

# POSTĘPY W DIAGNOSTYCE MOLEKULARNEJ RAKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO U SUK – CZY KLASYCZNA HISTOPATOLOGIA NADAL WYSTARCZA?

98

**Daria Jankowska, Izabella Dolka**

*Zakład Patologii Zwierząt Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW*

**N**owotwory gruczołu sutkowego (ang. Canine Mammary Tumours, CMTs) należą do najczęściej diagnozowanych nowotworów u niekastrowanych suk (72). Znaczenie kliniczne CMTs wynika z częstego występowania guzów sutka, obejmujących szerokie spektrum zmian – od nienowotworowych rozrostów po mięsakoraki oraz guzów wywodzących się z brodawki sutka, jak również z faktu, że raki sutka (ang. Canine Mammary Carcinoma, CMCs) stanowią częstą przyczynę śmierci suk niekastrowanych (5, 28, 52). Częstość występowania CMTs wykazuje wyraźne zróżnicowanie geograficzne, co powiązane jest z różnicami w kontroli rozrodu. W krajach, w których owariohisterektomia wykonywana jest rutynowo we wczesnym wieku psa, obserwuje

się spadek zapadalności na te nowotwory (52, 72). Wcześniejsze, szeroko cytowane badania dotyczące szacowanego ryzyka rozwoju CMTs u suk poddanych wczesnej OH (przed 1. lub 2. estrus) zostały zakwestionowane z powodu wykrytych błędów metodologicznych (5). Jednocześnie również te analizy potwierdziły ochronny wpływ wczesnej OH (tj. przed 2. rokiem życia) na ryzyko rozwoju CMTs, uznając OH za jeden z najważniejszych czynników protekcyjnych w profilaktyce nowotworów gruczołu sutkowego. W grupie suk poddanych wczesnej OH nie odnotowano śmiertelności związanej z CMTs.

W porównaniu z sukami niekastrowanymi, zarówno wczesna (tj. przed 2. rokiem życia), jak i późna OH (tj. po 2. roku życia) wiązały się z istotnym obniżeniem ryzyka śmierci z powodu CMTs, jak i innych

nowotworów (5). Badania epidemiologiczne wskazują, że guzy sutka mogą odpowiadać nawet za 50–70 % wszystkich nowotworów u niekastrowanych suk, przy czym odsetek nowotworów złośliwych w wielu populacjach przekracza 50 %, a może sięgać nawet 80 % (9, 16). Guzy sutka wykrywane są u suk w wieku od 5 do 15,7 lat, najczęściej u suk w wieku średnim i starszym, zwykle pomiędzy 8. a 11. rokiem życia (średnia 10,0 lat  $\pm$  2,4 l, mediana 10,0 lat), a ryzyko wystąpienia nowotworów złośliwych wzrasta wraz z wiekiem (5, 9, 16).

## Ocena histopatologiczna nowotworów gruczołu sutkowego u suk

Podstawową metodą diagnostyczną podtypów nowotworów sutka psów jest histopatologia, czyli standardowe barwie-



nie hematoksyliną i eozyną (H-E), które stanowi tzw. metodę przeglądową, niekiedy uzupełnioną o barwienie histochemiczne, np. PAS (ang. Periodic Acid-Schiff), błękit alcjanu lub badanie immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko cytokeratynie, wimentynie czy p63. Rozwój klasyfikacji CMTs przebiegał etapami i był ściśle związany z postępem wiedzy na temat budowy morfologicznej guzów sutka, ich zachowania biologicznego oraz przebiegu klinicznego choroby. Najwcześniejsze systemy klasyfikacyjne, w tym klasyfikacja WHO z 1974 roku, opierały się głównie na obrazie histologicznym i wprowadzały podział nowotworów nabłonkowych na podtypy proste (simple) i złożone (complex), w zależności od obecności wydzielniczych komórek nabłonkowych oraz komórek mioepitelialnych (30). Kolejna rewizja została zaproponowana w 1999 roku przez Misdorpa, który rozszerzył klasyfikację o bardziej szczegółowy podział guzów nabłonkowych, a także uwzględnił guzy mieszane, nowotwory mezenchymalne oraz zmiany rozrostowe-dysplastyczne (46). Przełom w diagnostyce histopatologicznej nastąpił wraz z publikacją klasyfikacji zaproponowanej przez Goldschmidta i wsp. w 2011 roku, która została

opracowana w oparciu o wcześniejsze systemy. W klasyfikacji tej wyróżniono 23 warianty nowotworów złośliwych obejmujących, m.in. raki proste, złożone i mieszane, rak inwazyjny mikrobrodawkowaty, mioepiteliomę złośliwą oraz nowotwory nabłonkowe zaliczane do tzw. typów specjalnych, np. raki bogate w lipidy oraz 7 nowotworów niezłośliwych (28).

W kolejnych badaniach wykazano, że klasyfikacja ta ma znaczenie nie tylko diagnostyczne, lecz także kliniczne, umożliwiając lepsze różnicowanie guzów pod względem dynamiki wzrostu, stopnia inwazyjności, skłonności do przerzutów oraz rokowania (10, 33). W 2019 roku Zappulli i wsp. zaproponowali nową edycję klasyfikacji histologicznej nowotworów gruczołu sutkowego psów, która w sposób bardziej szczegółowy opisuje wcześniej ustalone podtypy histologiczne, precyzuje kryteria oceny złośliwości, dostarcza informacji dotyczących diagnostyki różnicowej oraz wyraźnie podkreśla znaczenie kliniczne i prognostyczne podtypów histologicznych CMTs (75).

Ważnym elementem oceny histopatologicznej raków sutka u suk jest określenie ich stopnia złośliwości histologicznej z wykorzystaniem trójstopniowego systemu Peña i wsp. będącego modyfikacją systemu stopniowania złośliwości histo-

## Molecular advances in the diagnosis of canine mammary carcinoma: is classical histopathology still sufficient?

*Canine mammary tumours are among the most common neoplasms in intact female dogs and exhibit marked biological heterogeneity that is not fully captured by routine clinicopathological assessment. This manuscript reviews histopathological classification of canine mammary carcinomas, including grading and TNM staging, as the framework for diagnosis and prognostication. It then summarizes the development of molecular subtyping in human breast cancer and the use of immunohistochemical surrogate markers (ER, PR, HER-2, Ki-67, and luminal/basal markers) to approximate analogous phenotypes in canine mammary carcinomas, as well as in other species. Finally, the paper discusses the clinical implications, current limitations, and future directions for implementing molecular classification in veterinary oncology.*

**Keywords:** canine mammary carcinoma, classification, immunohistochemistry, molecular subtypes, biomarkers.

**Tabela 1. Klasyfikacja TNM nowotworów gruczołu sutkowego psa opracowana na podstawie modyfikacji Rutteman i Withrow, 2001 (61).**

Stadium TNM	T <sup>a)</sup>	N <sup>b)</sup>	M <sup>c)</sup>
I	<3 cm	N0	M0
II	3-5 cm	N0	M0
III	>5 cm	N0	M0
IV	Każda	N1	M0
V	Każda	Każdy	M1

T – wielkość ogniska pierwotnego, N – status przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (N0 – brak, N1 – obecne), M – występowanie przerzutów odległych (M0 – brak, M1 – obecne);

<sup>a)</sup> największa średnica guza;

