

**PATOHISTOLOŠKI I IMUNOHISTOHEMIJSKI PARAMETRI ZNAČAJNI ZA
PROGNOZU I TERAPIJU TUMORA PASA I MAČAKA*****PATHOHISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PARAMETERS
SIGNIFICANT FOR PROGNOSIS AND THERAPY OF TUMOURS IN CATS AND DOGS****Aleksić-Kovačević Sanja, Vučićević Ivana, Aničić M.****

Razvoj tumora podrazumeva nesklad između proliferacije, rasta i diferencijacije, što je praćeno značajnim genotipskim i fenotipskim varijacijama kod obolele jedinke. Brojni onkogeni efekti inhibišu starenje ćelije, apoptozu i maturaciju, a stimulišu proliferaciju, ćelijsku migraciju i tkivnu invaziju kod ljudi i životinja. Kvalitativno i kvantitativno određivanje bioloških prognostičkih faktora u tkivu obolelih pasa i mačaka govori direktno o sposobnosti metastaziranja tumora, a time i o prognozi neoplastične bolesti. Praćenje kliničkih i bioloških prognostičkih faktora značajno je za terapiju i predikciju tumora kod ljudi i životinja. Određivanje proliferativnog potencijala tumorskih ćelija, imunohistohemijskom detekcijom Ki-67 i PCNA koristi se u gradiranju nekih tumora kod pasa i mačaka. Faktore angiogeneze i brojne aktivirajuće i inhibitorne proteine, moguće je takođe imunohistohemijski dokazati u tkivu tumora. Oni su uz ostale histološke, kliničke i biološke parametre značajni za dalju prognozu i terapiju neoplastičnih bolesti.

Ključne reči: prognostički markeri, tumori, imunohistohemija, psi, mačke

Normalna tkiva u procesu obnavljanja i rasta ispoljavaju ravnotežu između ćelijske proliferacije, diferencijacije i programirane ćelijske smrti. Nasuprot ovome, razvoj tumora podrazumeva nesklad između proliferacije, rasta i diferencijacije, što je praćeno značajnim genotipskim i fenotipskim varijacijama kod obolele jedinke. Scenario brojnih onkogenih efekata na inhibiciju starenja i sazrevanja ćelije, zatim na stimulaciju proliferacije, ćelijske migracije i tkivne invazije, odgovoran

* Rad primljen za štampu 24. 03. 2015. godine

** Dr sc. vet. med. Sanja Aleksić-Kovačević, redovni profesor; dr sc. vet. med. Ivana Vučićević, asistent; Milan Aničić, dr vet. med., student doktorskih akademskih studija Katedra za patološku morfologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

je za nastanak tumora kod ljudi i životinja. Danas se ovom aspektu veterinarske onkologije pridaje sve veći značaj. Postalo je sasvim jasno, da kvalitativno i kvantitativno određivanje bioloških prognostičkih faktora u tkivu obolelih pasa i mačaka govori direktno o sposobnosti metastaziranja tumora, a time i o prognozi neoplastične bolesti. Istovremeno, praćenje kliničkih i bioloških prognostičkih faktora značajno je za terapiju i predikciju tumora kod ljudi i životinja (Aleksić-Kovačević i sar., 2005; Stevanović i sar., 2013).

Volumen primarnog tumora (T-stadijum) je kod nekih karcinoma veoma važan faktor za predikciju tumora. Studije koje su se bavile koreliranjem veličine tumora mlečne žlezde i metastatskog potencijala, odnosno stope preživljavanja kod pasa, ukazuju na znatno kraće preživljavanje u slučaju većih (T3) primarnih tumora (Magaš i sar., 2007). Veći T stadijum je takođe i u vezi sa češćim nalazom metastatskih ćelija u krvnim i limfnim sudovima (Ferreira i sar., 2009). U poslednje vreme sve je značajnija klinička korelacija veličine tumora mlečne žlezde sa ekspresijom estrogenih (ER) i progesteronskih (PR) receptora. Uz to, izučavanje ekspresije citoskeletnih proteina ukazuje na postojanje mezenhimske transformacije u nekim epitelnim neoplazmama, što korelira sa stepenom dediferencijacije i malignitetom u tumorima mlečne žlezde. Ovo se imunohistohemijskim metodama lako dokazuje u neoplastičnom tkivu, primenom odgovarajućih antitela za vimentin i dezmin (Jović i sar., 2007). Rezultati ovakvih ispitivanja mogu se upotrebiti kao značajan prognostički faktor rasta, a posebno su važni sa aspekta terapije.

