weterynaryjnej markerów komórkowych tj. SOX 10 i TES w komórkach nowotworowych badanych guzów, łagodnych i złośliwych oraz w tkance prawidłowej gruczołu sutkowego u suk.

B. Analiza poziomów ekspresji SOX 10 na poziomie mRNA w wybranych przypadkach nowotworów złośliwych i tkance prawidłowej gruczołu sutkowego u suk.

C. Ocena nasilenia poziomu ekspresji SOX 10 oraz TES w komórkach nowotworowych w stosunku do rasy, wieku pacjenta oraz stopnia złośliwości histologicznej guza.

D. Ocena zależności pomiędzy nasileniem ekspresji: SOX 10 oraz TES a ekspresją markerów komórkowych związanych z procesem kancerogenezy takich jak Ki-67, HER2 i VIM.

4 Materiały i metody

4.1 Charakterystyka grupy badanej

Materiał do badań stanowiły guzy listwy młecznej pobrane od psów płci żeńskiej w wieku od 2 do 14 lat, różnych ras, pozyskane z archiwum Zakładu Patomorfologii i Weterynarii Sądowej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Analizie poddano łącznie 77 próbek tkanek gruczołu sutkowego psów. Zmiany złośliwe stanowiły 53 przypadki, zmiany niezłośliwe - 14 przypadków oraz 10 próbek prawidłowej tkanki gruczołu sutkowego stanowiące grupę kontrolną, pobrano pośmiertnie od zwierząt, których przyczyną zgonu nie była choroba nowotworowa.

Grupa badana została scharakteryzowana według następujących parametrów kliniczno-morfologicznych: rasa, wiek w chwili rozpoznania, typ histologiczny raka, stopień histologicznej złośliwości, zajęcie naczyń, ekspresja wimentyny, receptora HER2, indeks proliferacyjny (Ki-67). Dane przedstawiono w tabeli V.

Tabela V. Charakterystyka grupy badanej.

Nowotwory złośliwe	
Parametr	Liczba chorych (n)
Wiek	
poniżej 9 lat	18
powyżej 9 lat	35
Typ histologiczny raka	
rak prosty cewkowo brodawkowy	17
rak prosty cewkowy	15
rak mieszany	13
rak lity	4
rak złożony	3
rak brodawkowo torbielowaty	1

Stopień złośliwości histologicznej	
G1	29
G2	23
G3	1
Zajęcie naczyń	
tak	19
nie	34
HER2	
HER2 (-)	28
HER2 (+)	25
Ki-67	
Ki-67 \leq 20 %	27
Ki-67 $>$ 20 %	26
VIM	
VIM \leq 10%	33
VIM $>$ 10 %	20

Nowotwory łagodne	
Parametr	Liczba chorych (n)
Wiek	
poniżej 9 lat	9
powyżej 9 lat	5
Typ histologiczny	

gruczolak	14
Zajęcie naczyń	
tak	0
nie	14
HER2	
HER2 (-)	9
HER2 (+)	5
Ki-67	
Ki-67 \leq 20 %	14
Ki-67 $>$ 20 %	0
VIM	
VIM \leq 10 %	14
VIM $>$ 10 %	0

4.2 Badanie histopatologiczne

Materiał tkankowy utrwalono w 10% roztworze zbuforowanej formaliny, następnie przygotowane skrawki tkankowe o grubości 4 μ m, przygotowane przy użyciu mikrotomu LEICA SM 2010R nanoszono na szkiełka podstawowe Superfrost. Preparaty do oceny histologicznej zostały poddane barwieniu hematoksyliną i eozyną (H&E). Ocena mikroskopowa badanych tkanek została przeprowadzona przy pomocy mikroskopu świetlnego Olympus BX53 przez dwóch niezależnych patologów zgodnie z aktualnymi wytycznymi na podstawie klasyfikacji histologicznej zaproponowanej przez Goldschmidt i wsp w 2011 roku (3,45).

4.3 Ocena stopnia histologicznej złośliwości

Badaniem koniecznym w ocenie nowotworu jest określenie stopnia jego histologicznej złośliwości. (G-grade). Jedną z bardziej znanych i powszechnie stosowanych ocen w

diagnostyce guzów listwy mleczej jest skala wg Elstona i Ellisa, zmodyfikowana przez Peña i wsp. (45). W badaniu uwzględnia się następujące cechy mikroskopowe nowotworu, tj. stopień tworzenia się cewek (1-3 pkt.), pleomorfizm jąder (1-3 pkt.) oraz indeks mitotyczny (1-3 pkt.) w siedmiu polach widzenia przy powiększeniu 400x o łącznej powierzchni 2,37mm². Końcowy wynik jest sumą wszystkich składowych i na jego podstawie określa się stopień złośliwości histologicznej według następującego schematu: 3-5 pkt: I – niski stopień złośliwości histologicznej, 6-7 pkt: II – średni stopień złośliwości histologicznej, 8-9 pkt: III – wysoki stopień złośliwości histologicznej (42). System stopniowania złośliwości nowotworów złośliwych pochodzenia nabłonkowego został przedstawiony w tabeli VI.

Tabela VI. System stopniowania złośliwości nowotworów nabłonkowych, na podstawie Pena i wsp (45).

oceniana cecha	opis	punkty
formowanie struktur cewkowych	struktury cewkowe stanowią > 75% obszaru badanego wycinka	1
	Cewki stanowią 10–75% obszaru wycinka	2
	Brak cewek lub nieliczne (<10%)	3
pleomorfizm jądrowy	Nieznaczny: jądra komórkowe jednolitego kształtu i wielkości, widoczne pojedyncze jąderka widoczne okazjonalnie	1
	Średni: umiarkowane zróżnicowanie wielkości i kształtu jądra komórkowego; hiperchromazja jąder; obecne jąderka	2
	Znaczny: różny kształt i wielkość jąder komórkowych; hiperchromazja jąder; liczne, wyraźne jąderka	3
liczba mitoz w HPF	0–9	1
	10–19	2
	20 i więcej	3
stopień histologicznej złośliwości	G1	3–5
	G2	6–7
	G3	8–9

4.3.1 Ocena zajęcia naczyń krwionośnych

Jednym z niekorzystnych parametrów w przypadku nowotworów jest zajęcie naczyń krwionośnych. W badaniu histologicznym, w barwieniu hematoksyliną i eozyną (H&E) uwzględniono obecność komórek nowotworowych w świetle naczyń krwionośnych. Przypadki guzów złośliwych zostały pogrupowane na te z obecnością angioinwazji lub wolne od niej.

4.4 Badania immunohistochemiczne

Badania IHC przeprowadzono na próbkach tkanek, które podzielono na trzy grupy bazując na wyniku badania histologicznego: nowotwory złośliwe (53 raki), nowotwory łagodne (14 gruczolaków) oraz 10 prawidłowych tkanek gruczołu sutkowego stanowiących grupę kontrolną. Ocena immunohistochemiczna została przeprowadzona przez niezależnych patologów, bez dostępu do danych kliniczno-patologicznych.

4.4.1. Reakcje immunohistochemiczne

Do badań wykorzystano następujące przeciwciała:

- mysie monoklonalne SOX10 clone A2 (Santa Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA sc-365692) stosowane w rozcieńczeniu 1:100
- królicze poliklonalne HER2 (Dako Glostrup, Denmark A0485) stosowane w rozcieńczeniu 1:200
- królicze poliklonalne Testin (NBP1-87987 Novus Biologicals) stosowane w rozcieńczeniu 1:100
- mysie monoklonalne Ki-67 clone MIB-1 (M7240 Dako) stosowane w rozcieńczeniu 1:100
- mysie monoklonalne VIM clone 3B4 (M7020 Dako) stosowane w rozcieńczeniu 1:100

Do wizualizacji reakcji IHC w przypadku SOX 10 oraz HER2 zastosowany został system DAKO FLEX+. Do wizualizacji reakcji IHC w przypadku TES, Ki-67, VIM zastosowany został BOND Polymer Refine Detection System, Leica Biosystems, UK

Procedura reakcji immunohistochemicznych dla oceny ekspresji SOX 10, HER2:

1. Odparafinowanie, uwodnienie oraz cieplne odsłanianie epitopów w buforze Tris/EDTA, pH9 (EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH) przy użyciu aparatu PT Link (tzw. procedura 3-w-1)

2. Przepłukanie w buforze (roztwór soli fizjologicznej z buforem TRIS (pH7,6) zawierający 0,1% Tween 20)
3. Nakropienie EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent – inkubacja 5 min. (odczynnik służący do blokowania endogennej peroksydazy)
4. Przepłukanie w buforze
5. Nakropienie przeciwciał pierwszorzędowych – inkubacja 20 min. w temp. pokojowej (przeciwciała zostały rozcieńczone w EnVision FLEX Antibody Diluent)
6. Przepłukanie w buforze
7. Nakropienie EnVision FLEX/HRP – inkubacja 20 min. (dekstran sprzężony z peroksydazą oraz drugorzędowymi przeciwciałami kozimi skierowanymi przeciwko immunoglobulinom mysim i króliczym)
8. Przepłukanie w buforze
9. Bufor – inkubacja 5 min.
10. Nakropienie DAB – inkubacja 10 min. (3,3'-diaminobenzzydina)
(Roztwór przygotowano bezpośrednio przed nakropieniem – 1ml buforu + 1 kropla DAB)
11. Przepłukanie w buforze
12. Nakropienie EnVision FLEX Hematoxylin – inkubacja 5 min.
13. Przepłukanie w wodzie destylowanej
14. Przepłukanie w buforze
15. Przepłukanie w wodzie destylowanej
16. Szereg alkoholowy (70%, 96%, absolutny) – po 5min.
17. Ksylen – 5 min.
18. Zamknięcie szkiełek w żywicy syntetycznej

Procedura reakcji immunohistochemicznych dla oceny ekspresji TES, Ki-67, VIM:

1. Odparafinowanie, uwodnienie (Bond Dewax Solution, Leica Biosystems, UK) oraz cieplne odsłanianie epitopów w buforze Bond Epitope Retrieval Solution 1 (Leica Biosystems, UK) przez 20 minut.
2. Przepłukanie w buforze Bond Wash Solution (1x) Leica Biosystems, UK
3. Zablockowanie endogennej peroksydazy poprzez nakropienie Peroxide Block przy

użyciu BOND Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Wielka Brytania)– inkubacja 5 min.

4. Przepłukanie w buforze
5. Nakropienie przeciwciał pierwszorzędowych – inkubacja 15 min. w temp. pokojowej (przeciwciała rozcieńczono w rozcieńczalniku Bond Primary Antibody Diluent (Leica Biosystems, UK)
6. Przepłukanie w buforze
7. Inkubacja z przeciwciałami drugorzędowymi Post Primary przy użyciu systemu BOND Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Wielka Brytania). – 25 min.
8. Przepłukanie w buforze
9. Inkubacja z Polymer przy użyciu systemu BOND Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Wielka Brytania). – 20 min.
10. Przepłukanie w buforze
11. Nakropienie DAB (3,3'-diaminobenzzydina) przy użyciu systemu BOND Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Wielka Brytania). – inkubacja 10 min.
12. Przepłukanie w wodzie destylowanej
13. Nakropienie EnVision FLEX Hematoxylin – inkubacja 5 min.
14. Przepłukanie w wodzie destylowanej
15. Przepłukanie w buforze
16. Przepłukanie w wodzie destylowanej
17. Szereg alkoholowy (70%, 96%, absolutny) – po 5min.
18. Ksylen – 5 min.
19. Zamknięcie szkiełek w żywicy syntetycznej

Eksperymenty kontrolne przeprowadzono w nieobecności pierwszorzędowego przeciwciała.

4.4.2. Ocena ekspresji markerów komórkowych

Testyna

Ekspresję Testyny określano w 5 losowych polach widzenia o pow. 400x. Odsetek komórek dodatnich ustalono zgodnie ze skalą Remmele i Stegner (156). W ocenie uwzględniono zarówno odsetek komórek wykazujących pozytywną ekspresję (A), jak i intensywność reakcji IHC (B). Ostateczny wynik był iloczynem wartości obu składowych (AxB) uzyskane wyniki przybierały wartości od 1 do 12 punktów ocenianych według następującej skali: brak reakcji = 0-1 pkt.; słaba reakcja = 2-3 punkty; umiarkowana reakcja = 4-8 punktów; intensywna reakcja = 9-12 punktów (tab.VII).

Tabela VII. Tabela przedstawiająca kryteria klasyfikacji w skali Remmele i Stegner (156).

Procent komórek wykazujących pozytywną reakcję (A)	Poziom intensywności reakcji (B)	IRS (AxB)
0 brak ekspresji	0 brak reakcji barwnej	0 – 1 = negatywny
1 = 1-9 %	1 = słaba reakcja	2 – 3 = słaba reakcja
2 = 10-50%	2 = umiarkowana reakcja	4 – 8 = umiarkowana reakcja
3 = 51-80%	3 = intensywna reakcja	9 – 12 = intensywna reakcja
4 = 81-100%		

SOX 10

W przypadku SOX 10, ekspresję jądrową oceniono w 5 losowych polach widzenia, stosując powiększenie 400x. Odsetek komórek wykazujących dodatnią ekspresję oceniano według skali: poniżej 1% komórek - wynik negatywny (0 pkt.), niejednolite zabarwienie 1-10% komórek (1 pkt.), ogniskowe 11-70% (2 pkt.) i rozproszone 71-100 % (3 pkt.).

Tabela VIII. Tabela uwzględniająca kryteria interpretacji ekspresji SOX 10 na podstawie Ali i wsp. (157).

Punkty	Procent komórek wykazujących pozytywną reakcję jądrową
0 pkt.	0%
1 pkt.	niejednolite zabarwienie 1-10%
2 pkt.	ogniskowe 11-70%
3 pkt.	rozproszone 71-100%

SOX 10 skala zmodyfikowana

Do dokładniejszego systemu oceny immunohistochemicznej, opracowano autorski schemat, wykorzystując procent komórek wykazujących pozytywną reakcję, ustalając kryteria 0% komórek - 0 pkt., 1-10% komórek - 1 pkt., 11-50% - 2 pkt., 51-80% - 3 pkt., 81-100% - 4 pkt.

Tabela IX. Tabela przedstawiająca kryteria autorskiej oceny reakcji immunohistochemicznej SOX 10.

Punkty	Procent komórek wykazujących pozytywną reakcję jądrową
0 pkt.	0%
1 pkt.	1-10%
2 pkt.	11-50%
3 pkt.	51-80%
4 pkt.	81-100%

Ki-67

Reakcję Ki-67 oceniono w 8 polach o dużym powiększeniu (400x) Oceniając pozytywną jądrową reakcję barwną. Zgodnie z zaleceniami Konferencji Raka Piersi St Gallen

za granicę niskiego i wysokiego indeksu proliferacyjnego przyjęto wartość 20% (158).

Tabela X. Tabela przedstawiająca kryteria przyjęte dla niskiego oraz wysokiego indeksu proliferacyjnego.

Ki-67	Procent komórek nowotworowych wykazujących pozytywną reakcję jądrową
niski indeks proliferacyjny	poniżej 20%
wysoki indeks proliferacyjny	powyżej 20%

HER2

Poziom ekspresji białka receptorowego HER2 oceniano za pomocą skali uwzględniającej zarówno odsetek komórek nowotworowych reagujących w obrębie błony komórkowej, jak i poziom intensywności reakcji barwnej. Skalę podzielono według następującego schematu: brak reakcji: brak zabarwienia błony komórkowej lub odczynu barwnego u mniej niż 10% komórek nowotworowych; słaba reakcja: bardzo słabe i niepełne zabarwienie błony komórkowej w ponad 10% komórek nowotworowych; reakcja umiarkowana: słaba lub umiarkowana reakcja błonowa w ponad 10% komórek nowotworowych lub całkowita i intensywna reakcja błonowa w ponad 10% komórek nowotworowych; silna reakcja: całkowite i silne zabarwienie błony w ponad 10% komórek nowotworowych Zgodnie z sugestiami zawartymi w wytycznych zaproponowanych przez Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej (College of American Pathologists (ASCO/CAP)), tylko całkowite, silne reakcje barwne w ponad 30% komórek nowotworowych uznano za reakcję pozytywną (159).

Tabela XI. Tabela przedstawiająca kryteria przyjęte dla HER2 dodatniej i ujemnych reakcji, z czego jedynie reakcje ocenione na 3 pkt, zostały scharakteryzowane jako HER2 dodatnie.

IHC	Kryteria interpretacji
3	silna reakcja: całkowite i silne zabarwienie błony komórkowej w ponad 30% komórek nowotworowych
2	silne, kompletne znakowanie błony komórkowej w $\leq 30\%$ komórek; słabe lub umiarkowane, heterogeniczne, kompletne znakowanie błony w co najmniej 10% komórek
0-1	brak znakowania (0) lub słabe, niekompletne znakowanie błony komórkowej (1+) w jakimkolwiek odsetku komórek

Wimentyna

Poziom ekspresji wimentyny (VIM) oceniano za pomocą skali uwzględniającej odsetek komórek nowotworowych wykazujących pozytywną reakcję cytoplazmatyczną. Oceniliśmy 8 pól widzenia przy powiększeniu 400x, stosując się do następującej skali: 0-10% brak reakcji, powyżej 10% reakcja pozytywna (153).

Tabela XII. Tabela przedstawiająca kryteria przyjęte dla reakcji VIM dodatniej i ujemnej reakcji.

VIM	Procent komórek wykazujących pozytywną reakcję cytoplazmatyczną
brak reakcji	poniżej 10%
reakcja pozytywna	powyżej 10%

4.5 Izolacja RNA

RNA było izolowane z fragmentów (n=17) guzów o średnicy ok 1 cm, pobranych podczas zabiegu mastektomii. Próbkę tkanek prawidłowych (n=10) zostały pobrane od psów, które uległy śmierci w wyniku wypadku komunikacyjnego. Materiał zabezpieczono w RNA *later* Stabilization Solution (Ambion, USA)

4.5.1. Izolacja całkowitego RNA za pomocą zestawu „RNeasy Mini”

W celu izolacji RNA tkankę o masie ok 30 mg utrwaloną w roztworze RNA *later* homogenizowano w 700 μ l buforu RLT plus z dodatkiem β -merkaptoetanolu. Do uzyskanego lizatu dodawano 700 μ l 70% etanolu, mieszano, a następnie nakładano go na dostarczoną przez producenta kolumnienkę „RNeasy spin column” i wirowano przez 15 sekund przy 10 000 x g. Przesącz usuwano, a związane ze złożem RNA przemywano za pomocą 350 μ l buforu RW1 poprzez wirowanie przez 15 sekund, przy 10 000 x g. W celu usunięcia genomowego DNA, na kolumnienkę dodawano 80 μ l roztworu DNazy i inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie związane ze złożem RNA przemywano kolejno za pomocą buforów RW1 (350 μ l), a następnie RPE (2x500 μ l), poprzez wirowania przez 15 sekund, przy 10 000 x g. Następnie kolumnienkę wirowano przez 2 minuty przy 10 000 x g celem osuszenia, po czym umieszczano ją w świeżej próbówce Eppendorfa. Na kolumnienkę наносzono 30 μ l wody wolnej od RNaz, a następnie RNA eluowano poprzez wirowanie przez 1 minutę przy 10000 x g.