<sup>b)</sup> Regionalne węzły chłonne należy usuwać i badać histopatologicznie;

<sup>c)</sup> Przerzuty odległe ocenia się przede wszystkim na podstawie zdjęć rentgenowskich klatki piersiowej, ale mogą być wskazane inne badania obrazowe, np. USG wątroby.

logicznej Nottingham (55). System ten został szeroko zaadaptowany w patologii weterynaryjnej i zweryfikowany w licznych badaniach dotyczących raków gruczołu sutkowego u suk (36, 60, 68). Obejmuje on ocenę stopnia tworzenia cewek gruczołowych, pleomorfizmu jąder komórkowych oraz liczby figur mitotycznych, przy czym każda z tych cech oceniana jest w skali punktowej od 1 do 3. Suma punktów pozwala na zakwalifikowanie nowotworu do niskiego, umiarkowanego lub wysokiego stopnia złośliwości (28). Wykazano, że wysoki stopień złośliwości CMCs wiąże się z większym ryzykiem przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, krótszym czasem nawrotu choroby oraz czasem przeżycia (33, 62, 63, 68).

Istotnym uzupełnieniem tradycyjnej klasyfikacji histologicznej i stopnia złośliwości jest klasyczna ocena kliniczno-patologiczna guzów sutka suk według systemu TNM (ang. Tumor–Node–Metastasis), opracowanego pierwotnie przez WHO dla nowotworów u ludzi, a następnie zaadaptowanego do onkologii weterynaryjnej (53, 61) (tabela 1). System ten obejmuje ocenę wielkości guza pierwotnego oraz ocenę występowania rozsiewu procesu nowotworowego przez ocenę zajęcia regionalnych węzłów chłonnych oraz występowania przerzutów odległych. Dzięki temu dostarcza on ważnych informacji o stadium choroby oraz ma istotne znaczenie rokownicze (9, 16). Wykazano, że zarówno wielkość guza, jak i zajęcie węzłów chłonnych pozostają w ścisłym związku z czasem przeżycia oraz ryzykiem nawrotu choroby (10, 15).

W oparciu o medycynę ludzką w ostatnich latach zaproponowano zmodyfikowany system TNM uwzględniający ocenę

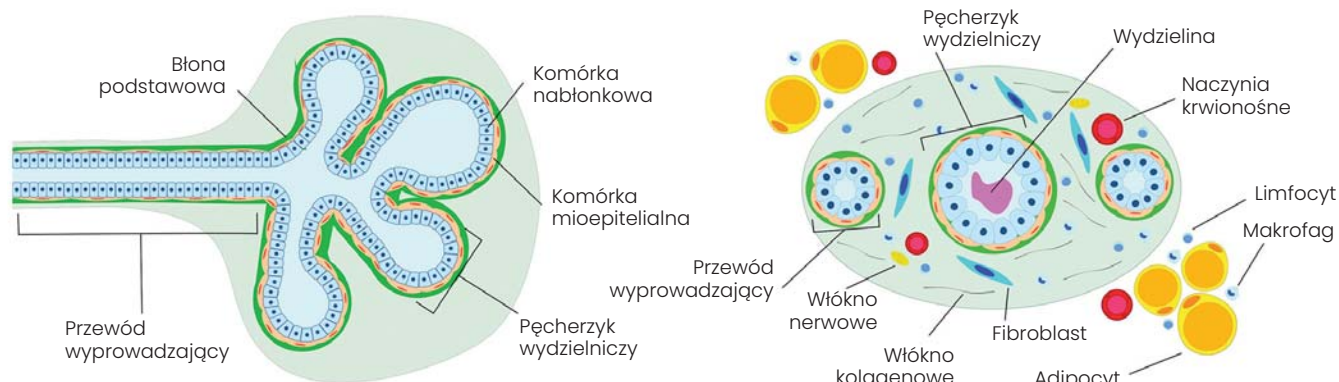
inwazyjności, obecności komórek nowotworowych w naczyniach limfatycznych lub krwionośnych (ang. lymphovascular invasion, LVI), patologiczny rozmiar guza (pT) oraz patologiczny stan węzłów chłonnych (pN) z wykorzystaniem badania histopatologicznego. Zastosowanie tego systemu pozwoliło na lepszą ocenę rokowania u suk z CMCs w odniesieniu do czasu przeżycia, szczególnie w zakresie inwazyjności guza i przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych niż standardowy system TNM, to jednak w większości przypadków raków bez zajęcia naczyń lub węzłów chłonnych, system nie pozwolił na precyzyjne określenie stopnia zaawansowania guza (12).

Uwzględniając aktualny stan wiedzy, pełna ocena CMCs powinna obejmować jednocześnie zastosowanie klasyfikacji histologicznej, określenie stopnia złośliwości oraz stadium TNM (10, 28, 33, 60, 62, 68). Coraz więcej danych wskazuje jednak, że sama ocena cech histologicznych i klinicznych nie odzwierciedla w pełni biologii CMCs (22, 54, 55, 76). Od dawna patolodzy weterynaryjni wiedzą, że nowotwory gruczołu sutkowego u suk, w tym głównie raki, charakteryzują się dużą różnorodnością morfologiczną oraz znaczną szczegółowością i drobiazgowością obrazu histologicznego, określaną niekiedy jako „pedanteria histologiczna”, co od lat stanowi wyzwanie diagnostyczne i prognostyczne. Nawet w obrębie jednego guza mogą występować tkanki o różnym pochodzeniu histogenetycznym, np. tkanka nabłonkowa czy chrzęstna, a nowotwory złośliwe mogą występować w obrębie lub obok niezłośliwych. Złożoność budowy histologicznej potwierdza również fakt opracowania na przestrzeni wielu lat kilku systemów klasyfikacji histologicznych i terminolo-

gii guzów, które nadal stanowią przedmiot licznych dyskusji. Pomimo faktu, że badanie histopatologiczne guza sutka jest możliwe do wykonania i relatywnie niedrogie, a wraz z oceną TNM skutecznie wspomaga ocenę rokowania, to metody mają swoje ograniczenia. Przykładowo, jest oczywiste, że nawet w obrębie tego samego podtypu histologicznego (np. rak prosty cewkowo-brodawkowaty o II stopniu złośliwości) lub przy tym samym stadium zaawansowania klinicznego choroby (np. bez przerzutów do węzłów chłonnych pachwinowych powierzchownych) mogą występować różnice rokownicze dla pacjentów pod względem długoterminowego przeżycia. Z kolei nowe proponowane systemy, choć są obiecujące to nie uwzględniają markerów molekularnych, które mogą mieć wpływ na rokowanie i agresywność CMCs, a ich zastosowanie w praktyce wymaga dalszej walidacji i integracji z klasycznym TNM.