U nekim karcinomima kod ljudi, kao što su adenokarcinom kolona i adenokarcinom mlečne žlezde, ustanovljena je značajno povećana aktivnost enzima ciklooksigenaze (COX-2) (Kang i sar., 2011; Rahman i sar., 2012; Roelofs i sar., 2014). Novija ispitivanja izvedena na tkivu pasa i mačaka sa adenokarcinomima ukazuju na povećanu ekspresiju COX-2 kako u preneoplastičnim tako i u neoplastičnim lezijama (Knudsen i sar., 2013). Ustanovljeno je, imunohistohemijskim ispitivanjima, da COX-2 nije ekspimirana u normalnom žlezdanom tkivu kod pasa i mačaka. Intenzivna ekspresija ovog enzima uočava se već u ranim histološkim gradusima tumora mlečne žlezde, a značajno raste sa stepenom maligniteta. Najintenzivnija ekspresija COX-2 zapaža se kod slabo diferentovanih tumora mlečne žlezde, sa najvećim histološkim gradusom, bez obzira na morfološki tip tumora (tubulopapilarni, solidni, cistični) (van Nes i sar., 2011). Danas je jasno da ciklooksigenaza ima ulogu u procesu rasta i angiogeneze tumora. Naime, ustanovljena je direktna korelacija COX-2 ekspresije sa ekspresijom vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF). Na animalnim modelima je dokazano da inhibitori koji zaustavljaju angiogenezu, inhibišu i delovanje ciklooksigenaze. Prema tome, COX-2 je značajan farmakološki target u terapiji adenokarcinoma kod ljudi i životinja (Millanta i sar., 2006).

Poznato je da u neoplastičnim procesima kod ljudi i životinja infiltracija limfnih čvorova (N-stadijum) korelira sa rizikom nastanka metastaza. Ovde treba imati u vidu i činjenicu da se većina neoplastičnih procesa kod pasa i mačaka klinički

dijagnostikuje tek u momentu kada su nastupile udaljene metastaze. Metastaze tumora (M-stadijum) često se slučajno nalaze na obdukciji, a da pre toga životinja nije pokazivala, za vlasnika uočljive kliničke manifestacije bolesti. Ovo se posebno u praksi odnosi na neke sekundarne depozite u jetri. Nasuprot tome, karcinomi štitaste žlezde kod pasa, u preko 60% slučajeva postaju veoma brzo klinički detektibilni palpacijom. Tvrde su konzistencije i vršeći pritisak na traheju uzrokuju respiratorne poremećaje, što je takođe veoma rano klinički uočljivo. Kod ovih malignih tumora N-stadijum nije pouzdan klinički parametar jer karcinomi štitaste žlezde retko metastaziraju u retrofaringealne i cervikalne limfne čvorove. Naime, zbog vrlo ranog prodora ćelija tireoidnog karcinoma u ogranke tireoidnih vena, prve metastaze se načešće zapažaju u plućima (Kurishima i sar., 2014).

Ostali klinički prognostički faktori se razlikuju među različitim studijama u kojima se izučavaju tumori pasa i mačka. Mnogi autori sugerišu da pol i starost ne utiču značajno na prognozu većine tumora kod životinja. Izuzetak u tome predstavljaju tumori mlečne žlezde čija prognoza je znatno lošija pri istom histološkom gradusu kod mužjaka nego kod ženki (Uva et al., 2009).