4.5.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji za pomocą zestawu „High capacity cDNA reverse transcription kit” (Thermo Fisher Scientific)

Syntezę cDNA prowadzono zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Do 10 μ l RNA (500 ng) dodawano 2 μ l 10X RT Random Primers, 0.8 μ L 100 mM dNTP, 2 μ l 10X RT Buffer, 1 μ L MultiScribe™ Reverse Transcriptas, 1 μ L RNase Inhibitor oraz 3,2 μ L wody. Następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji według protokołu producenta (tabela). Uzyskane w ten sposób cDNA przechowywano w temperaturze -20°C

Ustawienia	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4
Temperatura	25	37	85	4
Czas	10 minut	120 minut	5 minut	∞

4.5.3. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR)

Reakcję real time PCR w czasie rzeczywistym prowadzono w aparacie firmy „Applied Biosystems”, z wykorzystaniem sond TaqMan (SOX10 Cf02706686_g1, Actin Cf04947159_m1) według zaleceń producenta. Jako gen referencyjny wykorzystywano gen dla β -aktyny (ACTB). Do 10 μ L odczynnika iTaq Universal Probes Supermix dodawano 1 μ L TaqMan® Gene Expression Assays oraz 9 μ L cDNA. Względny poziom ekspresji badanych genów wyznaczono przy pomocy programów SDS 2.4. oraz RQ Manager (Applied

Biosystems) i Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft) w oparciu o parametr RQ. Każdą reakcję przeprowadzano w trzech powtórzeniach.

4.6 Immunoblotting

Swoistość przeciwciała została potwierdzona z użyciem metody Westen Blott. Całkowite białko wyekstrahowano z 9 próbek raka sutka i 1 prawidłowej tkanki. Tkanki sutka psów homogenizowano w 500 µl lodowatego odczynnika do ekstrakcji tkanek (Thermo Fisher Scientific) z koktajlem inhibitorów proteazy;50 (Sigma-Aldrich). Po inkubacji na lodzie (30 min) i odwirowaniu (10 000 x g; 4°C) przeprowadzono oznaczenie ilościowe białka w homogenatach tkanki gruczołu sutkowego przy użyciu zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), zgodnie z instrukcjami producenta. Próbkę białka (100 µg) rozdzielono w redukującej SDS-PAGE (12%; 95° C; 10 min) i przeniesiono na membranę PVDF przy użyciu systemu transferu Trans-Blot® Turbo™ (BIO-RAD), zgodnie z instrukcją producenta.. Membranę traktowano środkiem wzmacniającym sygnał Pierce™ Western Blot (Thermo Fisher Scientific), blokowano przez 1 godzinę 5% odtłuszczonym mlekiem w PBS zawierającym 0,5% (obj./obj.) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) i inkubowano przez noc; 4° C z przeciwciałem Testin (1:250; NBP1-87987 Novus Biologicals). Pierwszorzędowe przeciwciała wykrywano za pomocą przeciwciała anty-IgG skoniugowanego z HRP i bloty wywoływano przy użyciu substratu SuperSignal West Femto ECL (Thermo Fisher Scientific). Względne intensywności prążków określono stosując oprogramowanie Quantity One (BIO-RAD), wykorzystując metodę densytometryczną.

4.7 Mikrofotografie

Mikrofotografie badanych guzów zostały poddane wspomaganiej komputerowo analizie obrazu za pomocą komputera wyposażonego w program cell^A software (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Germany) sprzężonego z mikroskopem optycznym Olympus BX53 wyposażonym w cyfrową kamerę model ColorView IIIu (Olympus Japan).

4.8 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzano przy pomocy programu StatistikaPL (StatSoft, Kraków) i odpowiednich testów statystycznych. Normalność danych testowano przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Różnice ekspresji badanych białek między grupami zwierząt testowano przy użyciu analizy rang Kruskala-Wallisa lub analizy U Manna-Whitneya. Zależności między badanymi parametrami oceniano przy użyciu testu korelacji rang Spearmana. Istotność statystyczną przyjęto dla $p \leq 0,05$.

5. Wyniki

5.1 Wiek i rasa pacjentów

W badaniu średni wiek pacjentów wynosił 9 lat zarówno w przypadku nowotworów złośliwych, jak i łagodnych. Dominujące rasy psów ze zdiagnozowanymi nowotworami złośliwymi i łagodnymi przedstawiono w tabeli XIII.

Tabela XIII. Tabela przedstawiająca rasy psów ze zdiagnozowanymi nowotworami złośliwymi oraz łagodnymi.

Rasa	liczba
Nowotwory złośliwe	
Mieszana	25
Yorkshire terier	7
Owczarek Niemiecki	5
Shih-tzu	3
Jamnik	2
Bokser	2
Amstaff	1
Bolończyk	1
Barbet	1
Beagle	1
Chihuahua	1
Cocker spaniel	1
Jack russel terier	1
Szpic miniaturowy	1
West highland white terier	1
Nowotwory niezłośliwe	
Mieszana	3
Yorkshire terier	3

Boston terier	2
West highland white terier	1
szpic wilczy	1
Seter irlandzki	1
Beagle	1
Shih-tzu	1
Golden Retriever	1

5.2 Ocena histopatologiczna guzów z wykorzystaniem barwienia hematoksyliną i eozyną (H&E)

W badanym materiale oceniono typ histologiczny nowotworów, a zmiany złośliwe sklasyfikowano zgodnie z wytycznymi WHO. Wyniki przedstawiono w tabeli XV oraz XVI.

W grupie nowotworów złośliwych (n=53) największy odsetek stanowił rak prosty cewkowo-brodawkowy 32,0% (n=17), następnie rak prosty cewkowy 28,3% (n=15), rak mieszany 24,6% (n=13), rak lity 7,5 % (n=4), rak złożony 5,7% (n=3) i rak brodawkowy-torbielowaty 1,9% (n=1).

Nowotwory łagodne (n=14) sklasyfikowano jako gruczolaki proste (n=14).

Grupę kontrolną stanowiło 10 wycinków prawidłowego gruczołu mlekowego.

5.3 Ocena stopnia złośliwości (grading, G)

W zależności od stopnia złośliwości histologicznej (G; ang. grade) materiał podzielono na trzy grupy: 54,7% (n=29) nowotworów złośliwych oceniono na stopień 1, 43,4% (n=23) na stopień 2 i 1,9% (n=1) jako stopień 3 (Tabela XV, XVI).

5.4 Ocena zajęcia naczyń krwionośnych

Badaną grupę przeanalizowano również pod kątem inwazji naczyń przez komórki nowotworowe

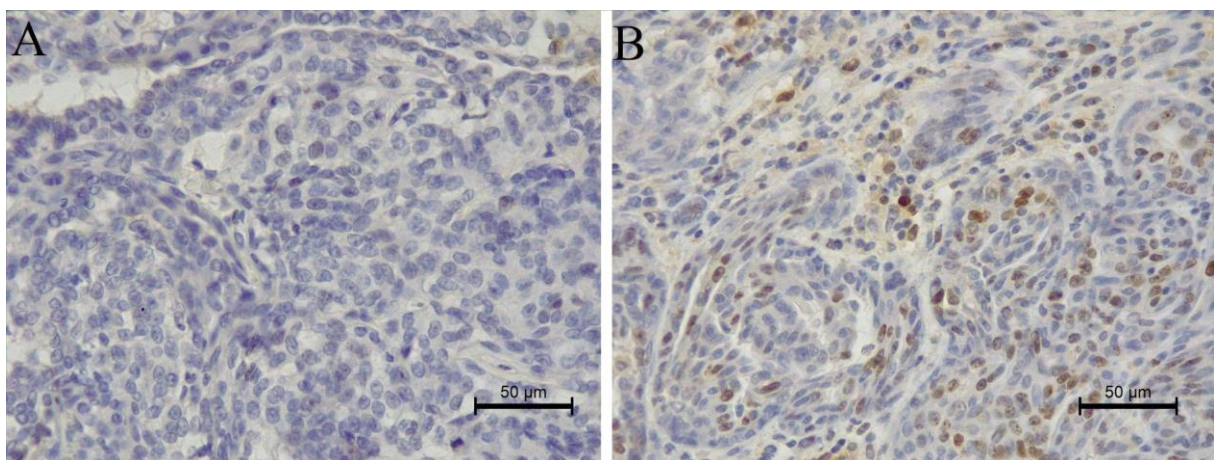
W przypadku nowotworów złośliwych, do zajęcia naczyń doszło w 35,8% (n=19) analizowanych przypadkach nowotworów złośliwych, 34 próbki z nich nie wykazały tego zjawiska.

5.5 Ocena immunohistochemiczna

5.5.1 Ki-67

Wysoki współczynnik Ki-67 tj. powyżej 20% komórek wykazujących pozytywną ekspresję stwierdzono w 49% (n=26) nowotworów złośliwych. Wynik ujemny tj. poniżej 20% komórek zaobserwowano w 51% (n=27) badanych raków (Tabela XV oraz XVI).

Wśród nowotworów łagodnych i w prawidłowej tkance gruczołowej obserwowano niski indeks proliferacyjny KI-67, reakcja jądrowa nie przekraczającą 20% komórek. Przykładowe reakcje immunohistochemiczne zostały przedstawione na rycinie 4.



Ryc. 4. Przykładowe zdjęcia reakcji białka Ki-67 w badanych guzach. A. Niski współczynnik Ki-67: ekspresja w poniżej 20% komórek rakowych B. Ekspresja Ki-67 zaobserwowana w ponad 20% komórek rakowych. Powiększenie 400x.

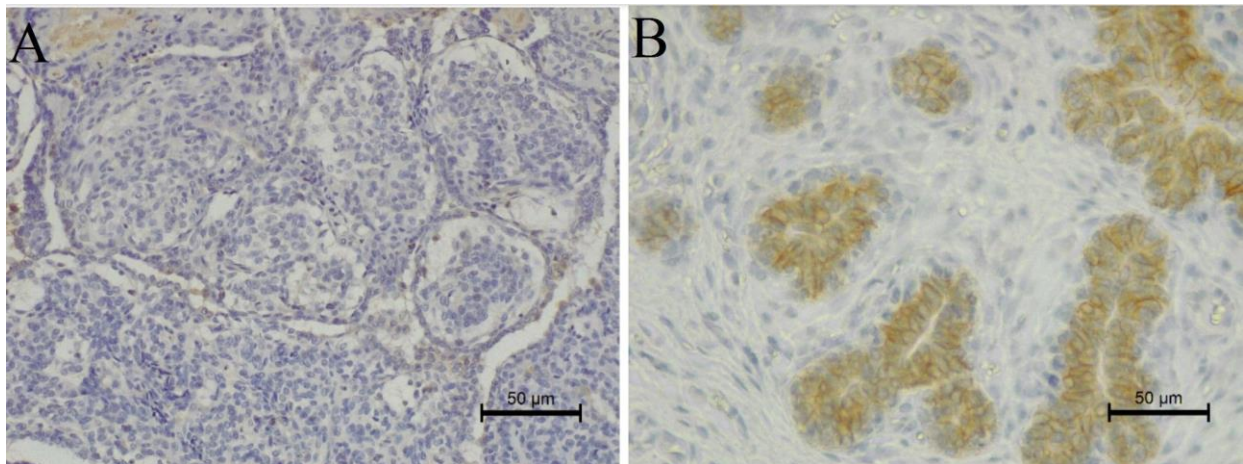
5.5.2 HER2

Pozytywną ekspresję HER2 odnotowano w 47,2% (n=25) guzów złośliwych, natomiast 52,8 % (n= 28) nie wykazało ekspresji HER2.

Wśród gruczolaków pozytywną ekspresję wykazano w 28,6% (n= 4), w 71,4% (n=10) nie zaobserwowano ekspresji HER2.

W prawidłowej tkance gruczołowej nie odnotowano ekspresji HER2.

Przykładowe reakcje immunohistochemiczne zostały przedstawione na rycinie 5.



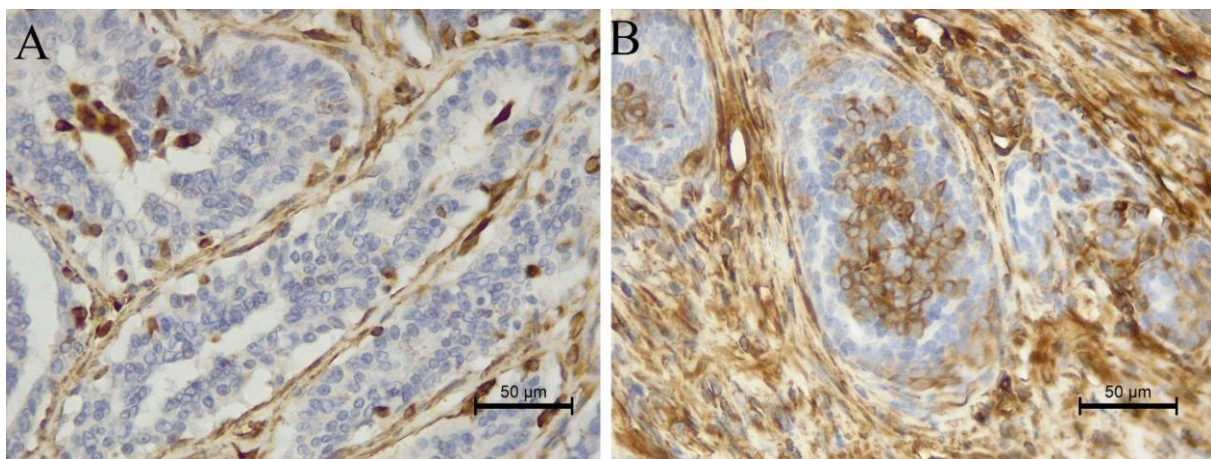
Ryc. 5. Przykładowe zdjęcia reakcji białka HER2 w badanych guzach. A. Brak ekspresji HER2 w raku. B. Silna błonowa ekspresja HER2 w raku, wynik uznany za HER2 dodatni. Powiększenie 400x.

5.5.3. VIM

Pozytywną reakcję cytoplazmatyczną zaobserwowano w 37,7% (n=20) nowotworów złośliwych, w przypadku 62,3% (n=33) nie stwierdzono ekspresji cytoplazmatycznej lub była ona mniejsza niż 10% komórek nowotworowych.

W zmianach łagodnych i tkance prawidłowej nie stwierdzono ekspresji wimentyny w komórkach nabłonkowych, jedynie w komórkach tkanki łącznej.

Przykładowe reakcje immunohistochemiczne zostały przedstawione na rycinie 6.



Ryc. 6. Przykładowe zdjęcia reakcji wimentyny w badanych guzach. A. Ekspresja wimentyny obecna w komórkach podścieliska gruczołu sutkowego, brak reakcji w tkance nabłonkowej. B. Pozytywna reakcja w podścielisku nowotworu oraz w komórkach nowotworowych. Powiększenie 400x.

5.5.4 SOX 10

Ekspresja SOX 10 w tkance prawidłowej

Ekspresję SOX 10 stwierdzono w 70% (n= 7) badanych tkanek, z których 30% (n=3) wykazało reakcję na poziomie 1 pkt., n= 3 na poziomie 2 pkt., n= 1 na poziomie 3 pkt., a n= 3 wykazało negatywną reakcję. W klasyfikacji Ali i wsp. również 70% badanych próbek wykazało pozytywną reakcję, z czego n=3 reakcję ocenioną na 1 pkt., n= 4 ocenioną na 2 pkt. Porównanie wyników ekspresji SOX 10 w obu systemach klasyfikacji przedstawiono w tabeli XIV.

Ekspresja SOX 10 w zmianach łagodnych

W przypadku guzów łagodnych ekspresję SOX 10 w komórkach nowotworowych obserwowano w 92,85 % (n=13) zmian, z czego ekspresja SOX 10 była słaba, 1 punkt w n=1 (7,15%) badanych zmian łagodnych, 2 punkty w 50% (n= 7), 3 punkty w 14,3% (n=2) i 4 punkty w 21,4% (n=3).

Według klasyfikacji zaproponowanej w artykule Ali i wsp. (2022) ekspresję SOX 10 stwierdzono w 92,85% (n= 13) poddanych analizie próbek. Wśród nich 7,15% (n=1) oceniono na 1 pkt., 50% n=7 oceniono na 2 pkt., 35,7% oceniono na 3 pkt.

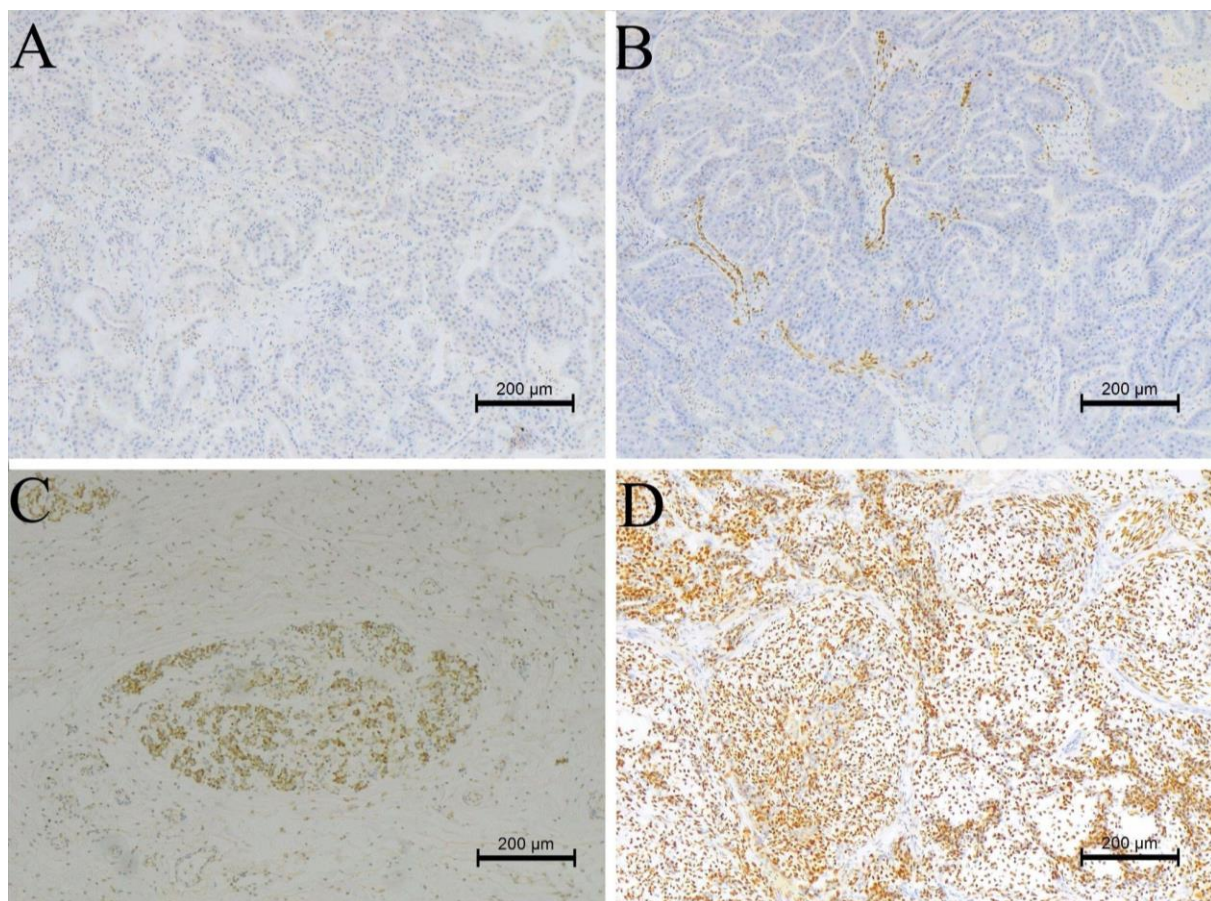
Ekspresja SOX 10 w nowotworach złośliwych

Ekspresję SOX 10 w komórkach nowotworowych stwierdzono w 98,1% (n=52) badanych przypadków nowotworów złośliwych.