## Klasyfikacja molekularna raka piersi u kobiet

W onkologii człowieka zwrócono uwagę, że raki piersi u kobiet (ang. Human Breast Cancer, HBC) o tym samym podtypie histologicznym mogą wykazywać odmienną dynamikę wzrostu, zdolność do przerzutów oraz wrażliwość na leczenie systemowe, co sugerowało istnienie głębszych różnic na poziomie molekularnym (19, 69). Tradycyjna klasyfikacja histologiczna wraz z oceną stopnia złośliwości i stadium zaawansowania klinicznego choroby, nie tłumaczyła w pełni różnic w przebiegu choroby oraz odpowiedzi na leczenie obserwowanych u pacjentek z morfologicznie podobnymi nowotworami (19, 43). Ponadto, wyniki badań z wykorzystaniem technik molekularnych uważane są za bardziej obiektywne niż stosunkowo subiektywna ocena histopatologiczna. Wprowadzenie analiz ekspresji genów umożliwiło identyfikację wewnętrznych podtypów HBC i zapoczątkowało rozwój klasyfikacji molekularnej tych nowotworów. Perou i Sørlie (57, 66) wyróżnili 4 główne podtypy HBC za pomocą mikromacierzy DNA: luminalny A, luminalny B, HER2-dodatni (ang. HER2-enriched), podtyp bazalny/podstawny (ang. basal-like). Badania te potwierdziły istnienie odrębnych podtypów o znaczeniu prognostycznym, których kliniczne implikacje stały się przedmiotem wielu dalszych analiz naukowych (19, 69). Opisano również podtyp podobny do prawidłowej tkanki (ang. normal-like), który pojawia się w literaturze, ale często jest pomijany, bo nie ma



**Rycina 1. Schemat przedstawiający prawidłowy pęcherzyk i przewód gruczołowy sutka (opracowano na podstawie Boix-Montesinos i wsp. 2021 (7)).**

znaczenia klinicznego. Rycina 1 przedstawia schemat budowy pęcherzyka i przewodu gruczołu sutkowego.

W praktyce klinicznej, według konsensusu St Gallen, podtypy molekularne HBC zostały zastąpione za pomocą immunohistochemicznej oceny ekspresji receptorów hormonalnych: estrogenowych alfa (ER) i progesteronowych (PR); receptora HER-2 (ludzki receptor naskórkowego czynnika wzrostu typu 2, ang. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) oraz antygenu Ki-67, czyli wskaźnika proliferacji komórkowej (19, 43, 69). Wyróżniono podstawowe podtypy molekularne raka piersi, w tym: luminalny A, luminalny B (HER-2-ujemny), luminalny B (HER-2-dodatni), HER2-dodatni (nie-luminalny) oraz potrójnie ujemny (ang. triple-negative, często odpowiadający podtypowi basal-like) (11, 19, 27, 69, Tabela 2). Mimo że podtyp potrójnie ujemny często bywa klasyfikowany jako podtyp bazalny, gdyż raki te mogą wykazywać podobną ekspresję markerów, to nie są one tożsame, co potwierdzają badania oparte na profilowaniu ekspresji genów (4, 70). Ocena podtypu molekularnego jest jednym z kluczowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, umożliwiających lepsze oszacowanie ryzyka nawrotu choroby oraz dobór optymalnej strategii leczenia systemowego (19, 69).

#### **Biomarkery stosowane w klasyfikacji molekularnej raka sutka**

Z uwagi na liczne podobieństwa biologiczne pomiędzy rakiem piersi u kobiet a rakami gruczołu sutkowego u suk, markery wykorzystywane w medycynie zostały zaadaptowane również do badań nad CMCs, choć ich znaczenie kliniczne w weterynarii nadal pozostaje przedmiotem intensywnych badań i dyskusji (38, 55). Rycina 2 ilustruje przykładowy

### **Tabela 2. Podtypy molekularne raka piersi kobiet wraz z charakterystyką ekspresji receptorów, rokowaniem i leczeniem (1, 4, 8, 70).**

Podtyp	Markery molekularne	Rokowanie	Leczenie
Luminalny A	ER+, PR+, HER-2 -, indeks Ki67 niski	Dobre	Terapia hormonalna
Luminalny B HER-2 (-)	ER+, PR+, HER-2 -, indeks Ki67 wysoki	Pośrednie	Terapia hormonalna + chemioterapia
Luminalny B HER-2 (+)	ER+, PR+, HER-2+, indeks Ki67 wysoki	Pośrednie	Terapia hormonalna + terapia celowana
HER-2 (+)	ER-, PR-, HER-2+, indeks Ki67 wysoki	Pośrednie	Terapia celowana + chemioterapia
Potrójnie ujemny	ER-, PR-, HER-2-, indeks Ki67 wysoki	Złe	Chemioterapia

profil ekspresji wybranych markerów charakterystycznych dla podtypu molekularnego raka sutka u suk.