U nekim slučajevima presudan značaj za dalju prognozu i terapiju tumora ima virusni status. Naime, poznato je da kod ljudi sa nediferentovanim karcinomom nazofarinksa, pozitivan EBV status (*Epstein-Barr virus*) predstavlja značajan prognostički faktor. Razlog za ovo je mogućnost primene terapijskih protokola kod ove virusne infekcije (Terzić, 2010). Nasuprot tome, pozitivan retrovirusni (FeLV) status kod mačaka umanjuje smisao terapije neoplastične bolesti, favorizujući eutanaziju kao jedino rešenje u slučaju retrovirusima indukovano limfoma mačaka. Takođe, imunofenotipizacija limfoma kod mačaka nema prediktivni značaj, ukoliko je životinja FeLV pozitivna (Kovačević i sar., 1997). Nasuprot tome, kod pasa je imunofenotipizacija limfoma dragocena dijagnostička i prognostička procedura i predstavlja preduslov za primenu odgovarajuće terapije. Dva faktora značajna za prognozu limfoma kod pasa su imunofenotip i podstadijum bolesti određen prema klasifikaciji tumora po kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije - WHO (Valli i sar., 2002). Većina autora smatra da su psi sa CD3 imunoreaktivnim tumorima (T-ćelijski limfomi) izloženi kraćoj remisiji i vremenu preživljavanja, od onih sa B-ćelijskim limfomima (Aleksić-Kovačević i Jelesijević, 2001). Nakon primene odgovarajućeg hemioterapijskog protokola, 80% pasa sa B-ćelijskim limfomom ulaze u remisiju u prvoj godini. Takođe, psi koji imaju prema WHO klasifikaciji podstadijum bolesti B (klinički obolele životinje), imaju lošiju prognozu od pasa sa podstadijumom A limfoma.

Za razliku od pasa, CD3 imunoreaktivnost limfoma nije loš prognostički znak kod mačaka. Kod ovih životinja svakako je najznačajniji prognostički činilac FeLV status, pa je neophodno prvo isključiti FeLV infekciju, a onda primeniti odgovarajući hemioterapijski protokol. U tom slučaju mogućnost preživljavanja kod trećine mačaka sa ovakvim limfomima iznosi oko osamnaest meseci od momenta postavljanja dijagnoze (Aleksić-Kovačević, 2005; Aleksić-Kovačević, 1999).

Terapijski pristup neoplastičnim procesima je značajan za dalje preživljavanje, a za sprovođenje odgovarajuće i efikasne terapije histološki i imunohistohemijski dijagnostički parametri imaju presudnu ulogu. Evidentno je, kao i kod ljudi, da svi psi sa istim histološkim tipom tumora, u istom kliničkom stadijumu i sa istim terapijskim pristupom, nemaju istu dužinu preživljavanja. Postoje danas brojni pokušaji u humanoj i u veterinarskoj medicini, da se istraživanjem genetske osnove malignih tumora utvrde prognostički faktori od značaja za individualnu dužinu preživljavanja. U tom smislu definisanje prognostičkih faktora koji se odnose na genotipska i imunofenotipska obeležja tumorske ćelije, bilo bi značajno za terapijsko odlučivanje. Mnogobrojne dosadašnje studije o značaju prognostičkih biomarkera odnose se na neoplastične procese kod ljudi. Tako je genetskim ispitivanjima utvrđeno da je kod ljudi sa akutnom limfoblastnom leukemijom postojanje Filadelfija hromozoma, povezano sa lošijom prognozom i kraćim preživljavanjem. Druga genetska ispitivanja ukazuju da je broj hromozoma u ćelijama transmisivnog veneričnog tumora (TVT) kod pasa 57 do 64, dok je normalan broj hromozoma kod pasa 78. Uz to, novija ispitivanja imunofenotipizacije ovih tumora, ukazuje na njihovo poreklo iz monocitnih prekursora u kostnoj srži i na klonsku transmisiju (Kabuusu i sar., 2010).