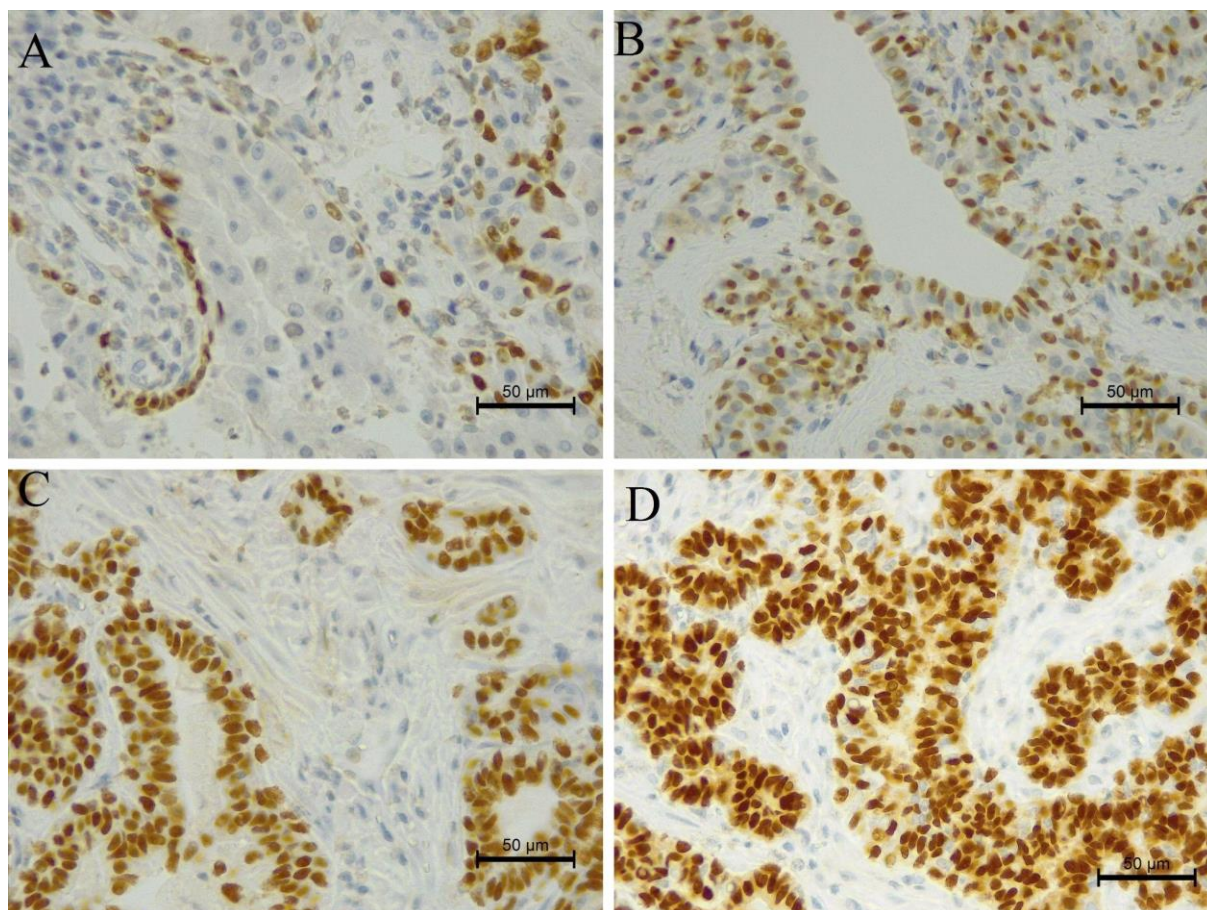
W przypadku klasyfikacji wg Ali 1,9% (n=1) nie wykazało ekspresji SOX 10 5,7% (n= 3) wykazało reakcję na poziomie 1pkt., 35,8% (n= 19) oceniono na 2 pkt., n=30 na 3 pkt.

Wg autorskiej skali dodatni poziom ekspresji stwierdzono w n=52 próbkach, z czego n=3 wykazało reakcję ocenioną na 1 pkt., 35,8% (n= 19) ocenioną na 2 pkt., 39,6% (n= 21) na 3 pkt., 16,9% (n= 9) oceniona na 4 pkt.

Ocenę jądrowej ekspresji SOX 10 w komórkach nowotworowych z poszczególnych rozpoznań histologicznych przedstawiono w tabeli XV. Przykładowe reakcje immunohistochemiczne SOX 10 przedstawiono na ryc 7 i 8, a porównanie obu systemów klasyfikacji reakcji jądrowej przedstawiono w tabeli XIV.



Ryc. 7. Ocena SOX 10 w rakach. A. Brak reakcji SOX 10. B. Reakcja SOX10 oceniona na 1 pkt., niejednorodne zabarwienie 1-10%. C, Reakcja SOX 10 oceniona na 2 pkt., ogniskowe zabarwienie 10-70% komórek. D. Reakcja SOX 10 oceniona na 3 pkt. rozproszone 70-100% komórek (za Ali i wsp. 2022).



Ryc. 8. Ocena SOX 10 w badanych tkankach. A. Reakcja SOX 10 oceniona na 1 pkt., niejednorodne zabarwienie 1-10%. B. Reakcja SOX 10 oceniona na 2 pkt., ogniskowe zabarwienie 11-50% komórek. C. Reakcja SOX 10 oceniona na 3 pkt. 51-80% komórek nowotworowych, brak reakcji w podścielisku. D. Reakcja SOX 10 oceniona na 4 pkt. 81-100% komórek nowotworowych.

Tabela XIV. Porównanie systemu klasyfikacji jądrowej ekspresji SOX 10.

Porównanie systemu klasyfikacji SOX 10 wg Ali oraz autorskiej skali			
Ali (2022)		Bubak (2023)	
Nowotwory złośliwe			
Punkty	Liczba przypadków	Punkty	Liczba przypadków
0	1	0	1
1	3	1	3
2	19	2	19
3	30	3	21

		4	9
Nowotwory łagodne			
Punkty	Liczba przypadków	Punkty	Liczba przypadków
0	1	0	1
1	1	1	1
2	7	2	7
3	5	3	2
		4	3
Tkanka prawidłowa			
Punkty	Liczba przypadków	Punkty	Liczba przypadków
0	3	0	3
1	3	1	3
2	3	2	4
3	1	3	0
		4	0

Tabela XV. Zależność ekspresji SOX 10 w porównaniu z parametrami kliniczno-patologicznymi.

	Liczba przypadków n (%)	Ekspresja SOX 10 w komórkach nowotworowych n (%)	Wartość p wartość korelacji (r)
Typ histologiczny nowotworu			
Rak prosty cewkowo- brodawkowy	17 (32,07%)	14 (26,4%)	¹ p >0,05
Rak prosty cewkowy	15 (28,3%)	11 (20,7)%	
Rak mieszany	13 (24,6%)	7 (13,2%)	
Rak lity	4 (7,5%)	4 (7,5%)	
Rak złożony	3 (5,7%)	3 (5,7%)	

Rak cewkowo torbielowaty	1 (1,9%)	1 (1,9%)	
Stopień histologicznej złośliwości G (Grade)			
I ° (G1)	29 (54,7%)	28 (52,8%)	² p <0,05 r=0,38
II ° (G2)	23 (43,4%)	23 (43,4%)	
III ° (G3)	1 (1,9%)	1 (1,9%)	
Ki-67			
-	27 (51%)	20 (23%)	² p <0,05 r=0,26
+	26 (49%)	18 (20,6%)	
HER2			
-	28 (52,8%)	28 (52,8%)	² p >0,05
+	25 (47,2%)	24 (45,3%)	
VIM			
-	33 (62,3%)	32 (60,3%)	² p <0,05 r=0,23
+	20 (37,7%)	20 (37,7%)	
Zajęcie naczyń			
-	34 (64,2%)	33 (62,3%)	³ p=0,02
+	19 (35,8%)	19 (35,8%)	

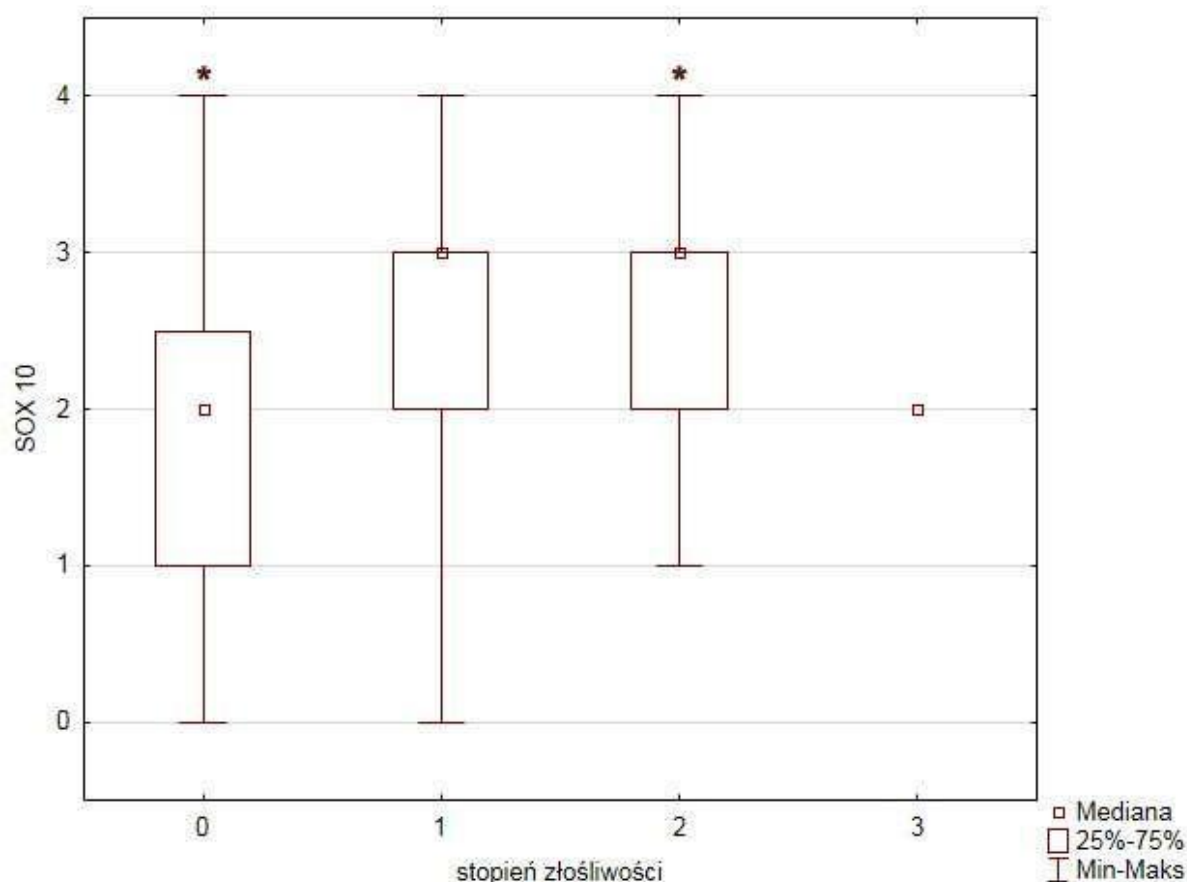
¹ wartość p dla analizy Kruskala-Wallis; ² wartość p dla testu korelacji rang Spearmana i odpowiadająca jej wartość r; ³ wartość p dla analizy U Manna-Whitneya.

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w poziomie ekspresji SOX 10 w komórkach nowotworowych w zależności od typu histopatologicznego raka sutka. Wykazano natomiast istotnie wyższą ekspresję w raku prostym cewkowym w porównaniu do tkanki zdrowej (p=0,008 dla wszystkich grup; p=0,02 dla porównania tkanki zdrowej i raka prostego

cewkowego w teście post-hoc; test Kruskala-Wallisa) oraz w raku mieszanym w porównaniu do tkanki zdrowej ($p=0,008$ dla wszystkich grup; $p=0,03$ dla porównania tkanki zdrowej i raka mieszanego; test Kruskala-Wallisa).

Stwierdzono średnio stopnia pozytywną korelację ekspresji SOX 10 i stopnia złośliwości histologicznej guza ($p < 0,05$, $r=0,38$; test korelacji Spearmana) oraz istotnie niższą ekspresję białka w guzach niezłośliwych w porównaniu do guzów o stopniu złośliwości G2 ($p=0,004$ dla wszystkich grup; $p=0,009$ dla porównania nowotworów łagodnych z nowotworami złośliwymi o 2 stopniu histologicznej złośliwości G2 w teście post-hoc; analiza Kruskala-Wallisa; Ryc. 9).

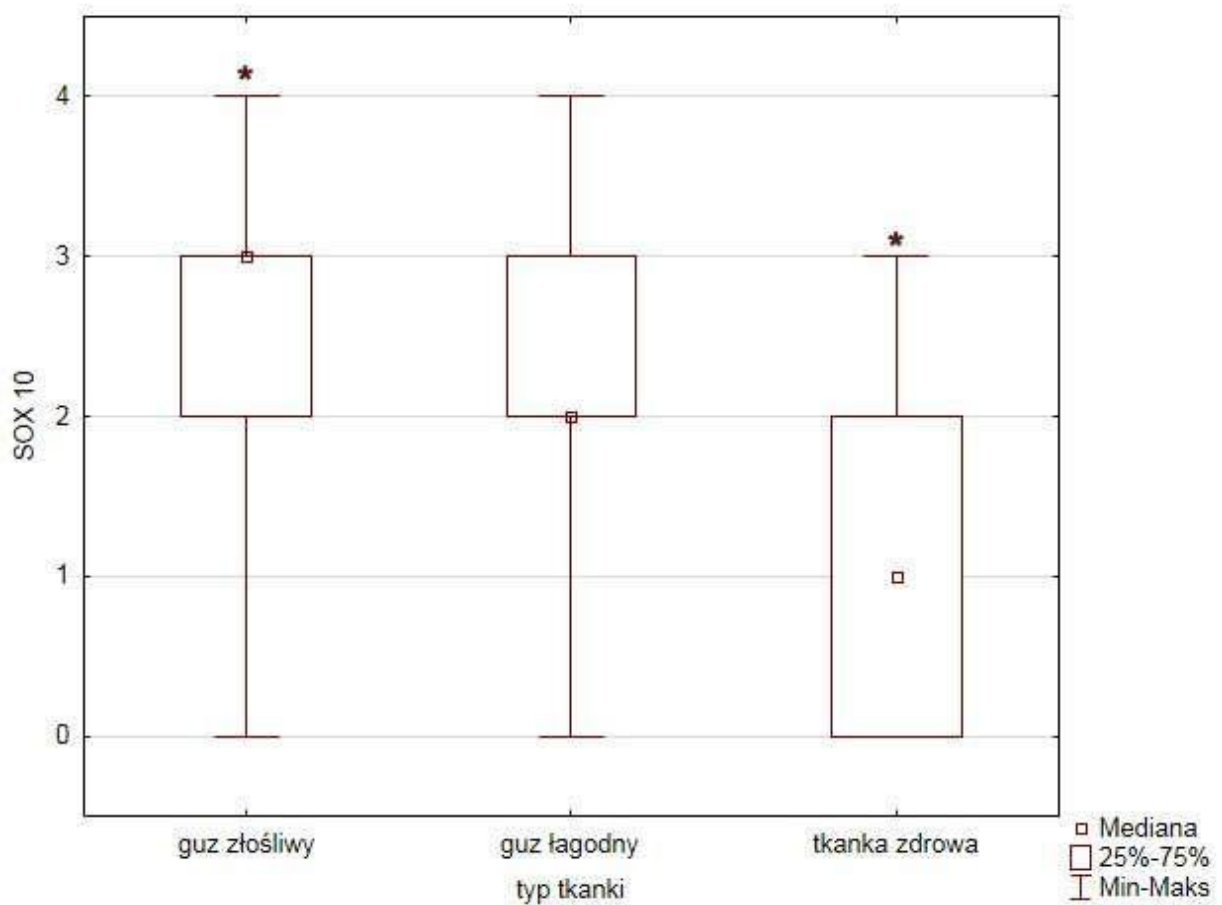


Ryc. 9. Zależność ekspresji SOX 10 od stopnia złośliwości guzów. Istotną statystycznie różnicę wykazano między guzami niezłośliwymi, a guzami o stopniu złośliwości G2 ($p=0,009$; analiza Kruskala-Wallisa).

Analiza statystyczna wykazała dodatnią słabą korelację ekspresji SOX 10 z ekspresją Ki-67 (analiza korelacji Spearmana; $p < 0,05$; $r = 0,26$).

Wykazano istotną statystycznie wyższą ekspresję SOX 10 w guzach złośliwych w

porównaniu z tkanką prawidłową ($p=0,001$ dla wszystkich grup; $p=0,002$ dla porównania tkanki zdrowej i guzów złośliwych w teście post-hoc; test Kruskala-Wallis; Ryc. 10).