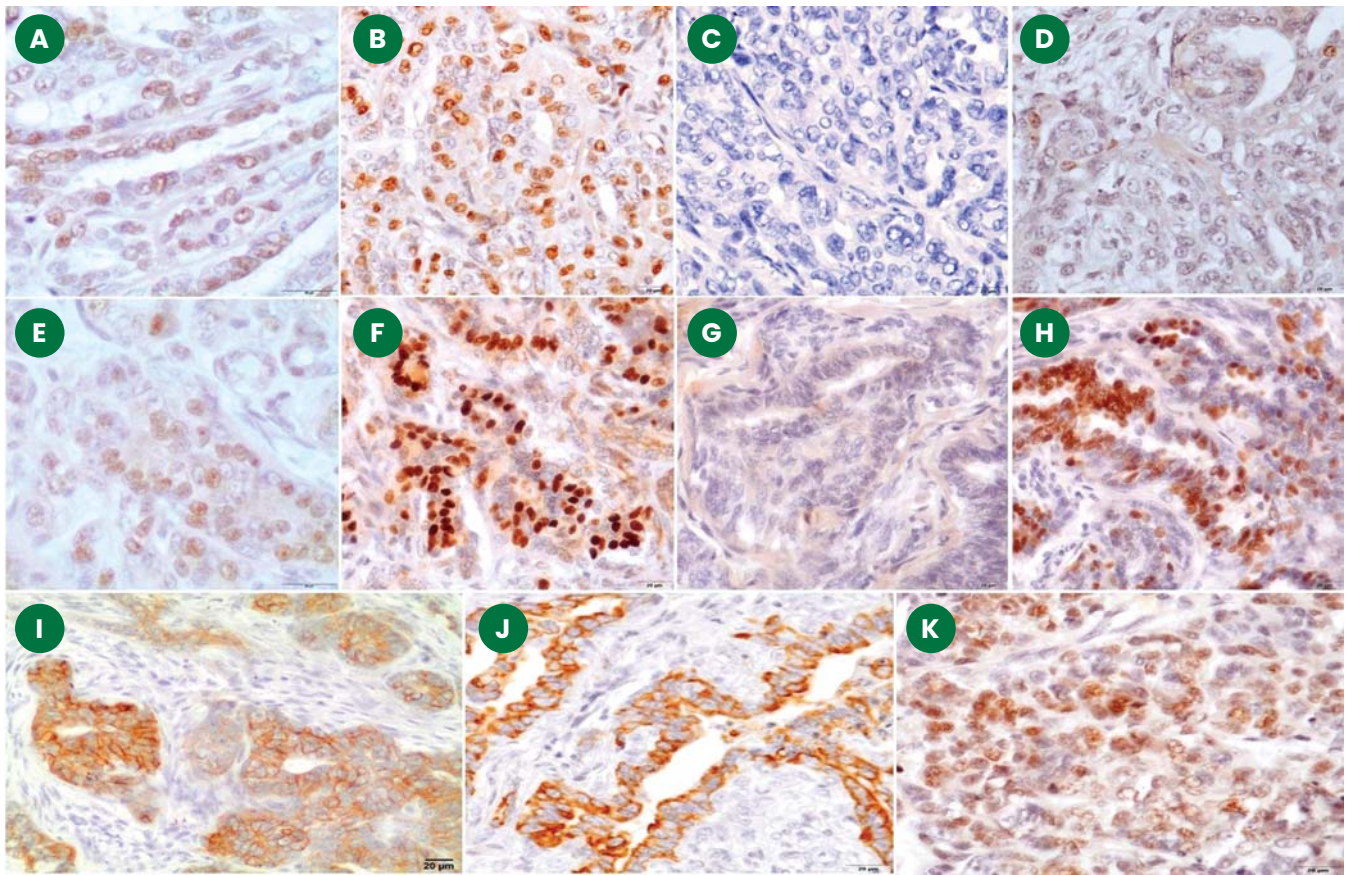
#### **Receptory hormonalne ER i PR**

Receptory estrogenowe (ER) i progesteronowe (PR) należą do najwcześniej poznanych biomarkerów raka piersi u kobiet i pozostają jednymi z najlepiej ugruntowanych markerów. HBC ekspresja ER i PR jest charakterystyczna dla nowotworów lepiej zróżnicowanych, o wolniejszym przebiegu klinicznym, oraz stanowi podstawę kwalifikacji do leczenia hormonalnego (35, 51). Analogiczne zależności obserwowano w licznych badaniach dotyczących CMTs, w których wykazano, że guzy ER-dodatnie i PR-dodatnie częściej cechują się niższym stopniem złośliwości histologicznej, mniejszą częstością inwazji naczyniowej oraz korzystniejszym rokowaniem u suk (17, 54, 55). Z kolei brak ekspresji obu receptorów hormonalnych (fenotyp ER-/PR-) jest charakterystyczny dla raków o bardziej agresywnym przebiegu, częściej związanych z wysokim stopniem złośliwości, obecnością inwazji okołonaczyniowej oraz krótszym

czasem przeżycia (17, 54, 71). Pomimo podobieństw do HBC, znaczenie prognostyczne receptorów ER i PR pozostaje w CMC niejednoznaczne i wymaga dalszych badań.

#### **Receptor HER-2 (cerbB-2)**

Receptor HER-2 jest protoonkogenem kodującym transbłonowe białko aktywności kinazy tyrozynowej, odgrywającym kluczową rolę w regulacji proliferacji i przeżycia komórek nowotworowych. W HBC kobiet nadekspresja HER-2 definiuje odrębny podtyp molekularny, historycznie związany z agresywnym przebiegiem choroby, ale jednocześnie będący celem terapii ukierunkowanych z wykorzystaniem przeciwciała trastuzumabu (35). W przypadku CMC dane dotyczące znaczenia HER-2 są mniej jednoznaczne. Część badań wskazuje na związek nadekspresji HER-2 z wyższym stopniem złośliwości histologicznej, większą aktywnością mitotyczną oraz gorszym rokowaniem, podczas gdy inne nie potwierdzają jego istotnej wartości prognostycznej (3, 18, 32, 38, 54) lub związku z kliniczno-patologicznymi cechami zwiększonej złośliwości (8, 49).



**Rycina 2.** Przykład reakcji immunohistochemicznej na obecność markerów dla podtypu luminalnego A (A–D) oraz dla podtypu luminalnego B (E–H) raka gruczołu sutkowego psa. Na rycinie A, E widoczna jest dodatnia ekspresja receptora estrogenowego; B, F – dodatnia ekspresja receptora progesteronowego; C, G brak ekspresji HER-2/cerbB-2; D, H – dodatnia ekspresja Ki67 (D – niska ekspresja, H – wysoka ekspresja). Na rycinie I przedstawiono przykład dodatniej ekspresji HER-2/c-erbB-2; J – cytokeratyny 19 (marker luminalny) oraz K – białka p63 (marker bazalny); powiększenie 400x (fotografie własne autorki).

U psów opisano homolog HER-2 o 92 % identyczności aminokwasowej, nazwany DER-2 (ang. Dog Epidermal Growth Factor Receptor-2), który wykazuje podobne znaczenie biologiczne jak HER-2. Chociaż teoretycznie można go blokować przeciwciałami, to stosowanie ludzkich przeciwciał wywołuje reakcje nadwrażliwości. Natomiast szczepionki HER-2 indukujące własne przeciwciała przeciwnowotworowe, dają nadzieję na rozwój immunoterapii u suk z rakami sutka, a także mogą przynieść potencjalne korzyści w leczeniu HBC (20).

### **Ki-67 jako marker proliferacji komórkowej**

Antygen Ki-67 jest jądrowym białkiem obecnym w aktywnych fazach cyklu komórkowego i powszechnie stosowanym wskaźnikiem proliferacji komórkowej. W HBC wysoki indeks Ki-67 koreluje z agresywnym przebiegiem choroby i wykorzystywany jest m.in. do różnicowania podtypów luminalnych A i B (Ryc. 2) (67).

Podobnie w badaniach nad CMCs wykazano, że wysoka ekspresja Ki-67 wiąże się z wyższym stopniem złośliwości histologicznej, obecnością przerzutów oraz krótszym czasem przeżycia (26, 71).

### **Markery luminalne i bazalne**

W prawidłowym gruczole sutkowym komórki nabłonkowe i komórki mioepitelialne wykazują odrębne profile ekspresji cytokeratyn (CK), co stanowi podstawę do ich różnicowania w rakach sutka. Do markerów cytokeratyn luminalnych zalicza się przede wszystkim CK7, CK8, CK18 i CK19 (Ryc. 2), które są charakterystyczne dla dobrze zróżnicowanych komórek gruczołowych i których ekspresja w HBC wiąże się z korzystniejszym rokowaniem (2, 73).

Z kolei markery bazalne, takie jak CK5/6, CK14 i CK17 oraz białko p63, są typowe dla komórek podstawnych i często obecne w komórkach mioepitelialnych. Ich ekspresja w nowotworach jest ściśle związana z bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym, negatywnym

statusem receptorów hormonalnych oraz mniej korzystnym rokowaniem zarówno u ludzi, jak i u zwierząt (2, 22, 29). W klasyfikacji molekularnej raków markery te stanowią podstawę identyfikacji podtypów bazalnych (rak typu podstawnego, basal-like), w tym także u psów, gdzie są stosowane do rozróżniania raków potrójnie ujemnych od podtypów luminalnych (23, 50, 55, 58, 64). Badania wykazały, że ekspresja CK5/6 może pełnić funkcję niezależnego czynnika prognostycznego, a jej obecność wiąże się z bardziej agresywnym fenotypem i krótszym czasem przeżycia (2).