Regulacija ćelijskog ciklusa obuhvata brojne aktivirajuće i inhibitorne proteine čiji je poremećaj evidentan u mnogim malignim tumorima kod ljudi i životinja. Proteinski produkt p53 tumor supresor gena, nadzire integritet DNK. Naime, u slučaju oštećenja DNK utiče na zaustavljanje ćelijskog ciklusa kako bi se oštećenje popravilo, ili završilo apoptozom. Tako se sprečava prenošenje mutacije na ćelije ćerke. Gubitak ili mutacija p53 je udružen sa povećanim rizikom za nastanak tumora i predstavlja daleko najčešću genetsku alteraciju u tumorima. Poznato je da su proteini mutiranog p53 gena mnogo stabilniji, i akumuliraju se u jedru tumorskih ćelija gde se lako detektuju imunohistohemijskim metodama. Ekspresija p53 opisuje se kao prognostički faktor preživljavanja u mnogim malignim tumorima: neoplazmama pluća (Yamashita i sar., 2008), tumorima limfatičnog tkiva (Zenz i sar., 2008) i u tumorima kože kod pasa i mačaka (Murakami i sar., 2000). Za mutaciju p53 gena mogu biti odgovorni i latentni virusni geni kao što su EBV kod ljudi i laboratorijskih glodara, FeLV i FeSV geni kod mačaka, BLV kod goveda i drugi. Većina autora iznosi podatke da mutacija p53 kod pasa korelira sa progresijom bolesti i odgovorom na terapiju (Lee i sar., 2004).

Relativno česta karakteristika maligne ćelije je rezistencija na apoptozu. Jedan od proteina koji sprečava tumorsku ćeliju da uđe u proces apoptoze je Bcl-2. Ovaj protein je lokalizovan na unutrašnjoj membrani mitohondrija, endoplazmatskom retikulumu i jedrovoj membrani. Mnogobrojni faktori koji izazivaju oštećenje ćelije dovode do interakcije anti- i pro-apoptotskih članova Bcl-2 porodice. Od uzajamne reakcije ovih proteina zavisi da li će proteolitička kaskada kaspaza, egzekutora apoptoze, biti aktivirana. Ako su u ravnoteži, obezbeđena je homeostaza, a ako postoji povećana ekspresija anti-apoptotskih ili smanjena ekspresija pro-apoptotskih proteina, nastaje tumor. Pored glavne

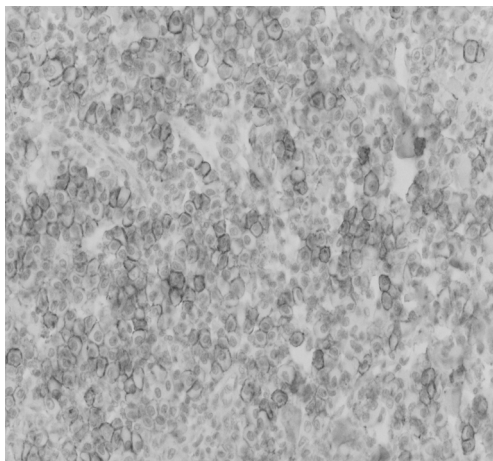
uloge Bcl-2 u inhibiciji apoptoze, proteini Bcl-2 familije utiču i na ćelijski ciklus, odnosno na prelaz između faze mirovanja i proliferacije. Aberantna ekspresija Bcl-2 opisana je kod mnogih karcinoma. Povećana ekspresija Bcl-2 u tumorskim ćelijama mogla bi uz druge prognostičke faktore ukazati na lošu prognozu (Youle i Strasser, 2008).