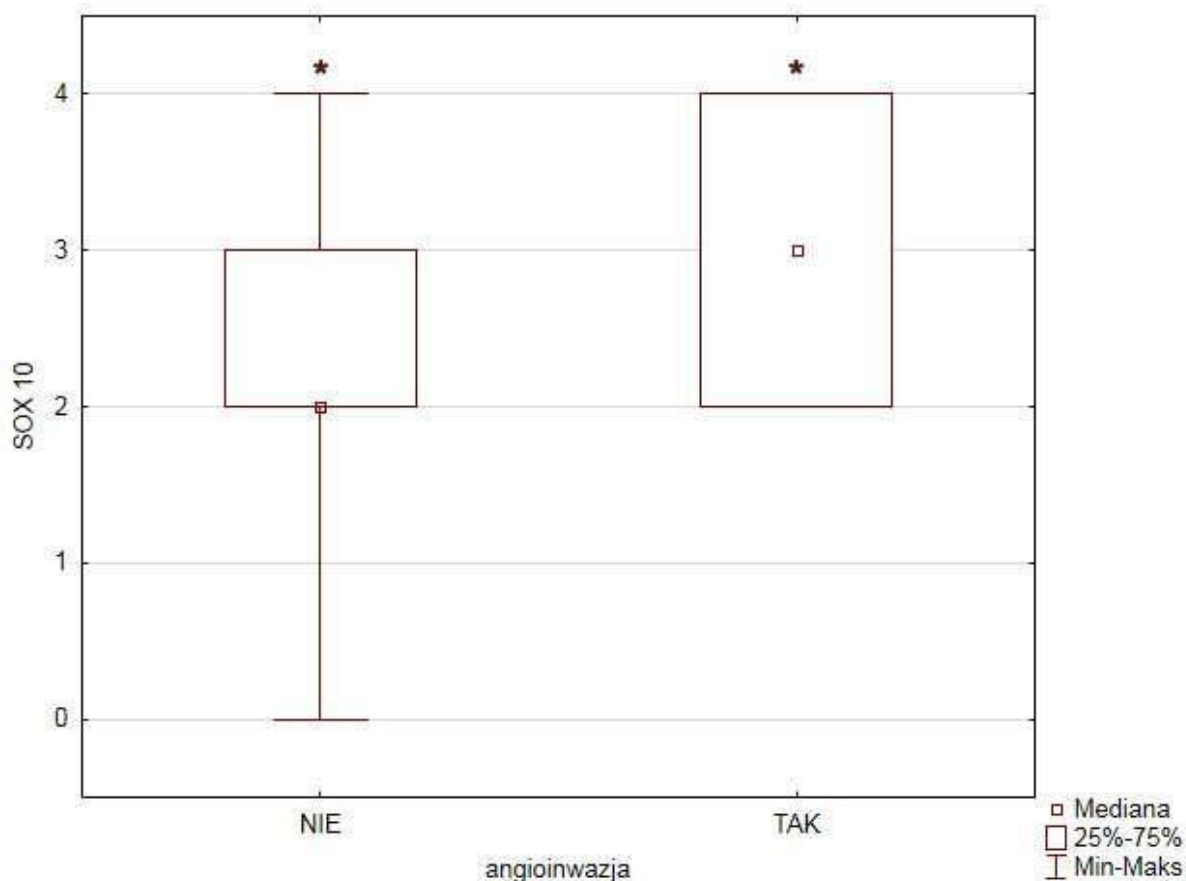


Ryc. 10. Zależność ekspresji SOX 10 od rodzaju badanej tkanki. Istotną statystycznie różnicę wykazano między guzami złośliwymi, a tkanką zdrową ($p=0,002$; analiza Kruskala-Wallis).

Stwierdzono słabą pozytywną korelację ekspresji SOX 10 z ekspresją wimentyny ($p < 0,05$; $r=0,23$; test korelacji Spearmana)

Brak istotnej statystycznie korelacji między poziomem ekspresji SOX 10 w komórkach nowotworowych a stopniem ekspresji HER2 ($p > 0,05$).

Ponadto stwierdzono istotnie wyższą ekspresję SOX 10 w nowotworach wykazujących cechy angiogenezji ($p=0,02$; test U Manna-Whitena; Ryc. 11)



Ryc. 11. Zależność ekspresji SOX 10 od angioinwazji komórek nowotworowych. Stwierdzono wyższą ekspresję SOX 10 w nowotworach wykazujących naciekanie naczyń ($p=0,02$; test U Manna-Whitneya).

5.5.5 Testyna

Ekspresja testyny w tkance prawidłowej

Wszystkie 10 próbek prawidłowej tkanki gruczołu sutkowego (100%; $n=10$) wykazywały dodatnią ekspresję testyny, 30% próbek ($n=3$) wykazywało najwyższą ekspresję (3 pkt. w skali Remmele), 30% ($n=3$) wykazywało umiarkowaną ekspresję (2 pkt. w skali Remmele), a 40% wykazywało słabą reakcję (1 pkt. w skali Remmele).

Ekspresja testyny w zmianach łagodnych

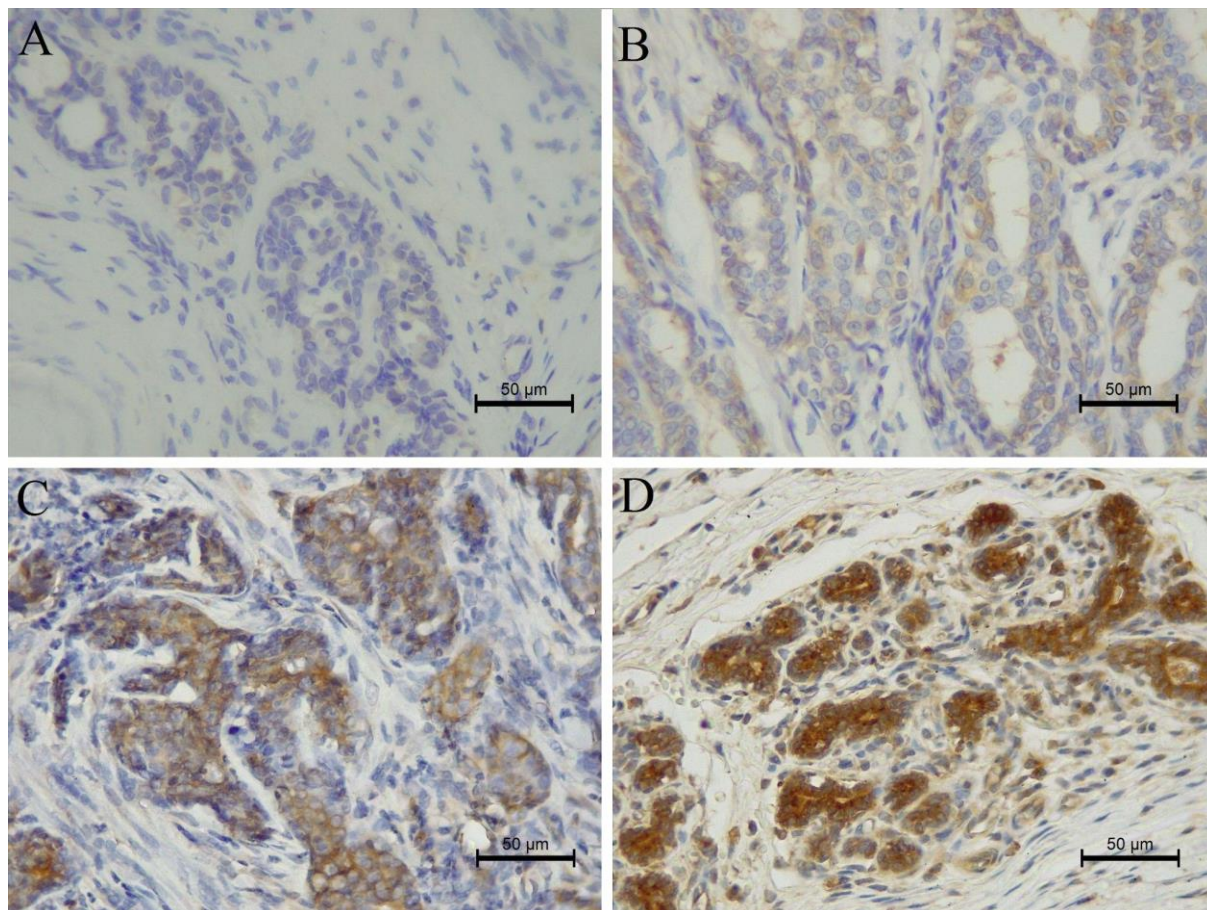
W przypadku nowotworów łagodnych ekspresję testyny zaobserwowano w 100% ($n=14$) guzów łagodnych, wśród nich 78,55% wykazało najwyższą ekspresję (3 pkt. w skali Remmele), 7,15% ($n=1$) (2 pkt. w skali Remmele), 14,3% ($n=2$) (1 pkt. w skali Remmele).

Ekspresja testyny w zmianach złośliwych

Ekspresję testyny obserwowano w cytoplazmie komórek nowotworu złośliwego w 86,8% przypadków (n=46) raków, z czego 24,5% zmian (n=13) charakteryzowało się dużą intensywnością ekspresji testyny na poziomie 3 punktów w skali Remmele, 49% zmian (n=24) o umiarkowanym natężeniu ekspresji tj. 2 pkt. i 13,2% zmian (n=7) o niskim natężeniu ekspresji tj. 1pkt. i 13,2% (n=7) nie wykazywało ekspresji. (Tabela XVI)

Ekspresję testyny w cytoplazmie komórek nowotworowych stwierdzono w 52,8% raków (n=28) w 1 stopniu histologicznej złośliwości (G1), w 43,4% przypadków (n=23) w stopniu 2 (G2) i w 1,9% przypadków (n=1) w stopniu 3 (G3) (Tabela XVI).

Zestawienie intensywności ekspresji testyny w komórkach nowotworowych oraz zależności między stopniem histologicznej złośliwości (G) a ekspresją Ki-67, HER2 , VIM oraz zajęciem naczyń krwionośnych w nowotworach złośliwych przedstawiono w tabeli XVI. Przykładowe reakcje immunohistochemiczne zostały przedstawione na rycinie 12.



Ryc. 12. Ekspresja testyny w zmianach złośliwych A. Brak reakcji, B. Reakcja IRS oceniona na 1 pkt. C. Reakcja IRS oceniona na 2 pkt. D. Reakcja IRS oceniona na 3 pkt. Powiększenie 400x.

Tabela XVI. Zależność ekspresji TES od parametrów kliniczno-patologicznych.

	Liczba przypadków n (%)	Ekspresja TES w komórkach nowotworowych n (%)	wartość p wartość korelacji (r)
Typ histologiczny nowotworu			
Rak prosty cewkowo-brodawkowy	17 (32,07%)	15(28,3%)	¹ p=0,01
Rak prosty cewkowy	15(28,3%)	15 (28,3%)	
Rak mieszany	13(24,6%)	7 (13,2%)	
Rak lity	4 (7,5%)	4 (7,5%)	
Rak złożony	3 (5,7%)	2 (3,8%)	
Rak cewkowo torbielowaty	1(1,14%)	1(1,14%)	
Stopień histologicznej złośliwości G (Grade)			
I ° (G1)	29 (54,7%)	24 (45,2%)	² p<0.05 r=-0,03
II ° (G2)	23 (43,4%)	21 (39,6%)	
III ° (G3)	1 (1,9%)	1 (1,9%)	
Ki-67			
-	27 (51%)	21(39,6%)	p>0,05
+	26 (49%)	25 (47,2%)	
HER2			
-	28 (52,8%)	25 (47,2%)	p>0,05
+	25 (47,2%)	22 (41,5%)	
VIM			
-	33(62,3%)	27 (50,9%)	p>0,05
+	20 (37,7%)	19 (35,8%)	

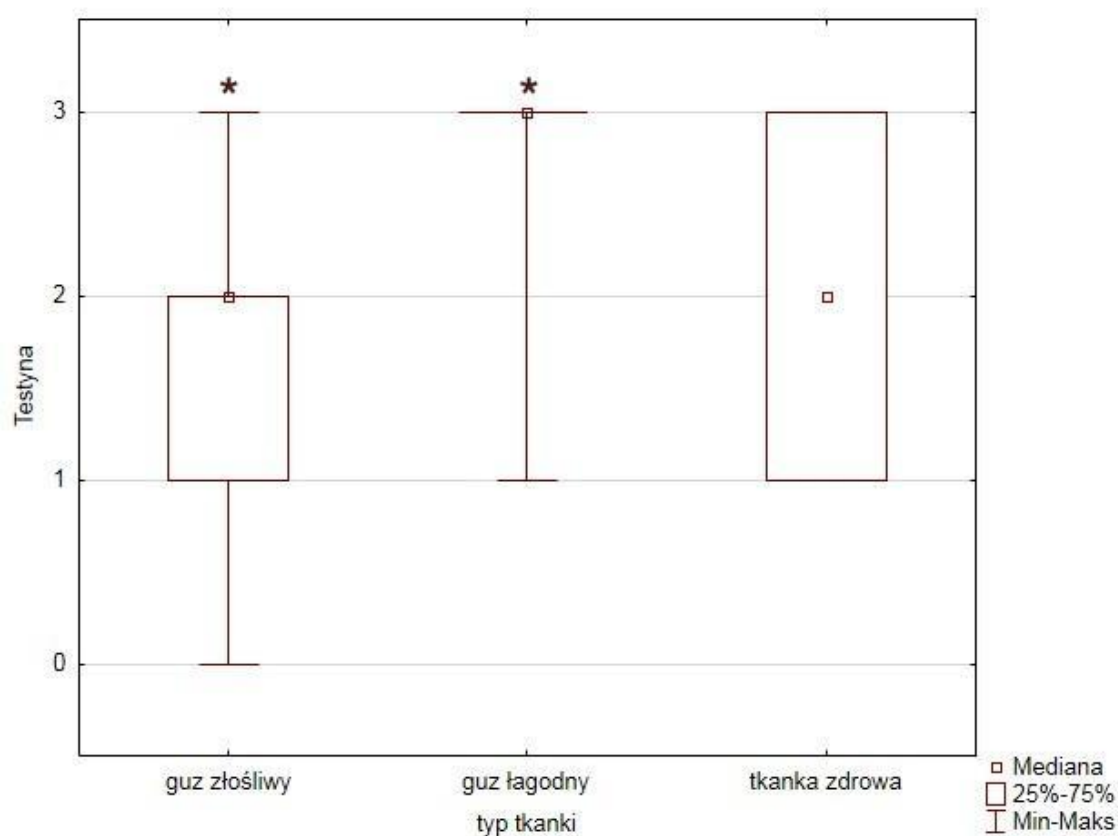
Zajęcie naczyń			
-	34 (64,2%)	30 (56,6%)	p >0,05
+	19 (35,8%)	16 (30,1%)	

¹ wartość p dla analizy Kruskala-Wallisa; ² wartość p dla testu korelacji rang Spearmana i odpowiadająca jej wartość r; ³ wartość p dla analizy U Manna-Whitneya.

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna wykazała słabą negatywną korelację ekspresji TES ze stopniem histologicznej złośliwości (G) ($p < 0,5$; $r = -0,3$).

Wykazano istotnie statystycznie niższą ekspresję w guzach złośliwych w porównaniu z guzami łagodnymi ($p = 0,008$; dla wszystkich grup; $p = 0,01$ dla porównania guzów niezłośliwych i złośliwych w teście post-hoc; test Kruskala-Wallisa; ryc. 13). Stwierdzono istotnie wyższą ekspresję w gruczolaku prostym w porównaniu do raka mieszanego ($p = 0,01$ dla wszystkich grup; $p = 0,047$ dla porównania gruczolaka prostego i raka mieszanego w teście post-hoc; analiza Kruskala-Wallisa).



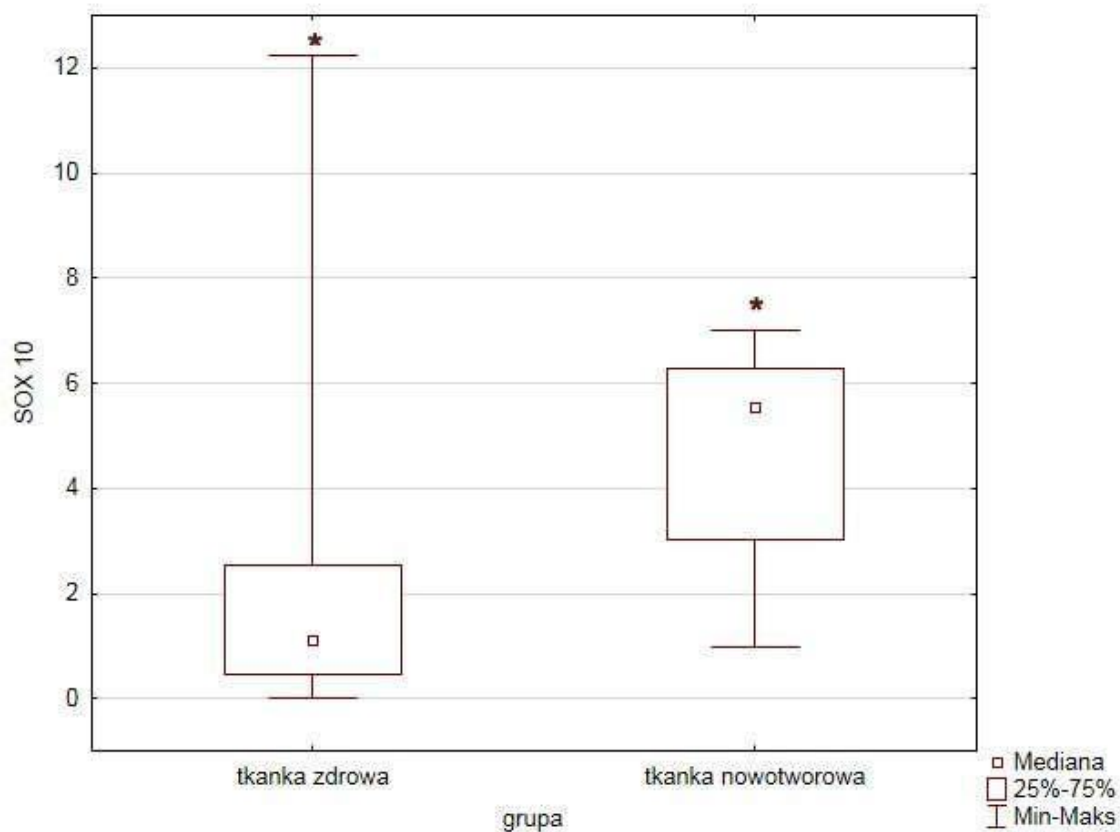
Ryc. 13. Zależność ekspresji testyny od rodzaju badanej tkanki. Istotną statystycznie różnicę

wykazano między guzami złośliwymi, a guzami łagodnymi ($p=0,01$; analiza Kruskala-Wallisa).

Brak istotnej statystycznie korelacji między poziomem ekspresji TES w komórkach nowotworowych a stopniem ekspresji HER2 ($p>0,05$), Ki-67, Vim, zajęciem naczyń krwionośnych. (tabela XVI).

5.6 PCR w czasie rzeczywistym.

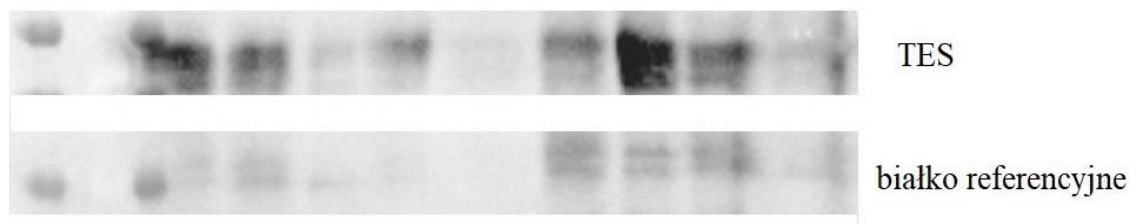
Ekspresję genu *SOX10* na poziomie mRNA stwierdzono w 100% ($n=17$) analizowanych guzów sutka oraz w 90% ($n=9$) próbek prawidłowej tkanki gruczołowej. Wyższy poziom ekspresji *SOX10* obserwowano na poziomie mRNA w guzach złośliwych w porównaniu z tkanką prawidłową ($p=0,006$; analiza U Manna-Whitneya; ryc. 14).