### **Klasyfikacja molekularna raków gruczołu sutkowego u suk i jej znaczenie**

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie molekularną charakterystyką CMCs, inspirowaną klasyfikacją HBC. Psy uznawane są za wartościowy model spontanicznych raków, wykazujących liczne podobieństwa kliniczne, histopatologiczne i molekularne do raków piersi u kobiet (59, 64, 71, 72). Pierwsze próby molekularnej klasyfikacji CMCs opierały się

na immunohistochemicznej ocenie receptorów ER, PR oraz HER-2, wzorowanej bezpośrednio na schematach stosowanych w HBC. Profile ekspresji tych markerów u psów w znacznym stopniu przypominały ludzkie podtypy molekularne, co umożliwiło adaptację klasyfikacji obejmującej podtypy: luminalny A, luminalny B, HER2-dodatni oraz potrójnie ujemny (22). Dalsze badania potwierdziły, że klasyfikacja molekularna CMCs ma znaczenie prognostyczne u psów, a poszczególne podtypy różnią się przebiegiem klinicznym, stopniem złośliwości histologicznej oraz częstością występowania przerzutów (1, 34). Jak dotąd, najczęściej identyfikowanym podtypem molekularnym CMCs pozostaje podtyp luminalny A, charakteryzujący się ekspresją ER i/lub PR przy braku nadekspresji HER-2 oraz stosunkowo niskim indeksem proliferacyjnym Ki-67. Podtyp luminalny A jest zazwyczaj lepiej zróżnicowany histologicznie, wykazuje niższą częstość inwazji naczyniowej, co wiąże się z korzystniejszym rokowaniem w porównaniu do innych podtypów (34, 64, 71). Podtyp luminalny B, obejmujący nowotwory ER- i/lub PR-dodatnie z jednoczesną nadekspresją HER-2 lub podwyższonym indeksem Ki-67, cechuje się bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym i wyższym ryzykiem nawrotów (33, 71).

Szczególne zainteresowanie koncentruje się na rakach potrójnie ujemnych zarówno u ludzi (ang. triple negative breast cancer, TNBC) jak i u psów (ang. triple-negative canine mammary carcinoma, TN-CMC), pozbawionych ekspresji ER, PR i HER-2. Podobnie jak u ludzi, także u psów jest to podtyp charakteryzujący się najwyższą agresywnością biologiczną, wysokim stopniem złośliwości histologicznej, wysokim indeksem proliferacyjnym Ki-67, częstą inwazją naczyniową oraz krótszym czasem przeżycia wolnego od choroby (1, 59, 71). Dodatkowo, niektórzy autorzy w obrębie tej grupy wyróżnili fenotyp podstawny (basal-like type) oraz fenotyp niepodstawny (non-basal-like type) na podstawie ekspresji markerów bazalnych, co dodatkowo podkreśla heterogenność tej grupy nowotworów u suk (1, 33, 39, 64, 76).

Kwestia występowania i znaczenia klinicznego podtypu HER2-dodatniego u suk pozostaje kontrowersyjna. Część badań wykazywała obecność nadekspresji HER-2 w CMCs i jej związek z agresywnym przebiegiem choroby (33, 71), jednak inne prace, wykorzystujące rygorystyczne kontrole metodologiczne, nie potwierdziły ani amplifikacji genu HER-2,

ani jednoznacznej nadekspresji białka w nowotworach psów. Różnice te mogą wynikać m.in. z zastosowania przeciwciał przeznaczonych do diagnostyki u ludzi, braku standaryzacji kryteriów oceny oraz zmienności w metodach detekcji (1, 76).

W ostatnich latach coraz częściej podkreśla się znaczenie Ki-67 w kontekście molekularnej charakterystyki CMCs. Wysoka ekspresja Ki-67 jest często związana z podtypami potrójnie ujemnymi oraz z gorszym rokowaniem (59, 71). Podobnie nadekspresja cyklooksyzogenazy-2 (COX-2) sugeruje, że może ona pełnić rolę negatywnego markera prognostycznego CMCs. Badania wykazały, że wyższa ekspresja COX-2 koreluje z większą wielkością guza, wyższym stopniem złośliwości histologicznej oraz krótszym czasem przeżycia wolnego od choroby. Chociaż COX-2 jest interesującym celem terapeutycznym to dotychczasowe badania nie analizowały poszczególnych podtypów histologicznych i molekularnych CMC indywidualnie, co wymaga dalszych badań (59).

#### **Klasyfikacja molekularna raków sutka u innych gatunków**

Klasyfikacja molekularna raków sutka, pierwotnie opracowana w onkologii człowieka, znalazła w ostatnich latach zastosowanie także w badaniach porównawczych obejmujących nie tylko psy, ale również inne gatunki ssaków (31). Szczególne zainteresowanie wzbudziły raki gruczołu sutkowego u kotów (ang. Feline Mammary Carcinomas, FMCs) – jedne z najbardziej agresywnych nowotworów u tego gatunku (14). U kotów spośród wszystkich podstawowych podtypów molekularnych najczęściej występuje podtyp luminalny B, natomiast podtyp luminalny A występuje rzadziej niż u ludzi (31, 45, 74). Istotny odsetek FMCs stanowią raki potrójnie ujemne, które charakteryzują się większym rozmiarem guza, wyższym stopniem złośliwości histologicznej oraz szczególnie niekorzystnym rokowaniem, zwłaszcza w przypadku podtypu podstawnego. Potrójnie ujemne FMC mogą być wykorzystywane w badaniach nad innowacyjnymi terapiami podtypu potrójnie ujemnego u ludzi (44, 65, 74).

W znacznie bardziej ograniczonym zakresie podejmowano również próby zastosowania klasyfikacji molekularnej do nowotworów gruczołu sutkowego u przedstawicieli rodziny kangurowatych (Macropodidae). Nowotwory sutka są rzadko opisywane u tych zwierząt, co wy-

nika zarówno z ich niskiej częstości występowania, jak i z odmienności budowy oraz fizjologii gruczołu sutkowego u kangurowatych związanej z ciążą i laktacją (31, 48). Pomimo tych różnic wykazano możliwość zastosowania klasyfikacji histologicznej oraz klasyfikacji molekularnej stosowanych odpowiednio u psów i ludzi (31). Najczęściej u kangurowatych występowały raki proste, które często wykazywały cechy inwazji naczyniowej oraz zdolność do tworzenia przerzutów, zwłaszcza w przypadku raków o wysokim stopniu złośliwości histologicznej. Najczęściej rozpoznawanymi podtypami molekularnymi był podtyp luminalny A oraz normalny (31). Zastosowanie klasyfikacji molekularnej u kangurowatych ma obecnie przede wszystkim znaczenie porównawcze i poznawcze.

#### **Implikacje kliniczne i terapeutyczne klasyfikacji molekularnej w rakach sutka u suk w onkologii weterynaryjnej**

Leczenie raków sutka u suk polega na chirurgicznym usunięciu guza. Mastektomia pozostaje złotym standardem a zakres postępowania determinowany jest przede wszystkim przez stopień zaawansowania klinicznego choroby. Po mastektomii, rozpoznanie histopatologiczne (jeżeli jest dostępne), a nie jego podtyp molekularny, wpływa na dalsze decyzje terapeutyczne, tj. leczenie wspomagające, w tym terapie farmakologiczne. Leczenie systemowe (chemioterapia, radioterapia) stosowane są głównie w wybranych przypadkach z wysokim ryzykiem przerzutów. Chociaż w większości przypadków te metody zostały uznane za skuteczne w większych grupach zwierząt, to indywidualne odpowiedzi na leczenie mogą być zmienne (40). Brak jednoznacznych wytycznych postępowania po mastektomii dotyczących standaryzowanych protokołów terapii celowanej ogranicza wykorzystanie biomarkerów oraz klasyfikacji molekularnej w praktyce klinicznej (24, 25, 37).