Ryc. 14. Różnica poziomu ekspresji *SOX10* w tkance nowotworowej i tkance zdrowej ($p=0,006$; analiza U Manna-Whitneya).

5.7 Immunoblotting

Ekspresję Testyny w badanej tkance gruczołu sutkowego wykazano za pomocą metody Western Blott. Białko kontrolne stanowiła B-aktyna.



Ryc 15. Wydajność transfekcji poziomów białka TES mierzona metodą analizy Western Blott

6. Podsumowanie wyników

6.1. SOX 10

1. stwierdzono istotnie wyższą ekspresję w guzach złośliwych w porównaniu z tkanką zdrową ($p=0,001$ dla wszystkich grup; $p=0,002$ dla porównania tkanki zdrowej i guzów złośliwych w teście post-hoc; test Kruskala-Wallisa)
2. stwierdzono istotnie niższe wartości ekspresji SOX 10 na poziomie mRNA w tkance zdrowej w porównaniu do tkanki nowotworowej $p=0.006$ Test U Manna-Whitneya
3. stwierdzono istotnie wyższą ekspresję w raku prostym cewkowym w porównaniu do tkanki zdrowej ($p=0,008$ dla wszystkich grup; $p=0,02$ dla porównania tkanki zdrowej i raka prostego cewkowego w teście post-hoc; test Kruskala-Wallisa) oraz w raku mieszanym w porównaniu do tkanki zdrowej ($p=0,008$ dla wszystkich grup; $p=0,03$ dla porównania tkanki zdrowej i raka mieszanego; test Kruskala-Wallisa)
4. stwierdzono pozytywną korelację ekspresji i stopnia złośliwości histologicznej guza ($p\leq 0,05$, $r=0.38$; test korelacji Spearmana) oraz istotnie niższą ekspresję białka w guzach łagodnych w porównaniu do guzów o 2 stopniu złośliwości G 2 ($p=0,004$ dla wszystkich grup; $p=0,009$ dla porównania stopnia 0 i 2 w teście post-hoc; analiza Kruskala-Wallisa)
5. stwierdzono istotnie wyższą ekspresję w guzach charakteryzujących się obecnością angioinwazji ($p=0,02$; test U Manna-Whitneya)
6. stwierdzono pozytywną korelację między ekspresją SOX10 a ekspresją Ki-67 ($p<0,05$; $r=0,26$; test korelacji Spearmana)
7. stwierdzono pozytywną korelację ekspresji SOX10 z ekspresją wimentyny ($p<0,05$; $r=0,23$; test korelacji Spearmana)

6.2. TES

1. stwierdzono istotnie niższą ekspresję w guzach złośliwych w porównaniu z guzami łagodnymi ($p=0,008$ dla wszystkich grup; $p=0,01$ dla porównania guzów niezłośliwych i złośliwych w teście post-hoc; test Kruskala-Wallisa)
2. stwierdzono istotnie wyższą ekspresję w gruczolaku prostym w porównaniu do raka mieszanego ($p=0,01$ dla wszystkich grup; $p=0,047$ dla porównania gruczolaka prostego i raka mieszanego w teście post-hoc; analiza Kruskala-Wallisa).
3. stwierdzono słabego stopnia negatywną korelację ekspresji i stopnia złośliwości histologicznej guza ($p\leq 0,05$, $r= -0.30$; test korelacji Spearmana)

4. stwierdzono istotnie niższą ekspresję w guzach złośliwych w porównaniu z guzami łagodnymi ($p=0,008$ dla wszystkich grup; $p=0,01$ dla porównania guzów niezłośliwych i złośliwych w teście post-hoc; test Kruskala-Wallisa)
5. nie stwierdzono istotnie wyższej ekspresji w guzach charakteryzujących się obecnością angioinwazji ($p>0,05$; test U Manna-Whitneya)

7. Dyskusja

Guzy sutka u psów to złożona grupa nowotworów wykazujących dużą różnorodność w obrazie histologicznym ze względu na możliwy udział w rozroście zarówno komórek nabłonka, komórek mioepitelialnych oraz mezenchymalnych. Komórki nabłonkowe mogą, na drodze tak zwanego przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT), zyskać fenotyp przypominający mezenchymalny. Zjawisko to można podzielić na wiele etapów w które zaangażowana jest zmiana ekspresji białek. Konsekwencją tego może być utrata połączeń międzykomórkowych, zmiana polaryzacji komórki i typu migracji (60). Komórki nowotworowe mogą wykazywać stadia pośrednie pomiędzy dwoma fenotypami: fenotypem charakterystycznym dla komórek nabłonkowych i komórek mezenchymalnych, przechodząc niepełne EMT. Przeprogramowanie komórek podczas EMT jest kierowane przez plejotropowe czynniki transkrypcyjne. Komórki poprzez utratę polaryzacji oraz zmianę w strukturze cytoszkieletu nabywają zdolności migracyjnych. Zmieniają się poziomy ekspresji białek uważanych za markery procesu EMT. Wszystkie te modyfikacje zwiększają potencjał migracyjny i inwazyjny komórek nowotworowych.

Onkologia eksperymentalna sugeruje podobieństwa między nowotworem piersi u kobiet, a rakiem gruczołu sutkowego u suk. Obejmują one etiologię, aktywację szlaków sygnałowych i klasyfikację histologiczną (2,11). Guzy sutka psów, molekularnie odzwierciedlają potrójnie negatywnego raka piersi TNBC. Ten podtyp guza piersi jest najtrudniejszy do zdiagnozowania i leczenia. Według badań Abadie i wsp. (11) raki sutka u psów zostały sklasyfikowane zgodnie z zaleceniami WHO, a 76,3 % badanych guzów, było zakwalifikowanych jako potrójnie negatywne. Inne badanie Im i wsp. (16) wykazało, że rak prosty cewkowy i raki mieszane były często klasyfikowane jako luminalne A, rak lity był często klasyfikowany jako typ podstawny.

Psy są zatem potencjalnie dobrym modelem raka sutka u kobiet szczególnie w przypadku potrójnie negatywnego raka piersi. W badaniu przeprowadzonym przez Goldschmidt i wsp. (45) zbadano 229 guzów, z których 169 (74%) było złośliwych, a 60 (26%) łagodnych. Według opisanych badań wśród nowotworów złośliwych najczęściej występuje rak złożony (13,6%), następnie złośliwa mioepitelioma (11,8%), rak lity (11,8%), rak anaplastyczny (10,6%), rak czopiasty (10%), rak prosty cewkowy (8,9%), rak wywodzący się z łagodnego guza mieszanego (8,3%), rak prosty cewkowo-brodawkowy (7,1%), rak brodawkowaty wewnątrzprzewodowy (7,1%), i mięsakorak (4,7%). Proliferacja komórek

mioepitelialnych jest znacznie częstsza u pacjentów weterynaryjnych i występuje w ponad 20% raków gruczołu sutkowego u psów w porównaniu z mniej niż 0,1% w rakach gruczołu sutkowego u kobiet. Raki proste u psów nie wykazują proliferacji komórek mioepitelialnych, podczas gdy raki złożone wykazują proliferację zarówno komórek nabłonkowych jak i mioepitelialnych. W naszym badaniu najczęstszymi nowotworami złośliwymi były raki proste cewkowo-brodawkowe, rak prosty cewkowy, rak mieszany, rak lity i rak złożony. Omawiane w niniejszej pracy białka zostały przeanalizowane w różnych typach nowotworów sutka u kobiet. Szczególnie ciekawe wydają się prace uwzględniające ich znaczenie w patogenezie raków potrójnie ujemnych. Jednym z nich jest białko SOX 10.

Dokładny mechanizm działania SOX 10 nie jest do końca znany, aczkolwiek wiele danych wskazuje na jego rolę w powstawaniu i rozprzestrzenianiu się nowotworów. Interesujące są interakcje molekularne i analiza sygnalizacji, które są wymagane w różnych procesach karcynogenezy w celu zapewnienia właściwości progenitorowych nowotworowych komórek macierzystych (CSC), wystąpienia przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego, inwazji komórek, różnicowania komórek oraz ich apoptozy (70).

SOX 10 może odgrywać rolę regulacyjną w komórkach nabłonka prawidłowego gruczołu piersiowego. Stwierdzono że wyciszenie genu *SOX10* obniża aktywność progenitorową, podczas gdy ektopowa aktywacja *SOX10* może indukować proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) (104,113), SOX 10 reguluje szlak sygnałowy Wnt / β katenina w różnych procesach rozwojowych, bierze również udział w powstawaniu nowotworów piersi (73). Podczas procesu transformacji nowotworowej czynniki SOX działają jako czynniki transkrypcyjne. Innym szlakiem odgrywającym rolę w procesie nowotworzenia jest szlak sygnalizacyjny Notch, Aktywacja tego szlaku może sprzyjać rozwojowi i progresji wielu nowotworów (78).

SOX 10 w biologii ludzkich komórek był początkowo uważany za marker komórek podstawnych i mioepitelialnych w gruczole piersiowym u kobiet. SOX 10 ulega ekspresji na niskim poziomie w prawidłowych tkankach u ludzi (91,95). W patologii człowieka, oznaczenie immunohistochemiczne SOX 10 jest stosowana głównie do identyfikacji guzów wywodzących się z grzebienia nerwowego. Jest przede wszystkim znany jako marker nowotworów melanocytarnych, głównie czerniaków (96-100), ale ostatnie badania wskazują na jego rolę w kancerogenezie raka piersi (112).

Ekspresję SOX 10 stwierdzono w prawidłowej tkance gruczołu sutkowego, zarówno w komórkach mioepitelialnych jak i nabłonkowych (98), jednak ulega on ekspresji na niskim

poziomie w prawidłowych tkankach człowieka. W naszym badaniu zaobserwowaliśmy ekspresję SOX 10 w 70% próbek zdrowej tkanki gruczołu sutkowego, ekspresję zaobserwowano głównie w komórkach nabłonkowych, jedynie pojedyncze komórki mioepitelialne wykazały reakcję barwną. Ekspresja SOX 10 w tkance prawidłowej była istotnie statystycznie niższa w porównaniu do zmian złośliwych. Stwierdziliśmy również istotne różnice w ekspresji SOX 10 między rakami prostymi cewkowymi oraz mieszanymi, a tkanką prawidłową. Ekspresja SOX 10 w tych typach nowotworów była istotnie wyższa w porównaniu do niezmięnionej tkanki gruczołowej. Ekspresję SOX 10 w ludzkim raku piersi stwierdzono głównie w podtypie TNBC oraz typie basal-like, które charakteryzują się słabo zróżnicowanym fenotypem i agresywnym przebiegiem klinicznym w porównaniu z podtypem luminalnym (112).

W piśmiennictwie wskazuje się na związek między ekspresją SOX 10 a czynnikami kliniczno-patologicznymi, m.in. stopniem złośliwości histologicznej. Kriegsmann i wsp. (105) uzyskali dodatnią korelację między nasileniem ekspresji SOX 10 w komórkach nowotworowych a stopniem złośliwości histologicznej raka piersi u kobiet. Podobną zależność zaobserwowano w badaniu Jin i wsp. (115). W TNBC ekspresja SOX 10 była istotnie skorelowana ze stopniem histologicznej złośliwości guzów. Ekspresja SOX 10 w guzach o stopniu złośliwości G3 była znacznie wyższa niż w guzach o niższym stopniu złośliwości. Dokonaliśmy nieco innych obserwacji, w grupie badanej najwyższy poziom ekspresji SOX 10 odnotowaliśmy w guzach w stopniu złośliwości G2. W badaniach Jin i wsp. ekspresja SOX 10 była również istotnie związana ze stopniem zaawansowania choroby. Ograniczeniem mojego badania jest niepełna historia leczenia każdego z pacjentów, z tego względu ustalenie korelacji między ekspresją SOX 10, a stopniem zaawansowania klinicznego oraz czasu wolnego od choroby i czasu przeżycia, wymaga wieloletniej obserwacji grupy pacjentów. Zespół badaczy kierowany przez Jin i wsp. zaobserwowali również wyższą ekspresję SOX 10 w guzach w późnym stadium w porównaniu do guzów we wczesnym stadium. Nie stwierdzono jednak istotnej korelacji z innymi cechami kliniczno-patologicznymi pierwotnego TNBC, w tym z wiekiem zachorowania, średnicą guza i typem histologicznym. W naszych badaniach nie zaobserwowaliśmy również istotnej statystycznie korelacji między wiekiem pacjentek, a średnicą guza. W naszej pracy przeanalizowaliśmy inne czynniki determinujące agresywność nowotworu oraz korelację z nasileniem ekspresji SOX 10. Jednym z nich jest marker proliferacji komórek Ki-67, który jest czynnikiem prognostycznym i predykcyjnym nawrotu w różnych podtypach molekularnych raka piersi. Jego wysoka ekspresja jądrowa świadczy o

niekorzystnym rokowaniu dla pacjentki. W mojej analizie wykazano dodatnią korelację między ekspresją SOX 10 a ekspresją antygenu proliferacji komórkowej Ki-67 w komórkach nowotworowych raka sutka. Ekspresja SOX 10 w komórkach nowotworowych i intensywność ekspresji Ki-67 w raku piersi u kobiet zaobserwowano w badaniach Hoang i Liu a jego ekspresja była istotnie niższa w zmianach łagodnych. W przypadku naszej grupy badanej stwierdzono słabą pozytywną korelację między ekspresją tych dwóch białek. Wyniki naszych badań wskazują, że SOX 10 może być związany z progresją raka gruczołu sutkowego u suk. W naszym badaniu poddaliśmy analizie inne czynniki determinujące zwiększoną agresywność nowotworów gruczołu sutkowego u suk. Zaobserwowaliśmy wyraźnie większą ekspresję SOX 10 w nowotworach w których doszło do zajęcia naczyń krwionośnych. Ten parametr wiąże się z niekorzystnym rokowaniem zarówno w onkologii człowieka, jak i w onkologii weterynaryjnej. Kolejnym markerem stosowanym w diagnostyce raka piersi jest HER2. Cechą charakterystyczną TNBC jest brak receptorów ER, PR i HER2. W rakach gruczołu sutkowego ekspresja SOX 10 była wyższa w guzach HER2-ujemnych. W naszym badaniu ocenialiśmy HER2 w nowotworach złośliwych i łagodnych. Zaobserwowaliśmy ekspresję SOX 10 zarówno w zmianach HER2-dodatnich i guzach HER2-ujemnych, nie wykazaliśmy korelacji między ekspresją HER2 i SOX 10.

Brak ekspresji HER2 jest często związany z guzami nisko zróżnicowanymi, raki potrójnie negatywne, które wykazują największe poziomy ekspresji SOX 10, zostały powiązane z promocją przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). W badaniu Kriegsmann i wsp. (106) porównywano ekspresję SOX 10 w guzach wykazujących ekspresję wimentyny czyli jednego z markerów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego. Stwierdzono dodatnią korelację między ekspresją tych dwóch markerów. W naszych badaniach stwierdzono słabą dodatnią korelację między wyżej wymienionymi białkami Teoria, że TNBC wywodzi się z komórek mioepitelialnych piersi, wyjaśnia, dlaczego SOX 10 ulega większej ekspresji w TNBC, a w przypadku psów, w rakach mieszanych, w których istotna jest komponenta mioepitelialna.

W rakach gruczołu piersiowego wskazuje się również na związek ekspresji SOX 10 z markerami EMT, np wimentyną. Koekspresja tych dwóch markerów wiązała się z niekorzystnym rokowaniem u pacjentów (106). W naszej pracy odnotowaliśmy wyższą ekspresję wimentyny w nowotworach z komponentą mezenchymalną, jak również zmianach wysoce agresywnych. Podobne obserwacje poczyniono w rakach sutka u człowieka. W naszych badaniach mimo iż wimentyna wiązała się z większą agresywnością nowotworu,

zaobserwowaliśmy jedynie słabą dodatnią korelację między tymi dwoma parametrami.

SOX 10 wiąże się również z fenotypem komórek macierzystych raka piersi. Badania wykazują iż wyciszenie *SOX10* hamuje cechy TNBC. W pracy Feng i wsp. (96) stwierdzono iż ekspresja *SOX10* na poziomie mRNA, jest wykazywana głównie w TNBC oraz komórkach macierzystych. W naszych badaniach stwierdziliśmy ekspresję białka SOX 10 w różnych typach histologicznych nowotworów. Nie zaobserwowano zależności od stopnia histologicznej złośliwości. Zauważyliśmy natomiast wyraźnie niższy poziom ekspresji *SOX10* na poziomie mRNA w tkance niezmięnionej nowotworowo.

W naszych badaniach zaobserwowaliśmy najwyższy poziom SOX 10 w nowotworach złośliwych i był on istotnie wyższe w porównaniu ze zmianami łagodnymi. W guzach gruczołu sutkowego u psów wykazano, że mają one zróżnicowanie nabłonkowe i mioepitelialne, co może wyjaśniać, dlaczego różne rodzaje raka u psów wykazują dodatnią ekspresję jądrową SOX 10.

Ostatnie badania z wykorzystaniem materiału raka gruczołu piersiowego u człowieka sugerują ważną rolę testyny jako białka supresorowego w wielu typach nowotworów (119). W naszych badaniach staraliśmy się wykazać jej rolę w kancerogenezie raka sutka u psów. Ekspresja testyny jest obserwowana w prawidłowych tkankach człowieka. Odpowiada m.in za połączenia międzykomórkowe oraz miejscową adhezję komórek. Brak ekspresji lub zmniejszenie jej intensywności w komórkach objętych procesami patologicznymi, sugerują rolę testyny jako supresora nowotworów. Zauważono iż ekspresja genu *TES* wpływała na zahamowanie proliferacji komórek, zmniejszenie zdolności do inwazji oraz angiogenezy. Natomiast zmniejszenie ekspresji tego białka wiązało się ze zwiększeniem nasilenia wyżej wymienionych procesów. Zjawisko spadku ekspresji testyny wraz ze zwiększającym się stopniem zaawansowania choroby, może sugerować, rolę tego białka jako biomarkera procesu nowotworowego. Wielu badaczy dostrzega jej rolę w kancerogenezie raka piersi, przede wszystkim raka potrójnie negatywnego TNBC u kobiet.

Testyna może odgrywać podobną rolę w procesach onkogenezy zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Analiza piśmiennictwa wskazuje na rolę testyny jako potencjalnego czynnika prognostycznego. Znana jest jej funkcja supresorowa w wielu rodzajach nowotworów u ludzi, w tym raku piersi u kobiet (87). Jednak jego rola w progresji guza sutka u psów pozostaje nieznana.