Pomimo rosnącej liczby badań o wartości prognostycznej i predykcyjnej podtypów molekularnych CMCs, zastosowanie tej klasyfikacji w decyzjach terapeutycznych w praktyce weterynaryjnej nie jest obecnie stosowane lub jest ograniczone. Wynika to głównie z braku standaryzacji metod dla poszczególnych markerów, w tym doboru przeciwciał do badań immunohistochemicznych, aby umożliwić powtarzalność wyników i ich porównanie między laboratoriami. Standaryzacja tych procedur jest kluczowa do wprowadzenia klasyfikacji mole-

kularnej w diagnostyce CMCs (10, 52, 64, 71). Chociaż badania wciąż intensywnie się rozwijają, klasyfikacja molekularna CMCs jeszcze nie osiągnęła poziomu standaryzacji porównywalnego z onkologią człowieka. Większość dostępnych badań opiera się na immunohistochemii, jednak liczba prac wykorzystujących techniki wysokoprzepustowe, takie jak profilowanie ekspresji genów, sekwencjonowanie czy analizy wielomiczne (ang. multi-omics analyses), które są kluczowe dla lepszego zrozumienia złożonych procesów molekularnych leżących u podstaw nowotworzenia gruczołu sutkowego u suk, wciąż jest ograniczona (10, 76). Ponadto, techniki te nie mają jeszcze ustalonego miejsca w rutynowej diagnostyce i w doborze terapii dla HBC (19, 41, 47).

Dodatkowym ograniczeniem implikacji klasyfikacji molekularnej w onkologii weterynaryjnej jest znaczna heterogenność CMCs. Chociaż każdy podtyp molekularny CMCs charakteryzuje się unikalnym zestawem cech genetycznych i molekularnych to w obrębie danego podtypu może występować dalsza heterogeniczność molekularna, wynikająca z różnorodności kombinacji zmian genetycznych w komórkach nowotworowych. W wyniku czego niejednoznaczny wynik reakcji immunohistochemicznej może utrudniać zakwalifikowanie CMC do konkretnego podtypu na podstawie immunofenotypu (1, 22, 28, 33, 55, 59). Szczególnym wyzwaniem pozostaje heterogenność raków potrójnie ujemnych, obejmujących fenotypy podstawny i niepodstawny, które różnią się potencjalnymi mechanizmami progresji (1). W takich przypadkach techniki wysokoprzepustowe mogą pomóc uchwycić heterogenność molekularną raka i wesprzeć klasyfikację molekularną.

Pomimo istniejących ograniczeń, klasyfikacja molekularna CMCs otwiera perspektywy rozwoju strategii terapeutycznych dostosowanych do indywidualnych cech psa i jego raka, stanowiąc wkład w rozwój onkologii weterynaryjnej. Badania porównawcze wykazały, że wiele CMCs wykazuje zaburzenia w kluczowych szlakach sygnałowych podobnych do obserwowanych w HBC, co może stanowić podstawę do wprowadzenia terapii celowanych, szczególnie w przypadku agresywnych raków potrójnie ujemnych. Dotychczas nie wykazano jednoznacznej, klinicznie udokumentowanej zależności pomiędzy molekularnym immunofenotypem CMC a odpowiedzią na terapie ukierunkowane u psów. Chociaż terapie celowane są obiecujące, ich skuteczność

i bezpieczeństwo wymagają potwierdzenia w dużych, kontrolowanych badaniach klinicznych u psów z CMC (1, 6, 13, 21, 42, 56, 59, 71).

## Podsumowanie

Z pewnością nie nadszedł jeszcze czas, aby zrezygnować z tradycyjnej klasyfikacji histologicznej CMCs. Ocena histopatologiczna CMCs oparta na rutynowym barwieniu H-E wciąż ma istotne znaczenie rokownicze, nawet bez dodatkowych, zaawansowanych badań molekularnych. Podkreślenie ograniczeń stosowania klasyfikacji molekularnej CMCs nie ma na celu krytyki ani spowalniania rozwoju badań w tym obszarze, lecz stanowi obiektywną ocenę aktualnego stanu wiedzy w świetle piśmiennictwa weterynaryjnego. Medycyna spersonalizowana w odniesieniu do CMCs wciąż znajduje się w początkowej fazie rozwoju. Jednocześnie istnieje duży potencjał, aby w przyszłości dalszy rozwój technologii molekularnych wprowadził tzw. nową erę „klasyfikacji molekularnej” raków sutka w onkologii weterynaryjnej, tak aby standardowa histopatologia była uzupełniana analizami molekularnymi. Takie komplementarne podejście mogłoby w przyszłości przyczynić się do wydłużenia przeżywalności i poprawy jakości życia psów po mastektomii. ●

## Piśmiennictwo

1. Abadie, J., Nguyen, F., Loussouarn, D., Peña, L., Gama, A., Rieder, N., ... & Campone, M.: Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. „Breast cancer research and treatment”, 2018, 167 (2), 459-468.
2. Abd El-Rehim, D. M., Pinder, S. E., Paish, C. E., Bell, J., Blamey, R. W., Robertson, J. F., ... & Ellis, I. O.: Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. „The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland”, 2004, 203 (2), 661-671.
3. Araújo, M. R., Campos, L. C., Damasceno, K. A., Gamba, C. O., Ferreira, E., & Cassali, G. D.: HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. „Research in Veterinary Science”, 2016, 106, 121-130.
4. Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., ... & Reis-Filho, J. S.: Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. „Modern pathology”, 2011, 24 (2), 157-167.
5. Beaudu-Lange, C., Larrat, S., Lange, E., Lecoq, K., & Nguyen, F.: Prevalence of reproductive disorders including mammary tumors and associated mortality in female dogs. „Veterinary sciences”, 2021, 8 (9), 184.
6. Bird, R. C., & Smith, B. F.: Comparative Genetics of Canine and Human Cancers. „Veterinary Sciences”, 2025, 12 (9), 875.
7. Boix-Montesinos, P., Soriano-Teruel, P. M., Arminan, A., Orzaez, M., & Vicent, M. J.: The past, present,

and future of breast cancer models for nanomedicine development. „Advanced drug delivery reviews”, 2021, 173, 306-330.