Wysoką ekspresję testyny obserwuje się głównie w prawidłowej tkance gruczołu sutkowego u kobiet, zmniejsza się ona wraz z nasileniem procesów patologicznych (87). W

naszej analizie, również stwierdziliśmy wysoką ekspresję testyny w tkance prawidłowej, była ona istotnie wyższa niż w zmianach nowotworowych. Literatura opisuje różne poziomy intensywności testyny w nowotworach piersi u kobiet (87). W badaniach Sarti i wsp. (117) obniżoną ekspresję testyny w komórkach nowotworowych zaobserwowano w 57,7% przypadków. Dalsze badania przeprowadzone przez ten sam zespół badaczy, wykazały statystycznie istotny związek między obniżeniem poziomu TES a wysoce agresywnymi podtypami guzów piersi, takimi jak guzy potrójnie ujemne i nowotwory luminalne B (131). Zhu i wsp. (87) potwierdzili ponadto, że gen *TES* hamował inwazję, przerzuty i angiogenezę poprzez hamowanie metaloproteinazy 2 (MMP-2) w raku piersi. W naszych badaniach ekspresję testyny stwierdzono we wszystkich próbkach tkanki prawidłowej oraz w gruczolakach, natomiast w przypadku nowotworów złośliwych ekspresję testyny stwierdzono w 87% przypadków raka gruczołu sutkowego. Poziom ekspresji TES w komórkach nowotworowych był istotnie niższy w stosunku do gruczolaków i prawidłowej tkanki gruczołu sutkowego. Zaobserwowaliśmy również słabego stopnia negatywną korelację jej ekspresji i stopnia złośliwości histologicznej nowotworu. Wynik ten wskazuje, że testyna może być zaangażowana w proces transformacji nowotworowej i może odgrywać rolę jako białko supresorowe rozwoju choroby. W badaniu Zhu i wsp. (87) określono związek ekspresji testyny z klinicznymi cechami raka piersi. Słabsza ekspresja genu *TES* w badanym materiale wiązała się z niekorzystnymi parametrami klinicznymi takimi jak czas wolny od choroby, czas wolny od przerzutów oraz czas przeżycia całkowitego. Zaobserwowano istotne korelacje między ujemnym obniżeniem ekspresji testyny a zmniejszeniem czasów we wszystkich wyżej wymienionych kategoriach przeżycia. Nie wykryto znaczenia prognostycznego w grupach HER2-dodatnich i HER2-ujemnych. W naszym badaniu nie zaobserwowaliśmy korelacji między ekspresją HER2, a ekspresją testyny, jak również na podstawie danych kliniczno-patologicznych o badanej grupie nie jesteśmy w stanie jednoznacznie określić wpływu ekspresji testyny na przeżycie pacjentów weterynaryjnych.

Nasze badanie jest pierwszą próbą wyjaśnienia supresorowej roli testyny w progresji raka sutka u psów. Część badań sugeruje iż testyna ma pewne właściwości markerów procesu EMT, zaobserwowano iż spadek ekspresji testyny korelował ze zwiększeniem ekspresji wimentyny w komórkach raka sutka u kobiet (155).

Wimentyna (VIM) jest stosowana klinicznie do identyfikacji guzów mezenchymalnych i mięsaków, ale wykazano, że jej ekspresja jest podwyższona w kilku agresywnych liniach komórkowych raka piersi, a ta nadekspresja z kolei była skorelowana ze zwiększoną migracją

i inwazyjnością komórek raka piersi. W rakach gruczołu piersiowego dodatnią ekspresję wimentyny stwierdzono głównie w rakach przewodowych o wysokim stopniu złośliwości z niskimi poziomami receptora estrogenowego. Kilka innych badań wykazało nadmierną ekspresję wimentyny w liniach komórkowych i tkankach raka piersi. Wimentyna odgrywa główną rolę w procesie EMT raka piersi, W badaniu Dong i wsp.(86) wykazano obniżenie ekspresji genu *TES* przy zmniejszonej ekspresji markera nabłonkowego - E-kadheryny i zwiększonej ekspresji markerów mezenchymalnych: N-kadheryny, wimentyny i białka SLUG. Obecność ekspresji wymienionych wyżej markerów EMT istotnie korelowała ze złymi rokowaniami oraz nasiloną inwazyjnością komórek nowotworowych. W naszym badaniu nie obserwowaliśmy ekspresji wimentyny w komórkach wykazujących pozytywną ekspresję testyny w zmianach łagodnych i tkance prawidłowej. Zaobserwowaliśmy również obniżoną ekspresję testyny w rakach litych, mieszanych i złożonych. Analizie poddaliśmy również inne czynniki wpływające na przebieg choroby i mające znaczenie prognostyczne. Uwzględniliśmy marker proliferacji komórkowej Ki-67, który jest związany z biologicznymi cechami nowotworów. Odzwierciedla on aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych i jest wiarygodnym markerem bardziej agresywnych raków piersi. U pacjentek z rakiem piersi we wczesnym stadium zaawansowania, wysoki wskaźnik Ki-67 wiąże się ze wzrostem ryzyka zgonu o ponad 50%, a ryzykiem nawrotu o 64% (136). W naszym badaniu jądrowa ekspresja Ki-67 była obserwowana na niskim poziomie, w tkance prawidłowej nie przekraczała 20 % komórek. Wysoki indeks proliferacji Ki-67 tj powyżej 20 % komórek został zauważony przede wszystkim w rakach. Spośród badanych przez nas gruczolaków 86% nie wykazywało ekspresji Ki-67, co potwierdza, że komórki tych guzów nie dzielą się tak intensywnie jak w przypadku nowotworów złośliwych. Ekspresję Ki-67 w badanych przez nas rakach wykazano w 87% przypadków. Podobny związek między ekspresją Ki-67 a stopniem złośliwości histologicznej guza sutka i raka piersi u kobiet zaobserwowano w wielu badaniach nad nowotworami u zwierząt Brakuje odniesień wskazujących na korelację między Ki-67 i testyny w raku piersi, ale w wielu nowotworach u ludzi najwyższy poziom Ki-67 odpowiada niższym poziomom testyny i złemu rokowaniu (119). W naszych badaniach nie zaobserwowaliśmy żadnej istotnej statystycznie korelacji między Ki-67 a testyną w nowotworach złośliwych i łagodnych.

Nasze badanie jest pierwszym, dotyczącym roli SOX 10 oraz testyny w nowotworach gruczołu sutkowego u psów Koncentrując się na rakach sutka, stwierdziliśmy, że wyższa ekspresja testyny w nabłonku gruczołu sutkowego była związana z mniej agresywnymi postaciami nowotworu sutka u psów, natomiast w przypadku SOX 10 ekspresja wiązała się z

wyższym wskaźnikiem Ki-67, wyższym stopniem histologicznej złośliwości oraz tendencją do inwazji naczyń krwionośnych. Nowotwory u psów są uważane za dobre modele raka sutka u człowieka. Dalsze badania nad ekspresją SOX 10 oraz testyny w nowotworach psów mogą dostarczyć ważnych informacji, na temat mechanizmów transformacji nowotworowej komórek listwy mlecznej u psów.

8. Podsumowanie i wnioski

W pracy doktorskiej przeanalizowano ekspresję dwóch nowych w onkologii weterynaryjnej białek: SOX 10 oraz testyny przy użyciu metod IHC oraz real-time PCR w nowotworach listwy mleczej u suk. Stwierdzono nasilenie ekspresji białka SOX 10 w zmianach złośliwych w odniesieniu do zmian łagodnych listwy mleczej u suk oraz zmniejszenia ekspresji testyny wraz z nasileniem zmian patologicznych. Wynik ten wskazuje, że SOX 10 oraz testyna biorą udział w patogenezie omawianych nowotworów. Uzyskana analiza statystyczna wykazała szereg dodatnich korelacji pomiędzy ekspresją badanych białek – wzrostem ekspresji SOX 10 i zmniejszeniem ekspresji testyny, a czynnikami determinującymi fenotyp złośliwości guza oraz gorszą prognozę dla pacjenta onkologicznego. Wyniki badań wskazują rolę SOX 10 oraz testyny w procesie transformacji nowotworowej gruczołu sutkowego u suk. Z tego powodu mogą znaleźć zastosowanie jako markery diagnostyczne, rokownicze oraz predykcyjne. Mając na uwadze zaobserwowane zależności, można wnioskować, że dalsze szczegółowe badania dotyczące poziomów ekspresji SOX 10 i testyny oraz korelacji z długoterminowymi czynnikami tj. dalszym losem pacjentów (okres przeżycia, obecność przerzutów odległych, czas wolny od choroby) zwiększą naszą wiedzę na temat roli badanych białek w przebiegu procesu raka gruczołu sutkowego u psów oraz mogą przyczynić się do opracowania nowych metod terapeutycznych i wydłużeniu czasu przeżycia u pacjentów z guzami listwy mleczej. Wskazanie dobrego markera predykcyjnego w raku listwy mleczej u psów pozwoliłoby w przyszłości na wykorzystanie go w planowaniu terapii tego typu nowotworu, a także jak pokazują ostatnie doniesienia z onkologii eksperymentalnej do zastosowania nowoczesnych terapii molekularnych.

Poniżej przedstawiono najważniejsze wnioski :

1. Ekspresja SOX10 jest wyraźnie wyższa w tkance nowotworowej, w porównaniu z tkanką zdrową..
2. Ekspresja SOX 10 wiąże się z niekorzystnymi rokowniczo czynnikami takimi jak stopień histologicznej złośliwości, indeks proliferacji KI 67 oraz ekspresja wimentyny.
3. Poziom ekspresji testyny jest niższy w zmianach złośliwych , w porównaniu z tkanką zdrową.

9. Streszczenie

Nowotwory gruczołu sutkowego u psów są zaraz po nowotworach skóry, najczęstszą przyczyną konsultacji onkologicznej w medycynie małych zwierząt. Podstawowym badaniem diagnostycznym przy podejrzeniu nowotworzenia jest badanie cytopatologiczne materiału pobranego metodą biopsji cienkoigłowej zmienionego patologicznie gruczołu mlekowego. W przypadku podejrzenia nowotworzenia, najczęściej podejmowana jest decyzja o chirurgicznej resekcji guza lub jednostronne odjęcie całej listwy mlecznej. Ostateczne rozpoznanie opiera się na badaniu histopatologicznym wg zaleceń i wytycznych WHO. Wśród nowotworów gruczołu sutkowego ponad 50% stanowią formy złośliwe. Przeważają zmiany pochodzenia nabłonkowego. Do klasyfikacji klinicznego zaawansowania nowotworu, prócz badania histologicznego stosuje się klasyfikację TNM. Ze względu na złożoność procesu onkogenezy, standardowe badanie histopatologiczne oraz ocena w klasyfikacji TNM może okazać się niewystarczająca w ocenie rokowania. Z tego względu patolodzy, onkolodzy oraz klinicyści poszukują nowych narzędzi, pomocnych w diagnostyce i leczeniu nowotworów. Szczególnie zainteresowanie budzą nowe markery komórkowe, których ekspresja zmienia się wraz z rozwojem procesu nowotworowego. Do oceny proliferacji komórek nowotworowych wykorzystuje się ocenę aktywności mitotycznej Ki-67. Jednym z nowych markerów o potencjalnej wartości jest SOX 10, jego ekspresja wzrasta wraz ze stopniem zaawansowania klinicznego oraz histologicznego, wiąże się u chorych z niekorzystnym rokowaniem. W medycynie człowieka najczęściej stosowany jest do diagnozowania potrójnie negatywnego raka piersi (TNBC) oraz do detekcji metastaz w miejscach predylekcyjnych – węzłach chłonnych, tkance płucnej, mózgu. Kolejnym markerem jest testyna (TES). Ekspresja tej proteiny maleje wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworu. Najwyższa ekspresja obserwowana jest w komórkach prawidłowych. Celem badania była próba określenia poziomu ekspresji tych dwóch białek, zależność między innymi markerami proliferacji nowotworowej takimi jak HER2 oraz Ki-67. Analiza ekspresji SOX 10 i testyny w zależności od danych kliniczno-patologicznych, a także analiza SOX 10 na poziomie mRNA w wybranych fragmentach zmian gruczołu mlekowego. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przyjmując za poziom istotności $p < 0,05$. W badaniach wykazałam iż ekspresja SOX 10 jest obecna w tkance prawidłowej oraz w zmianach złośliwych gruczołu sutkowego u psów. Jej nasilenie jest wyraźnie niższe w prawidłowym gruczole. Najsilniejszą reakcję barwną zaobserwowano w raku prostym cewkowym oraz w rakach mieszanych. Zaobserwowano związek ekspresji SOX 10 z czynnikami rokowniczo niekorzystnymi takimi jak stopień

histologicznej złośliwości, indeks proliferacji Ki-67 oraz ekspresja wimentyny. W przypadku testyny, najsilniejsza ekspresja obserwowana była w prawidłowym gruczole sutkowym oraz w zmianach łagodnych. Poziom nasilenia reakcji barwnej był istotnie niższy w zmianach złośliwych, w szczególności w rakach mieszanych w porównaniu z innymi typami histologicznymi oraz tkanką niezmienną nowotworowo. Na podstawie zaobserwowanych zależności, można wnioskować, że dalsze szczegółowe badania dotyczące poziomów ekspresji SOX 10 i testyny oraz korelacji z długoterminowymi czynnikami tj. dalszym losem pacjentów (okres przeżycia, obecność przerzutów odległych, czas wolny od choroby) zwiększą naszą wiedzę na temat roli badanych białek w przebiegu procesu nowotworowego u psów oraz mogą przyczynić się do opracowania nowych metod terapeutycznych i wydłużeniu czasu przeżycia u pacjentów z guzami listwy mlecznej.

10. Summary

Cancers of the mammary gland in dogs are, after skin cancers, the most common cause of oncology consultation in small animal medicine. The basic diagnostic is a fine-needle biopsy of the pathologically changed mammary gland. The final diagnosis is based on histopathological examination according to WHO recommendations and guidelines. More than 50% of breast cancers are malignant. Changes of epithelial origin predominate. In addition to histological examination, the TNM classification is used to classify the clinical stage of the tumour. Due to the complexity of the oncogenesis process, standard histopathological examination and TNM classification may not be sufficient in assessing the prognosis. For this reason, pathologists, oncologists and clinicians are looking for new tools to diagnose and treat cancer. New cell markers whose expression changes with the development of the neoplastic process. Ki-67 mitotic activity is used to assess the proliferation of cancer cells. One of the new markers of potential value is SOX 10, its expression increases with the degree of clinical and histological advancement, and is associated with unfavorable prognosis. In human medicine, it is most often used to diagnose triple-negative breast cancer (TNBC) and to detect metastases in predilection sites - lymph nodes, lung tissue, brain. Another marker is the testin , the expression of this protein decreases with increasing tumor stage. The highest expression is observed in normal cells. The aim of the study was to try to determine the level of expression of these two proteins, the relationship between other markers of tumor proliferation such as HER2 and Ki-67. Analysis of SOX 10 and testin expression depending on clinical and pathological data, as well as analysis of SOX 10 at the mRNA level in selected fragments of changed mammary tissue. The obtained results were subjected to statistical analysis, assuming the significance level of $p < 0.05$. In my studies, I showed that SOX10 expression is present in normal tissue and in malignant lesions of the mammary gland in dogs. Its severity is clearly lower in the normal gland. The strongest color reaction was observed in simple tubular carcinoma and in mixed carcinomas. Association with SOX10 expression, unfavorable prognostic factors such as histological malignancy grade, Ki-67 proliferation index and vimentin expression were observed. In the case of testin, the strongest expression was observed in the normal mammary gland and in benign lesions. The intensity of the color reaction was significantly lower in malignant lesions, especially in mixed carcinomas, compared to other histological types and non-cancerous tissue. Based on the observed relationships, it can be concluded that further detailed studies on SOX10 and testin expression levels and correlations with long-term factors, i.e. overall survival, presence of distant metastases, disease-free survival

time, will increase our knowledge about the role of the tested proteins in the course of the neoplastic process in dogs and may contribute to the development of new therapeutic methods and prolongation of survival in patients with mammary ridge tumours.

11. Bibliografía

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
2. Salas Y, Márquez A, Diaz D, Romero L. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: a growing animal health problem. *PLoS ONE.* (2015) 10:e0127381. 10.1371/journal.pone.0127381
3. Goldschmidt MH, Peña L, Zappulli V. Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ. editor. *Tumors in Domestic Animals.* Fifth ed. Danvers, MA: John Wiley & Sons, Inc; (2017). p. 723–65. 10.1002/9781119181200.ch17
4. Gray M, Meehan J, Martínez-Pérez C, Kay C, Turnbull AK, Morrison LR, Pang LY, Argyle D. Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. *Front Oncol.* 2020 Apr 28;10:617. doi: 10.3389/fonc.2020.00617. PMID: 32411603; PMCID: PMC7198768.
5. Bray F, McCarron P and Parkin DM: The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res.* 6:229–239. 2004.
6. DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO and Jemal A: International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 24:1495–1506. 2015.
7. Ekwueme DU, Guy GP Jr, Rim SH, White A, Hall IJ, Fairley TL and Dean HD: Health and economic impact of breast cancer mortality in young women, 1970–2008. *Am J Prev Med.* 46:71–79. 2014.
8. Peña L, Perez-Alenza MD, Rodriguez-Bertos A, Nieto A. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat.* (2003) 78:141–8. 10.1023/A:1022991802116
9. Clemente M, De Andres PJ, Pena L, Perez-Alenza MD. Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. *Vet Rec.* (2009) 165:78–81. 10.1136/vetrec.165.3.78
10. Peña L, De Andres PJ, Clemente M, Cuesta P, Perez-Alenza MD. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol.* (2013) 50:94–105. 10.1177/0300985812447830
11. Abadie J, Nguyen F, Loussouarn D, Peña L, Gama A, Rieder N, et al.. Canine invasive

- mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. *Breast Cancer Res Treatment*. (2018) 167:459–68. 10.1007/s10549-017-4542-8
12. Lee K-H, Park H-M, Son K-H, Shin T-J, Cho J-Y. Transcriptome signatures of canine mammary gland tumors and its comparison to human breast cancers. *Cancers*. (2018) 10:317. 10.3390/cancers10090317
 13. Jeong SJ, Lee KH, Nam AR, Cho JY. Genome-wide methylation profiling in canine mammary tumor reveals miRNA candidates associated with human breast cancer. *Cancers*. (2019) 11:1466. 10.3390/cancers11101466
 14. Amirkhani Namagerdi A, d'Angelo D, Ciani F, Iannuzzi CA, Napolitano F, Avallone L, De Laurentiis M, Giordano A. Triple-Negative Breast Cancer Comparison With Canine Mammary Tumors From Light Microscopy to Molecular Pathology. *Front Oncol*. 2020 Nov 12;10:563779. doi: 10.3389/fonc.2020.563779. PMID: 33282730; PMCID: PMC7689249.
 15. Nguyen F, Pena L, Ibisch C, Loussouarn D, Gama A, Rieder N et al (2017) Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer: a retrospective observational study. Part 1: Natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Res Treat* 78:141–148
 16. Im KS, Kim NH, Lim HY, Kim HW, Shin JI, Sur JH. Analysis of a New Histological and Molecular-Based Classification of Canine Mammary Neoplasia. *Vet Pathol* (2014) 51(3):549–59. 10.1177/0300985813498780
 17. Pastor, N, Ezquerro, LJ, Santella, M, Caballé, NC, Tarazona, R, Durán, ME. Prognostic significance of immunohistochemical markers and histological classification in malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol*. 2020; 18: 753– 762. <https://doi.org/10.1111/vco.12603>
 18. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, et al: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 406:747–752. 2000.
 20. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, et al: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:10869–10874. 2001.
 21. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, et al: Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:8418–8423. 2003.