8. Burrai GP, Tanca A, De Miglio MR, Abbondio M, Pisanu S, Polinas M, Pirino S, Mohammed SI, Uzau S, Addis MF, Antuofermo E.: Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer? „Tumour Biol”, 2015, Nov; 36 (11): 9083-91.
9. 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 (9), 1687.
10. Canadas, A., França, M., Pereira, C., Vilaça, R., Vilhena, H., Tinoco, F., ... & Santos, M.: Canine mammary tumors: comparison of classification and grading methods in a survival study. „Veterinary pathology”, 2019, 56 (2), 208-219.
11. Cheang, M. C., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., ... & Nielsen, T. O.: Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. „JNCI: Journal of the National Cancer Institute”, 2009, 101 (10), 736-750.
12. Chocteau F, Abadie J, Loussouarn D, Nguyen F.: Proposal for a histological staging system of mammary carcinomas in dogs and cats. Part I: canine mammary carcinomas. „Front Vet Sci”, 2019, 6: 388.
13. Chon E, Hendricks W, White M, Rodrigues L, Haworth D, Post G. Precision Medicine in Veterinary Science. „Vet Clin North Am Small Anim Pract.”, 2024, May; 54 (3): 501-521.
14. De Maria, R., Olivero, M., Iussich, S., Nakaichi, M., Murata, T., Biolatti, B., & Di Renzo, M. F.: Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer. „Cancer Research”, 2005, 65 (3), 907-912.
15. Diessler, M. E., Castellano, M. C., Portiansky, E. L., Burns, S., & Idiart, J. R.: Canine mammary carcinomas: influence of histological grade, vascular invasion, proliferation, microvessel density and VEGFR2 expression on lymph node status and survival time. „Veterinary and comparative oncology”, 2017, 15 (2), 450-461.
16. Dolka, I., Czopowicz, M., Stopka, D., Wojtkowska, A., Kaszak, I., & Sapierzyński, R.: Risk factor analysis and clinicopathological characteristics of female dogs with mammary tumours from a single-center retrospective study in Poland. „Scientific Reports”, 2024, 14 (1), 5569.
17. Dolka, I., Motyl, T., Malicka, E., Sapierzyński, R., Fabisiak, M.: Relationship between receptors for insulin-like growth factor-1, steroid hormones and apoptosis-associated proteins in canine mammary tumors. „Polish Journal of Veterinary Sciences”, 2011, Vol. 14, No. 2, 245-251.
18. Dutra, A. P., Granja, N. V. M., Schmitt, F. C., & Cassali, G. D.: c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. „Brazilian Journal of Medical and Biological Research”, 2004, 37, 1673-1681.
19. Eliyatkin, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., & Vardar, E.: Molecular classification of breast carcinoma: from traditional, old-fashioned way to a new age, and a new way. „The journal of breast health”, 2015 11 (2), 59.
20. Fazekas J, Furdós I, Singer J, Jensen-Jarolim E. Why man's best friend, the dog, could also benefit from an anti-HER-2 vaccine. „Oncol Lett.”, 2016, Oct; 12 (4): 2271-2276.
21. Frénel, J. S., & Nguyen, F.: Mammary carcinoma: Comparative oncology between small animals and humans—New therapeutic tools. „Reproduction in Domestic Animals”, 2023, 58, 102-108.
22. Gama, A., Alves, A., & Schmitt, F. J. V. A.: Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. „Virchows Archiv”, 2008, 453 (2), 123-132.
23. Gama, A., Alves, A., Gartner, F., & Schmitt, F.: p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. „Veterinary Pathology”, 2003, 40 (4), 412-420.
24. Gherman, L. M., Chiroi, P., Nuțu, A., Bica, C., & Berindan-Neagoe, I.: Profiling canine mammary

- tumors: A potential model for studying human breast cancer. „The Veterinary Journal”, 2024, 303, 106055.
25. Gherman, L. M., Isachescu, E., Zanoaga, O., Braicu, C., & Berindan-Neagoie, I.: Molecular Markers in Canine Mammary Tumors. „Acta Veterinaria”, 2024, 74 (2).
  26. Giziński, S., Boryczko, Z., Katkiewicz, M., & Bostedt, H. C. H. B.: Ki-67 protein as a prognostic factor in mammary gland tumors in female dogs. „Medycyna Weterynaryjna”, 2003, Vol. 59, No. 10, 888–891 ref. 15
  27. Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thürlimann, B., & Senn, H. J.: Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. „Annals of oncology”, 2011, 22 (8), 1736–1747.
  28. Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., & Zappulli, V.: Classification and grading of canine mammary tumors. „Veterinary pathology”, 2011, 48 (1), 117–131.
  29. Gusterson, B. A., Ross, D. T., Heath, V. J., & Stein, T.: Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. „Breast Cancer Research”, 2005, 7 (4), 143.
  30. Hampe, J. F., & Misdorp, W.: Tumours and dysplasias of the mammary gland. „Bulletin of the World Health Organization”, 1974, 50 (1–2), 111.
  31. Hsu, T. C., Garner, M. M., & Kiupel, M.: Morphological and immunohistochemical characterization and molecular classification of spontaneous mammary gland tumors in macropods. „Veterinary pathology”, 2022, 59 (3), 433–441.
  32. Hsu, W. L., Huang, H. M., Liao, J. W., Wong, M. L., & Chang, S. C.: Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. „The Veterinary Journal”, 2009, 180 (1), 116–123.
  33. Im, K. S., Kim, I. H., Kim, N. H., Lim, H. Y., Kim, J. H., & Sur, J. H.: Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. „The Veterinary Journal”, 2013, 195 (3), 366–372.
  34. Im, K., Kim, N. H., Lim, H. Y., Kim, H. W., Shin, J. I., & Sur, J. H.: Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. „Veterinary Pathology”, 2014, 51 (3), 549–559.
  35. Inoue, K., & Fry, E. A.: Novel molecular markers for breast cancer. „Biomarkers in cancer”, 2016, 8, BIC–S38394.
  36. Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T. C., & Dessiris, A.: Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. „Journal of comparative pathology”, 2005, 133 (4), 246–252.
  37. Kaszak, I., Ruszczyk, A., Kanafa, S., Kacprzak, K., Król, M., & Jurka, P.: Current biomarkers of canine mammary tumors. „Acta veterinaria scandinavica”, 2018, 60 (1), 66.
  38. Kaszak, I., Witkowska-Piłaszewicz, O., Domrzałek, K., & Jurka, P.: The novel diagnostic techniques and biomarkers of canine mammary tumors. „Veterinary Sciences”, 2022, 9 (10), 526.
  39. Kim, N. H., Lim, H. Y., Im, K. S., Kim, J. H., & Sur, J. H.: Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. „Journal of Comparative Pathology”, 2013, 148 (4), 298–306.
  40. Klopffleisch R. Personalised medicine in veterinary oncology: one to cure just one. „Vet J.”, 2015, Aug; 205 (2): 128–35.
  41. Kunthoth, S., Al-maadeed, S., Akbari, Y., & Al Saady, R. M.: Computational methods for breast cancer molecular profiling using routine histopathology: a review. „Archives of Computational Methods in Engineering”, 2025, 1–23.
  42. Kwon, J. Y., Moskwa, N., Kang, W., Fan, T. M., & Lee, C.: Canine as a comparative and translational model for human mammary tumor. „Journal of breast cancer”, 2023, 26 (1), 1.
  43. Makki, J.: Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. „Clinical medicine insights: Pathology”, 2015, 8, CPath–S31563.
  44. Maniscalco L, Millán Y, Iussich S, Denina M, Sánchez-Céspedes R, Gattino F, Biolatti B, Sasaki N, Nakagawa T, Di Renzo MF, de Las Mulas JM, De Maria R: Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) in triple negative feline mammary carcinomas. „BMC Vet Res.”, 2013, Apr 15; 9: 80.
  45. Millanta, F., Calandrella, M., Citi, S., Della Santa, D., & Poli, A.: Overexpression of HER-2 in feline invasive mammary carcinomas: an immunohistochemical survey and evaluation of its prognostic potential. „Veterinary Pathology”, 2005, 42 (1), 30–34.
  46. Misdorp, W.: Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. „World Health Organization International histological classification of tumors of domestic animals second series”, 1999, 7, 1–59.
  47. Monjo, T., Koido, M., Nagasawa, S., Suzuki, Y., & Kamatani, Y.: Efficient prediction of a spatial transcriptomics profile better characterizes breast cancer tissue sections without costly experimentation. „Scientific reports”, 2022, 12 (1), 4133.
  48. Munson L, Moresco A. Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. „Breast Dis.”, 2007, 28: 7–21.
  49. Muscatello LV, Gobbo F, Di Oto E, Sarli G, De Maria R, De Leo A, Tallini G, Brunetti B: HER2 Overexpression and Cytogenetical Patterns in Canine Mammary Carcinomas. „Vet Sci.”, 2022, Oct 22; 9 (11): 583.
  50. Muscatello, L. V., Sarli, G., Beha, G., Asproni, P., Millanta, F. R. A. N. C. E. S. C. A., Poli, A. L. E. S. S. A. N. D. R. O., Brunetti, B.: Validation of tissue microarray for molecular profiling of canine and feline mammary tumours. „Journal of Comparative Pathology”, 2015, 152 (2–3), 153–160.
  51. Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., ... & Perou, C. M.: Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. „Clinical cancer research”, 2004, 10 (16), 5367–5374.
  52. Nosalova, N., Huniadi, M., Horňáková, I., Valencáková, A., Horňák, S., Nagoos, K., ... & Cizkova, D.: Canine mammary tumors: classification, biomarkers, traditional and personalized therapies. „International Journal of Molecular Sciences”, 2024, 25 (5), 2891.
  53. Owen, L. N.: TNM Classification of Tumors in Domestic Animals. „WHO”, 1980.
  54. Pastor, N., Ezquerro, L. J., Santella, M., Caballé, N. C., Tarazona, R., & Durán, M. E.: Prognostic significance of immunohistochemical markers and histological classification in malignant canine mammary tumours. „Veterinary and Comparative Oncology”, 2020, 18 (4), 753–762.
  55. Peña, L., Andrés, P. D., Clemente, M., Cuesta, P., & Pérez-Alenza, M. D.: Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. „Veterinary Pathology”, 2013, 50 (1), 94–105.
  56. Perossi, I. F., Saito, M. M., Varallo, G. R., de Godoy, B. L. V., Colombo, J., & Zuccari, D. A.: Protein expression of PI3K/AKT/mTOR pathway targets validated by gene expression and its correlation with prognosis in canine mammary cancer. „Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia”, 2022, 27 (3), 241–252.
  57. Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... & Botstein, D.: Molecular portraits of human breast tumours. „Nature”, 2000, 406 (6797), 747–752.
  58. Ramalho, L. N. Z., Ribeiro-Silva, A., Cassali, G. D., & Zucoloto, S.: The expression of p63 and cytokeratin 5 in mixed tumors of the canine mammary gland provides new insights into the histogenesis of these neoplasms. „Veterinary Pathology”, 2006, 43 (4), 424–429.
  59. Razavirad, A., Rismanchi, S., Mortazavi, P., & Muhammadshejad, A.: Canine Mammary Tumors as a Potential Model for Human Breast Cancer in Comparative Oncology. „Veterinary Medicine International”, 2024 (1), 9319651.
  60. Rezaie, A., Tavasoli, A., Bahonar, A., & Mehrazma, M.: Grading in canine mammary gland carcinoma. „Journal of Biological Sciences”, 2009
  61. Rutteman G. R., Withrow S. J.: Tumors of the mammary gland. In: Withrow S. J., MacEwen E. G., editors. „Small Animal Clinical Oncology. 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders”, 2001, p. 455–77.
  62. Santos, M., Correia-Gomes, C., Marcos, R., Santos, A., De Matos, A., Lopes, C., & Dias-Pereira, P.: Value of the Nottingham histological grading parameters and Nottingham prognostic index in canine mammary carcinoma. „Anticancer research”, 2015, 35 (7), 4219–4227.
  63. Santos, M., Correia-Gomes, C., Santos, A., de Matos, A., Rocha, E., Lopes, C., & Pereira, P. D.: Nuclear pleomorphism: role in grading and prognosis of canine mammary carcinomas. „The Veterinary Journal”, 2014, 200 (3), 426–433.
  64. Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., & Sarli, G.: Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. „BMC Veterinary Research”, 2010, 6 (1), 5.
  65. Sommerville L, Howard J, Evans S, Kelly P, McCann A. Comparative gene expression study highlights molecular similarities between triple negative breast cancer tumours and feline mammary carcinomas. „Vet Comp Oncol”. 2022 Jun; 20 (2): 535–538.
  66. Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., ... & Børresen-Dale, A. L.: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. „Proceedings of the National Academy of Sciences”, 2001, 98 (19), 10869–10874.
  67. Stuart-Harris, R., Caldas, C., Pinder, S. E., & Pharoah, P.: Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. „The Breast”, 2008, 17 (4), 323–334.
  68. Tavasoly, A., Golshahi, H., Rezaie, A., & Farhadi, M.: Classification and grading of canine malignant mammary tumors. „In Veterinary research forum: an international quarterly journal”, 2013, (Vol. 4, No. 1, p. 25).
  69. Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E.: Breast cancer: a molecularly heterogeneous disease needing subtype-specific treatments. „Medical Sciences”, 2020, 8 (1), 18.
  70. Turova, P., Kushnarev, V., Baranov, O., Butusova, A., Menshikova, S., Yong, S. T., ... & Kotlov, N.: The Breast Cancer Classifier refines molecular breast cancer classification to delineate the HER2-low subtype. „npj Breast Cancer”, 2025, 11 (1), 19.
  71. Varallo, G. R., Gelaleti, G. B., Maschio-Signorini, L. B., Moschetta, M. G., Lopes, J. R., De Nardi, A. B., & De Campos Zuccari, D. A. P.: Prognostic phenotypic classification for canine mammary tumors. „Oncology letters”, 2019, 18 (6), 6545–6553.
  72. Vazquez, E., Lipovka, Y., Cervantes-Arias, A., Garibay-Escobar, A., Haby, M. M., Queiroga, F. L., & Velazquez, C.: Canine mammary cancer: State of the art and future perspectives. „Animals”, 2023, 13 (19), 3147.
  73. Willipinski-Stapelfeldt, B., Riethdorf, S., Assmann, V., Woelfle, U., Rau, T., Sauter, G., ... & Pantel, K.: Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. „Clinical Cancer Research”, 2005, 11 (22), 8006–8014.
  74. Zappulli, V., Caliori, D., Rasotto, R., Ferro, S., Castagnaro, M., & Goldschmidt, M.: Proposed classification of the feline „complex” mammary tumors as ductal and intraductal papillary mammary tumors. „Veterinary Pathology”, 2013, 50 (6), 1070–1077.
  75. Zappulli, V., Peña, L., Rasotto, R., Goldschmidt, M. H., Gama, A., Scruggs, J. L., & Kiupel M.: Mammary tumors. In: Kiupel M., editor. Surgical Pathology of Tumors in Domestic Animals. Volume 2. „Davis-Thompson DVM Foundation; Washington, DC, USA”, 2019, 86–89.
  76. Zheng, H., Du, C., Tang, X., Zhang, Y., Huang, R., Yu, C., & Xie, G.: The development of molecular typing in canine mammary carcinomas. „Molecular Biology Reports”, 2022, 49 (9), 8943–8951.

**Daria Jankowska,**  
e-mail: daria\_jankowska@sggw.edu.pl