22. Turner NC and Reis-Filho JS: Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*. 25:5846–5853. 2006.
23. Dai X, Xiang L, Li T and Bai Z: Cancer Hallmarks, Biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *J Cancer*. 7:1281–1294. 2016.
24. Zardavas D, Irrthum A, Swanton C and Piccart M: Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol*. 12:381–394. 2015.
25. Abdelmegeed SM, Mohammed S. Canine mammary tumors as a model for human disease. *Oncol Lett*. 2018 Jun;15(6):8195-8205. doi: 10.3892/ol.2018.8411. Epub 2018 Apr 2. PMID: 29928319; PMCID: PMC6004712.
26. Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH: Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*. 48(1): 85-97, 2011. DOI: 10.1177/0300985810389480
27. Santos M, Marcos R, Faustino AM. Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle. *Reprod Domest Anim*. 2010 Oct;45(5):e146-54. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01536.x. PMID: 19895392.
28. Nai Yang Fu, Emma Nolan, Geoffrey J. Lindeman, and Jane E. Visvader. Stem Cells and the Differentiation Hierarchy in Mammary Gland Development. *Physiological Reviews* 2020 100:2, 489-523
29. Lutful Kabir FM, Alvarez CE, Bird RC. Canine Mammary Carcinomas: A Comparative Analysis of Altered Gene Expression. *Vet Sci* (2015) 3(1):1. doi: 10.3390/vetsci3010001
30. Benavente M.A., Bianchi C.P., Aba M.A. Canine Mammary Tumors: Risk Factors, Prognosis and Treatments. *J. Veter. Adv.* 2016;6:1291–1300. doi: 10.5455/jva.20160916045115.
31. 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.; et al. Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial. *J. Vet. Intern. Med.* 2016, 30, 230–241.
32. Sleenckx N, de Rooster H, Veldhuis Kroeze EJ, Van Ginneken C, Van Brantegem L: Canine Mammary Tumours, an Overview. *Reprod Domest Anim*. 46(6): 1112-1131, 2011. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x
33. Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH: Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*. 48(1): 85-97, 2011. DOI: 10.1177/0300985810389480)
34. Burrai, G.P.; Gabrieli, A.; Moccia, V.; Zappulli, V.; Porcellato, I.; Brachelente, C.; Pirino,

- S.; Polinas, M.; Antuofermo, E. A Statistical Analysis of Risk Factors and Biological Behavior in Canine Mammary Tumors: A Multicenter Study. *Animals* 2020, 10, 1687. <https://doi.org/10.3390/ani10091687>
35. Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ: Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Vet Pathol.* 1999, 36 (5): 423-436. 10.1354/vp.36-5-423.
 36. Kitchell BE, Loar AS: Diseases of the mammary glands. *Handbook of Small Animal Practice.* Edited by: Morgan RV. 1997, WB Saunders, Philadelphia, 615-625.
 37. Misdorp W: Tumors of the mammary gland. *Tumours in Domestic Animals.* Edited by: Meuten DJ. 2002, Iowa State Press, Iowa, 575-606.
 38. Hörnfeldt MB, Mortensen JK. Surgical dose and the clinical outcome in the treatment of mammary gland tumours in female dogs: a literature review. *Acta Vet Scand.* 2023 Mar 11;65(1):12. doi: 10.1186/s13028-023-00674-1. PMID: 36906609; PMCID: PMC10008593.
 39. Tran CM, Moore AS, Frimberger AE. Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. *Vet Comp Oncol.* 2016;14:252–262. doi: 10.1111/vco.12092.
 40. Patsikas MN, Karayannopoulou M, Kaldrymidoy E, Papazoglou LG, Papadopoulou SI, Tzegas N. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol.* 2006;35:228–234. doi: 10.1111/j.1439-0264.2005.00664.x.
 41. Pereira CT, Rahal SC, de Carvalho Balieiro JC, Ribeiro AACM. Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? *Anat Histol Embryol.* 2003;32:282–290. doi: 10.1046/j.1439-0264.2003.00485.x.
 42. Dolka I, Sapieryński R: Badanie histopatologiczne w onkologii weterynaryjnej. Cz. IV. Nowotwory gruczołu sutkowego u suk. *Życie weterynaryjne.* 93(4): 247-255, 2018.
 43. 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.* 13(1): e0191595, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0191595
 44. Michishita M. Understanding of tumorigenesis in canine mammary tumours based on cancer stem cell research. *Vet J.* 2020 Nov;265:105560. doi: 10.1016/j.tvjl.2020.105560. Epub 2020 Oct 4. PMID: 33129557.
 45. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine

- mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011 Jan;48(1):117-31. doi: 10.1177/0300985810393258. PMID: 21266722.
46. Pena L, De Andres PJ, Clemente M, et al. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol.* 2013;50(1):94–105.
 47. Owen LN. *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*. 1st ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1980. pp. 1–53.
 48. Gundim LF, de Araújo CP, Blanca WT, Guimarães EC, Medeiros AA. Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. *Can J Vet Res.* 2016 Oct;80(4):318-322. PMID: 27733787; PMCID: PMC5052884.
 49. Varallo GR, Gelaleti GB, Maschio-Signorini LB, Moschetta MG, Lopes JR, De Nardi AB, Tinucci-Costa M, Rocha RM, De Campos Zuccari DAP. Prognostic phenotypic classification for canine mammary tumors. *Oncol Lett.* 2019 Dec;18(6):6545-6553. doi: 10.3892/ol.2019.11052. Epub 2019 Nov 5. PMID: 31807173; PMCID: PMC6876320.
 50. Lee, J.M., Dedhar, S., Kalluri, R. and Thompson, E.W. (2006) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* 172, 973–981, <https://doi.org/10.1083/jcb.200601018>
 51. Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J. and Nieto, M.A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890,
 52. Kim, D.H., Xing, T., Yang, Z., Dudek, R., Lu, Q. and Chen, Y.-H. (2018) Epithelial mesenchymal transition in embryonic development, tissue repair and cancer: a comprehensive overview. *J. Clin. Med.* 7, 1, <https://doi.org/10.3390/jcm7010001>
 53. Sisto, M., Ribatti, D. and Lisi, S. (2021) Organ fibrosis and autoimmunity: the role of inflammation in TGF β -dependent EMT. *Biomolecules* 11, 310, <https://doi.org/10.3390/biom11020310>
 54. Hay, E. D. in *Epithelial–Mesenchymal Interactions: 18th Hahnemann Symposium* (eds R. Fleischmajer & Billingham, R. E.) 31–35 (Williams and Wilkins, 1968).
 55. Yang, J., Antin, P., Berx, G. et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 341–352 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>
 56. Trelstad, R. L., Hayashi, A., Hayashi, K. & Donahoe, P. K. The epithelial–mesenchymal interface of the male rat Mullerian duct: loss of basement membrane integrity and ductal regression. *Dev. Biol.* 92, 27–40 (1982).

57. Fata J.E., Werb Z., Bissell M.J.: Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res.*, 2004; 6: 1–11
58. Wynn T.A.: Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.*, 2008, 214: 199–210
59. Taylor M.A., Parvani J.G., Schiemann W.P.: The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β in normal and malignant mammary epithelial cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2010; 15: 169–190
60. Turley E.A., Veiseh M., Radisky D.C., Bissell M.J.: Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition – does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2008; 5: 280–290
61. Francart, M.-E., Lambert, J., Vanwynsberghe, A. M., Thompson, E. W., Bourcy, M., Polette, M., et al. (2018). Epithelial-mesenchymal plasticity and circulating tumor cells: travel companions to metastases. *Dev. Dyn.* 247, 432–450. doi: 10.1002/dvdy.24506
62. Su, Y., Hopfinger, N.R., Nguyen, T.D. et al. Epigenetic reprogramming of epithelial mesenchymal transition in triple negative breast cancer cells with DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors. *J Exp Clin Cancer Res* 37, 314 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0988-8>
63. Chao YL, Shepard CR, Wells A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Mol Cancer*. 2010;9:179. doi: 10.1186/1476-4598-9-179.
64. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: Role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res*. 2006;66:11271–11278. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2044.
65. Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs*. 2007;185:7–19. doi: 10.1159/000101298.
66. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol*. 2007;213:374–383. doi: 10.1002/jcp.21223.
67. Prat A., Parker J.S., Karginova O., Fan C., Livasy C., Herschkowitz J.I., He X., Perou C.M. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12:R68. doi: 10.1186/bcr2635.
68. Micalizzi D.S., Christensen K.L., Jedlicka P., Coletta R.D., Barón A.E., Harrell J.C., Horwitz K.B., Billheimer D., Heichman K.A., Welm A.L., et al. The Six1 homeoprotein

- induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF-beta signaling. *J. Clin. Investig.* 2009;119:2678–2690. doi: 10.1172/JCI37815.
69. Scimeca M., Antonacci C., Colombo D., Bonfiglio R., Buonomo O.C., Bonanno E. Emerging prognostic markers related to mesenchymal characteristics of poorly differentiated breast cancers. *Tumour Biol.* 2016;37:5427–5435. doi: 10.1007/s13277-015-4361-7.
 70. Fedele M, Cerchia L, Chiappetta G. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer: Focus on Basal-Like Carcinomas. *Cancers (Basel)*. 2017 Sep 30;9(10):134. doi: 10.3390/cancers9100134.
 71. Dravis C, Spike BT, Harrell JC, et al. Sox10 Regulates Stem/Progenitor and Mesenchymal Cell States in Mammary Epithelial Cells. *Cell Rep.* 2015;12(12):2035-2048. doi:10.1016/j.celrep.2015.08.040
 72. Zhang W et al. Epigenetic inactivation of the canonical Wnt antagonist SRY-box containing gene 17 in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2008;68(8):2764–72.
 73. Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol.* 2000;227(2):239–55.
 74. Kormish JD, Sinner D, Zorn AM. Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Dev Dyn.* 2010;239(1):56–68.
 75. Kiefer JC. Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn.* 2007;236(8):2356–66.
 76. Bafico A et al. An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells. *Cancer Cell.* 2004;6(5):497–506.
 77. Liu F, Millar SE. Wnt/beta-catenin signaling in oral tissue development and disease. *J Dent Res.* 2010;89(4):318–30.
 78. Zhou, D., Bai, F., Zhang, X. et al. SOX10 is a novel oncogene in hepatocellular carcinoma through Wnt/ β -catenin/TCF4 cascade. *Tumor Biol.* 35, 9935–9940 (2014). <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1893-1>
 79. Zhu YT, Jia Y, Hu L, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor-binding protein (PBP) is essential for the growth of active Notch4-immortalized mammary epithelial cells by activating SOX10 expression. *Biochem J.* 2009;425(2):435-444. Published 2009 Dec 23. doi:10.1042/BJ20091237
 80. Drusco A, Zanesi N, Roldo C, Trapasso F, Farber JL, Fong LY and Croce CM: Knockout mice reveal a tumor suppressor function for Testin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:10947–

10951. 2005.
81. Chêne L, Giroud C, Desgrandchamps F, Boccon-Gibod L, Cussenot O, Berthon P and Latil A: Extensive analysis of the 7q31 region in human prostate tumors supports TES as the best candidate tumor suppressor gene. *Int J Cancer*. 111:798–804. 2004.
 82. Mueller W, Nutt CL, Ehrich M, Riemenschneider MJ, von Deimling A, van den Boom D and Louis DN: Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma. *Oncogene*. 26:583–593. 2007.
 83. Popiel A, Piotrowska A, Sputa-Grzegorzolka P, Smolarz B, Romanowicz H, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M, Kobierzycki C. Preliminary Study on the Expression of Testin, p16 and Ki-67 in the Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Biomedicines*. 2021; 9(8):1010. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081010>
 84. Qiu H, Zhu J, Yuan C, Yan S, Yang Q and Kong B: Frequent hypermethylation and loss of heterozygosity of the testis derived transcript gene in ovarian cancer. *Cancer Sci*. 101:1255–1260. 2010.
 85. Coutts AS, MacKenzie E, Griffith E and Black DM: TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. *J Cell Sci*. 116:897–906. 2003.
 86. Dong R, Pu H, Wang Y, Yu J, Lian K, Mao C. TESTIN was commonly hypermethylated and involved in the epithelial-mesenchymal transition of endometrial cancer. *APMIS*. 2015;123:394–400. doi: 10.1111/apm.12361.
 87. Gu Z, Ding G, Liang K, Zhang H, Guo G, Zhang L, Cui J. TESTIN suppresses tumor growth and invasion via manipulating cell cycle progression in endometrial carcinoma. *Med Sci Monit*. 2014;20:980–987. doi: 10.12659/MSM.890544.
 88. Zhu J, Li X, Kong X, Moran MS, Su P, Haffty BG, Yang Q. Testin is a tumor suppressor and prognostic marker in breast cancer. *Cancer Sci*. 2012;103:2092–2101. doi: 10.1111/cas.12020.
 89. Yu L, Peng F, Dong X, et al. Sex-Determining Region Y Chromosome-Related High-Mobility-Group Box 10 in Cancer: A Potential Therapeutic Target. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:564740. Published 2020 Dec 3. doi:10.3389/fcell.2020.564740
 90. Tang Y, Cao Y. SOX10 Knockdown Inhibits Melanoma Cell Proliferation via Notch Signaling Pathway. *Cancer Manag Res*. 2021;13:7225-7234. Published 2021 Sep 17. doi:10.2147/CMAR.S329331
 91. Falah N, Posey JE, Thorson W et al. 22q11.2q13 duplication including SOX10 causes sex-reversal and peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease. *American Journal of Medical Genetics*

- Part A 2017; 173: 1066–1070.
92. The role of SOX10 during enteric nervous system development, *Developmental Biology*, Volume 382, Issue 1, 2013, Pages 330-343, ISSN 0012-1606, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.024>.
 93. Haseeb A, Lefebvre V. The SOXE transcription factors-SOX8, SOX9 and SOX10-share a bi-partite transactivation mechanism. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(13):6917-6931. doi:10.1093/nar/gkz523
 94. Thongpradit S, Jinawath N, Javed A, et al. Novel SOX10 Mutations in Waardenburg Syndrome: Functional Characterization and Genotype-Phenotype Analysis. *Front Genet.* 2020;11:589784. Published 2020 Dec 9. doi:10.3389/fgene.2020.589784
 95. Chan, K. K., Wong, C. K., Lui, V. C., Tam, P. K., and Sham, M. H. (2003). Analysis of SOX10 mutations identified in Waardenburg-Hirschsprung patients: differential effects on target gene regulation. *J. Cell. Biochem.* 90, 573–585. doi: 10.1002/jcb.10656
 96. Bondurand, N., Kobetz, A., Pingault, V., Lemort, N., Encha-Razavi, F., Couly, G., et al. (1998). Expression of the SOX10 gene during human development. *FEBS Lett.* 432, 168–172.
 97. Feng W, Liu S, Zhu R, Li B, Zhu Z, Yang J, Song C. SOX10 induced Nestin expression regulates cancer stem cell properties of TNBC cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Apr 1;485(2):522-528. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.014. Epub 2017 Feb 9. PMID: 28189679.
 98. J.R. Karamchandani, T.O. Nielsen, M. van de Rijn, R.B. West Sox10 and S100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 20 (2012), pp. 445-450
 99. Chiu K, Ionescu DN, Hayes M. SOX10 expression in mammary invasive ductal carcinomas and benign breast tissue. *Virchows Arch.* 2019 Jun;474(6):667-672. doi: 10.1007/s00428-019-02557-1. Epub 2019 Mar 23. PMID: 30903273.
 100. J. Shin, J.G. Vincent, J.D. Cuda, et al. Sox10 is expressed in primary melanocytic neoplasms of various histologies but not in fibrohistiocytic proliferations and histiocytoses *J Am Acad Dermatol*, 67 (2012), pp. 717-726
 101. Miettinen, M.; McCue, P.A.; Sarlomo-Rikala, M.; Biernat, W.; Czapiewski, P.; Kopczynski, J.; Thompson, L.D.; Lasota, J.; Wang, Z.; Fetsch, J.F. Sox10—A marker for not only schwannian and melanocytic neoplasms but also myoepithelial cell tumors of soft tissue: A systematic analysis of 5134 tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 2015, 39, 826–835.
 102. Lezcano, C.; Ho, J.; Seethala, R.R. Sox10 and DOG1 Expression in Primary Adnexal

- Tumors of the Skin. *Am. J. Dermatopathol.* 2017, 39, 896–902. [CrossRef] *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6407 9 of 10
103. Yin, H.; Qin, C.; Zhao, Y.; Du, Y.; Sheng, Z.; Wang, Q.; Song, Q.; Chen, L.; Liu, C.; Xu, T. SOX10 is over-expressed in bladder cancer and contributes to the malignant bladder cancer cell behaviors. *Clin. Transl. Oncol.* 2017, 19, 1035–1044.
 104. Nelson, E.R.; Sharma, R.; Argani, P.; Cimino-Mathews, A. Utility of Sox10 labeling in metastatic breast carcinomas. *Hum. Pathol.* 2017, 67, 205–210.
 105. Kato, M.; Nishihara, H.; Hayashi, H.; Kimura, T.; Ishida, Y.; Wang, L.; Tsuda, M.; Tanino, M.A.; Tanaka, S. Clinicopathological evaluation of Sox10 expression in diffuse-type gastric adenocarcinoma. *Med. Oncol.* 2017, 34, 8.
 106. Kriegsmann K, Flechtenmacher C, Heil J, Kriegsmann J, Mechtersheimer G, Aulmann S, Weichert W, Sinn HP, Kriegsmann M. Immunohistological Expression of SOX-10 in Triple-Negative Breast Cancer: A Descriptive Analysis of 113 Samples. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 3;21(17):6407. doi: 10.3390/ijms21176407. PMID: 32899175; PMCID: PMC7503807.
 107. Zhao, Y.; Liu, Z.G.; Tang, J.; Zou, R.F.; Chen, X.Y.; Jiang, G.M.; Qiu, Y.F.; Wang, H. High expression of Sox10 correlates with tumor aggressiveness and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. *OncoTargets Ther.* 2016, 9, 1671–1677.
 108. Kwon, A.Y.; Heo, I.; Lee, H.J.; Kim, G.; Kang, H.; Heo, J.H.; Kim, T.H.; An, H.J. Sox10 expression in ovarian epithelial tumors is associated with poor overall survival. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 2016, 468, 597–605.
 109. Zhong, W.D.; Qin, G.Q.; Dai, Q.S.; Han, Z.D.; Chen, S.M.; Ling, X.H.; Fu, X.; Cai, C.; Chen, J.H.; Chen, X.B.; et al. SOXs in human prostate cancer: Implication as progression and prognosis factors. *BMC Cancer* 2012, 12, 248.
 110. Ivanov, S.V.; Panaccione, A.; Nonaka, D.; Prasad, M.L.; Boyd, K.L.; Brown, B.; Guo, Y.; Sewell, A.; Yarbrough, W.G. Diagnostic SOX10 gene signatures in salivary adenoid cystic and breast basal-like carcinomas. *Br. J. Cancer* 2013, 109, 444–451.
 111. Hsieh, M.S.; Lee, Y.H.; Chang, Y.L. SOX10-positive salivary gland tumors: A growing list, including mammary analogue secretory carcinoma of the salivary gland, sialoblastoma, low-grade salivary duct carcinoma, basal cell adenoma/adenocarcinoma, and a subgroup of mucoepidermoid carcinoma. *Hum. Pathol.* 2016, 56, 134–142.
 112. Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. *Am J Surg Pathol* 2008;32:1291-8. 10.1097/PAS.0b013e3181658c14
 113. Cimino-Mathews A, Subhawong AP, Elwood H, et al. Neural crest transcription factor

- Sox10 is preferentially expressed in triple-negative and metaplastic breast carcinomas. *Hum Pathol* 2013;44:959-65. 10.1016/j.humpath.2012.09.005
114. Tang Y, Cao Y. SOX10 Knockdown Inhibits Melanoma Cell Proliferation via Notch Signaling Pathway. *Cancer Manag Res.* 2021;13:7225-7234. Published 2021 Sep 17. doi:10.2147/CMAR.S329331
115. Ya-Ru Xu, Wan-Xi Yang, SOX-mediated molecular crosstalk during the progression of tumorigenesis, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volume 63, 2017, Pages 23-34, ISSN 1084-9521, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.028>.
116. Jin L, Qin C, Qi X, Hong T, Yang X, Zhu X. Clinicopathological significance of Sox10 expression in triple-negative breast carcinoma. *Transl Cancer Res.* 2020 Sep;9(9):5603-5613. doi: 10.21037/tcr-20-2634. PMID: 35117924; PMCID: PMC8797416.
117. Dravis C, Spike BT, Harrell JC, et al. Sox10 Regulates Stem/Progenitor and Mesenchymal Cell States in Mammary Epithelial Cells. *Cell Rep.* 2015;12(12):2035-2048. doi:10.1016/j.celrep.2015.08.040
118. Sarti, M.; Sevigiani, C.; Calin, G.A.; Aqeilan, R.; Shimizu, M.; Pentimalli, F.; Picchio, M.C.; Godwin, A.; Rosenberg, A.; Drusco, A.; et al. Adenoviral Transduction of testin Gene into Breast and Uterine Cancer Cell Lines Promotes Apoptosis and Tumor Reduction In vivo. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 806–813.
119. Tobias, E.S.; Hurlstone, A.F.L.; Mackenzie, E.; MacFarlane, R.; Black, D.M. The TES gene at 7q31. 1 is methylated in tumours and encodes a novel growth-suppressing LIM domain protein. *Oncogene* 2001, 20, 2844–2853
120. Popiel, A.; Kobierzycki, C.; Dzięgiel, P. The Role of Testin in Human Cancers. *Pathol. Oncol. Res.* 2019, 25, 1279–1284.
121. Coutts AS (2003) TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. *J Cell Sci* 116:897–906. <https://doi.org/10.1242/jcs.00278>
122. Popiel-Kopaczyk A, Grzegorzolka J, Piotrowska A, Olbromski M, Smolarz B, Romanowicz H, Rusak A, Mrozowska M, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M, Kobierzycki C. The Expression of Testin, Ki-67 and p16 in Cervical Cancer Diagnostics. *Curr Issues Mol Biol.* 2023 Jan 5;45(1):490-500. doi: 10.3390/cimb45010032. PMID: 36661518; PMCID: PMC9857082.
123. Bièche I, Khodja a DK, Lidereau R (1997) Genetic alteration mapping on chromosome 7 in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 3:1009–1016
124. Zenklusen JC, Thompson JC, Conti CJ, Klein-Szanto AJP (1995) Frequent loss of heterozygosity in human primary squamous cell and Colon carcinomas at 7q31.1: evidence

- for a broad range tumor suppressor gene. *Cancer Res* 55:1347–1350
125. Jia X, Shanmugam C, Paluri RK, Jhala NC, Behring P, Katkoori VR, Sugandha SP, Bae S (2017) Prognostic value of loss of heterozygosity and sub-cellular localization of SMAD4 varies with tumor stage in colorectal cancer. *8:20198–20212*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15560>
126. Matsuura K, Shiga K, Yokoyama J, Saijo S, Miyagi T, Takasaka T (1998) Loss of heterozygosity of chromosome 9p21 and 7q31 is correlated with high incidence of recurrent tumor in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 18:453–458
127. Koike M, Tasaka T, Spira S, Tsuruoka N, Phillip Koeffler H (1999) Allelotyping of acute myelogenous leukemia: loss of heterozygosity at 7q31.1 (D7S486) and q33-34 (D7S498, D7S505). *Leuk Res* 23:307–310. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(98\)00159-3](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(98)00159-3)
128. Weeks RJ, Kees UR, Song S, Morison IM (2010) Silencing of TESTIN by dense biallelic promoter methylation is the most common molecular event in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Mol Cancer* 9:163. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-163>
129. Shridhar V, Sun QC, Miller OJ, Kalemkerian GP, Petros J, Smith DI (1997) Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas. *Oncogene* 15:2727–2733. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201448>
130. Achille A, Biasi MO, Zamboni G, Bogina G, Magalini AR, Pederzoli P, Perucho M, Scarpa A (1996) Chromosome 7q allelic losses in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 56:3808–3813
131. Coutts AS (2003) TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. *J Cell Sci* 116:897–906.
132. Sarti M, Pinton S, Limoni C, Carbone GM, Pagani O, Cavalli F, Catapano CV. Differential expression of testin and survivin in breast cancer subtypes. *Oncol Rep.* 2013 Aug;30(2):824–32. doi: 10.3892/or.2013.2502. Epub 2013 May 28. PMID: 23715752.
133. Steponaitis G, Kazlauskas A, Skiriute D, Valiulyte I, Skauminas K, Tamasauskas A, Vaitkiene P (2016) Testin (TES) as a candidate tumour suppressor and prognostic marker in human astrocytoma. *Oncol Lett* 12:3305–3311. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5077>
134. Ming W, Qian W, Peng W-J, Hu J-F, Wang Z-Y, Liu H, Huang L-N (2017) Testin is a tumor suppressor in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 37:1027–1035. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5316>
135. Nowak M, Madej JA, Pula B, Dziegiel P, Ciaputa R: Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), E-cadherin and Ki-67 in metastatic and non-metastatic canine mammary carcinomas. *Ir Vet J.* 69: 9, 2016. DOI:10.1186/s13620-016-0068-3

136. Zuccari DA, Santana AE, Cury PM, Cordeiro JA: Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Vet Clin Pathol.* 33(1): 23-28, 2004. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2004.tb00345.x
137. Xu M, Tang Q, Li M, Liu Y, Li F. An analysis of Ki-67 expression in stage 1 invasive ductal breast carcinoma using apparent diffusion coefficient histograms. *Quant Imaging Med Surg.* 2021 Apr;11(4):1518-1531. doi: 10.21037/qims-20-615. PMID: 33816188; PMCID: PMC7930667.
138. Carvalho MI, Pires I, Prada J, Lobo L, Queiroga FL: Ki-67 and PCNA Expression in Canine Mammary Tumors and Adjacent Nonneoplastic Mammary Glands: Prognostic Impact by a Multivariate Survival Analysis. *Vet Pathol.* 53(6): 1138-1146, 2016. DOI: 10.1177/0300985816646429
139. Sun X, Kaufman PD: Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 127(2): 175-186, 2018. DOI: 10.1007/s00412-018-0659-8
140. Estaller, A.; Kessler, M.; Wehrend, A.; Hirschberger, J.; Neumann, S. Utility of Serum Ki-67 as a Marker for Malignancy in Dogs. *Animals* 2022, 12, 1263. <https://doi.org/10.3390/ani12101263>
141. Carvalho MI, Pires I, Prada J, Lobo L, Queiroga FL. Ki-67 and PCNA Expression in Canine Mammary Tumors and Adjacent Nonneoplastic Mammary Glands: Prognostic Impact by a Multivariate Survival Analysis. *Vet Pathol.* 2016 Nov;53(6):1138-1146. doi: 10.1177/0300985816646429. Epub 2016 May 9. PMID: 27162119.
142. Rososs JS, Slodkowska EA., Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN: The HER2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER2 therapy and personalized medicine. *Oncologist.* 14: 320–368, 2009.
143. Bar J, Wąsikiewicz D: HER2/NEU- od badań podstawowych do implikacji klinicznych. *Adv Clin Exp.* 12: 97-103, 2003.
144. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF, American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists: Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 31(31): 3997-4013, 2013. DOI: 10.1200/JCO.2013.50.9984
145. Sauter G, Lee J, Bartlett JMS, Slamon DJ, Press MF: Guidelines for Human EpiGuidelines for Human Epi-28. dermel Growth Factor Receptor 2 Testing: Biologic and Methodologic

- Considerations. *J Clin Oncol.* 27: 1323-1333, 2009. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.8197
146. Leary AF, Hanna WM, van de Vijver MJ, Penault-Llorca F, Ruschoff J, Osamura RY, Bolous M, Dowsett M: Value and limitations of measuring HER2 extracellular domain in the serum of breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 27(10): 1694-1705, 2009. DOI: 10.1200/JCO.2008.17.3989
147. Nitta H, Kelly BD, Allred C, Jewell S, Banks P, Dennis E, Grogan TM: The assessment of HER2 status in breast cancer: the past, the present, and the future. *Pathol Int.* 66(6): 313-324, 2016. DOI: 10.1111/pin.12407
148. Menard, S. Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E: HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast
149. Danielsson F, Peterson MK, Caldeira Araújo H, Lautenschläger F, Gad AKB: Vimentin Diversity in Health and Disease. *Cells.* 7(10): E147, 2018. DOI: 10.3390/cells7100147
150. Herrmann H, Aebi U: Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 12: 79-90, 2000. DOI: 10.1016/s0955-0674(99)00060-5
151. Azumi N, Battifora H: The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin and alcohol-fixed tumors. *Am J Clin Pathol.* 88: 286-296, 1987. DOI: 10.1093/ajcp/88.3.286
152. Domagala W, Lasota J, Dukowicz A, Markiewski M, Striker G, Weber K, Osborn M. Vimentin expression appears to be associated with poor prognosis in node-negative ductal NOS breast carcinomas. *Am J Pathol.* 1990 Dec;137(6):1299-304. PMID: 1701960; PMCID: PMC1877729.
153. Wang X, Ji S, Ma Y, Xing X, Zhou Y, Xu X, Song J, Wang S, Jiang W, Wang X, Yan F, Fang C. Vimentin plays an important role in the promotion of breast cancer cell migration and invasion by leucine aminopeptidase 3. *Cytotechnology.* 2020 Oct;72(5):639-647. doi: 10.1007/s10616-020-00402-x. Epub 2020 Jun 22. PMID: 32572729; PMCID: PMC7548013.
154. Khillare CD, Sinai Khandeparkar SG, Joshi AR, Kulkarni MM, Gogate BP, Battin S. Immunohistochemical Expression of Vimentin in Invasive Breast Carcinoma and Its Correlation with Clinicopathological Parameters. *Niger Med J.* 2019 Jan-Feb;60(1):17-21. doi: 10.4103/nmj.NMJ_7_19. PMID: 31413430; PMCID: PMC6677002.
155. Hu D, Li Z, Zheng B, Lin X, Pan Y, Gong P, Zhuo W, Hu Y, Chen C, Chen L, Zhou J, Wang L. Cancer-associated fibroblasts in breast cancer: Challenges and opportunities.

- Cancer Commun (Lond). 2022 May;42(5):401-434. doi: 10.1002/cac2.12291. Epub 2022 Apr 28. PMID: 35481621; PMCID: PMC9118050.
156. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathol.* 1987;8:138–140.
157. Ali S, Rathore Z, Rafique Z, Chughtai AS, Atiq A. Expression of SOX10 in Triple-Negative Breast Carcinoma in Pakistan. *Cureus.* 2022 Aug 12;14(8):e27938. doi: 10.7759/cureus.27938. PMID: 36120242; PMCID: PMC9464471.
158. Focke CM, van Diest PJ, Decker T. St Gallen 2015 subtyping of luminal breast cancers: impact of different Ki-67-based proliferation assessment methods. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Sep;159(2):257-63. doi: 10.1007/s10549-016-3950-5. Epub 2016 Aug 24. PMID: 27558625.
159. Ramakrishna N, Anders CK, Lin NU, et al: Management of advanced human epidermal growth factor receptor 2–positive breast cancer and brain Metastases: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol.* May 31, 2022

12. Lista tabel

Tabela I. Podobieństwa między rakiem sutka u kobiet, a rakiem gruczołu sutkowego u suk, na podstawie Abdelmegeed 2018 (24).

Tabela II. Klasyfikacja histologiczna nowotworów gruczołu sutkowego (za Goldschmidt, 2011).

Tabela III. Schemat klasyfikacji stadium/stopnia zaawansowania klinicznego nowotworów gruczołu sutkowego u suk (klasyfikacja TNM) na podstawie opracowania Owen i wsp. (46).

Tabela IV. Tabela prezentuje markery procesu EMT.

Tabela V. Charakterystyka grupy badanej.

Tabela VI. System stopniowania złośliwości nowotworów nabłonkowych, na podstawie Pena i wsp (45).

Tabela VII. Tabela przedstawiająca kryteria klasyfikacji w skali Remmele i Stegner (156).

Tabela VIII. Tabela uwzględniająca kryteria interpretacji ekspresji SOX 10 na podstawie Ali i wsp. (156).

Tabela IX. Tabela przedstawiająca kryteria autorskiej oceny reakcji immunohistochemicznej SOX 10.

Tabela X. Tabela przedstawiająca kryteria przyjęte dla niskiego oraz wysokiego indeksu proliferacyjnego.

Tabela XI. Tabela przedstawiająca kryteria przyjęte dla HER2 dodatniej i ujemnych reakcji, z czego jedynie reakcje ocenione na 3 pkt, zostały scharakteryzowane jako HER2 dodatnie.

Tabela XII. Tabela przedstawiająca kryteria przyjęte dla reakcji VIM dodatniej i ujemnej reakcji.

Tabela XIII. Tabela przedstawiająca rasy psów ze zdiagnozowanymi nowotworami złośliwymi oraz łagodnymi.

Tabela XIV. Porównanie systemu klasyfikacji jądrowej ekspresji SOX 10.

Tabela XV. Zależność ekspresji SOX 10 w porównaniu z parametrami kliniczno-patologicznymi.

Tabela XVI. Zależność ekspresji TES od parametrów kliniczno-patologicznych.

13. Lista rycin

Ryc 1. Ilustracja prezentująca proliferację poszczególnych komórek w zależności od typu histologicznego raka sutka (opracowanie własne).

Ryc 2. Ilustracja prezentująca trzy typy EMT. MET (ang. mesenchymal epithelial transition) przemiana mezenchymalno-nabłonkowa (opracowanie własne).

Ryc 3. Ilustracja prezentująca fenotyp komórek ulegającym procesowi EMT (opracowanie własne).

Ryc. 4. Przykładowe zdjęcia reakcji białka Ki-67 w badanych guzach. A. Niski współczynnik Ki-67: ekspresja w poniżej 20% komórek rakowych B. Ekspresja Ki-67 zaobserwowana w ponad 20% komórek rakowych. Powiększenie 400x.

Ryc. 5. Przykładowe zdjęcia reakcji białka HER2 w badanych guzach. A. Brak ekspresji HER2 w raku. B. Silna błonowa ekspresja HER2 w raku, wynik uznany za HER2 dodatni. Powiększenie 400x.

Ryc. 6. Przykładowe zdjęcia reakcji wimentyny w badanych guzach. A. Ekspresja wimentyny obecna w komórkach podścieliska gruczołu sutkowego, brak reakcji w tkance nabłonkowej. B. Pozytywna reakcja w podścielisku nowotworu oraz w komórkach nowotworowych. Powiększenie 400x.

Ryc.7. Ocena SOX 10 w rakach. A. Brak reakcji SOX 10. B. Reakcja SOX10 oceniona na 1 pkt., niejednolite zabarwienie 1-10%. C, Reakcja SOX 10 oceniona na 2 pkt., ogniskowe zabarwienie 10-70% komórek. D. Reakcja SOX 10 oceniona na 3 pkt. rozproszone 70-100% komórek (za Ali i wsp. 2022).

Ryc. 8. Ocena SOX 10 w badanych tkankach. A. Reakcja SOX 10 oceniona na 1 pkt., niejednolite zabarwienie 1-10%. B. Reakcja SOX 10 oceniona na 2 pkt., ogniskowe zabarwienie 11-50% komórek. C. Reakcja SOX 10 oceniona na 3 pkt. 51-80% komórek nowotworowych, brak reakcji w podścielisku. D. Reakcja SOX 10 oceniona na 4 pkt. 81-100% komórek nowotworowych.

Ryc. 9. Zależność ekspresji SOX 10 od stopnia złośliwości guzów. Istotną statystycznie różnicę wykazano między guzami niezłośliwymi, a guzami o stopniu złośliwości G2 ($p=0,009$; analiza Kruskala-Wallisa).

Ryc. 10. Zależność ekspresji SOX 10 od rodzaju badanej tkanki. Istotną statystycznie różnicę wykazano między guzami złośliwymi, a tkanką zdrową ($p=0,002$; analiza Kruskala-Wallisa).

Ryc. 11. Zależność ekspresji SOX 10 od angioginwazji komórek nowotworowych. Stwierdzono wyższą ekspresję SOX 10 w nowotworach wykazujących naciekanie naczyń ($p=0,02$; test U Manna-Whitneya).

Ryc. 12. Ekspresja testyny w zmianach złośliwych A. Brak reakcji, B. Reakcja IRS oceniona na 1 pkt. C. Reakcja IRS oceniona na 2 pkt. D. Reakcja IRS oceniona na 3 pkt. Powiększenie 400x.

Ryc. 13. Zależność ekspresji testyny od rodzaju badanej tkanki. Istotną statystycznie różnicę wykazano między guzami złośliwymi, a guzami łagodnymi ($p=0,01$; analiza Kruskala-Wallisa).

Ryc. 14. Różnica poziomu ekspresji *SOX10* w tkance nowotworowej i tkance zdrowej ($p=0,006$; analiza U Manna-Whitneya).

Ryc 15. Wydajność transfekcji poziomów białka TES mierzona metodą analizy Western Blott.