Poremećaj regulacije ćelijskog ciklusa može dovesti do nekontrolisanog ćelijskog rasta i razvoja malignog tumora. Ciklini su pozitivni regulatori ćelijskog ciklusa i njihova povećana ekspresija je povezana sa ubrzanom proliferacijom tumorskih ćelija. Tokom rane G1 faze ćelijskog ciklusa izražena je ekspresija ciklina D1, koji deluje na mestima poznatim kao „mesta provere“ (*checkpoints, engl.*). Prognostički značaj ciklina D1 ispitivan je u tumorima ljudi, ređe kod životinja, ali se u nekim karcinomima opisuje povećana ekspresija ciklina D1 i dovodi se u vezu sa nastankom rane ponovne pojave tumora i kraćim preživljavanjem (Dong i sar., 2014). Postoje međutim i rezultati ispitivanja ovog prognostičkog faktora kod ljudi koji ukazuju da gubitak ekspresije ciklina D1 dovodi do lokalnog recidiva (Wang i sar., 2014). Ekspresija ciklina D1 praćena je na tumorima mlečne žlezde kuja i to u prekancerskim i razvijenim kancerskim lezijama. Rezultati ovih ispitivanja, ukazali su da je ekspresija ciklina D bila nezavisna od morfološkog tipa proliferativne lezije. Naime, ciklin D1 bio je eksprimiran u 60% slučajeva u prekancerskim lezijama i u 44% slučajeva u kancerskim lezijama u mlečnoj žlezdi kuja. Obe lezije sa povećanom ekspresijom ciklina D1 pokazivale su veći proliferativni potencijal (Sfacteria i sar., 2003).

S obzirom na to da se mutacije K-Ras gena smatraju ranim događajem u karcinogenezi i tumorskoj progresiji, i da je onkogeno aktivacija Ras signalnog puta uključena u mnoge aspekte malignog procesa, pretpostavlja se da K-Ras mutacioni status može biti prognostički faktor u mnogim tumorima. Prema nekim studijama K-Ras mutacije su asociirane sa tumorima višeg stadijuma, povećanim metastatskim potencijalom, lošijom prognozom i smanjenim sveukupnim preživljavanjem (*Overall survival – OS, engl.*) i preživljavanjem bez progresije bolesti (*Progression free survival – PFS, engl.*) (Andreyev i sar., 1998; Pinho i sar., 2009). Međutim, podaci o prognostičkoj vrednosti K-Ras mutacija kod različitih tumora su kontroverzni i zahtevaju dodatne potvrde (Uva i sar., 2009).

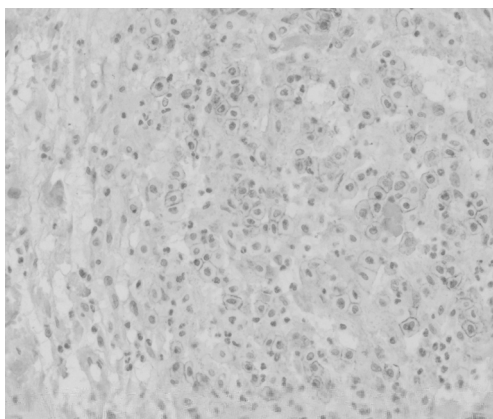
CD117 (c-Kit protein) pripada porodici receptora tirozin kinaza i ključni je medijator proliferacije progenitorskih ćelija. Normalna ekspresija CD117 opisana je u mastocitima, ćelijama hematopoeze, duktalnom epitelu, melanocitima, parijetalnim ćelijama želuca i ćelijama jajnika. Pored toga što ima ulogu u normalnom rastu i diferencijaciji, CD117 korelira i sa prognozom mnogih malignih tumora, a sve veći značaj ima kao target terapijski molekul. Malobrojni su podaci o njegovom značaju u patogenezi i prognozi tumora kod pasa i mačaka, a odnose se na procenu biološkog ponašanja mastocitoma kod pasa. Za razliku od ranijih istraživanja koja proučavaju odnos između intenziteta imunohistohemijskog bojenja, koji ukazuje na stepen ekspresije KIT proteina, i stepena maligniteta

tumora (Reguera i sar., 2000), novije studije ispituju povezanost ekspresije aberantnih (citoplazmatskih) tipova CD117 i histološkog stepena mastocitoma (slika 1 i 2) (Kiupel i sar., 2004; Da Costa i sar., 2007; Vučićević, 2014; Marinković i sar., 2015).



Slika 1. Mastocitomi visokog stepena maligniteta – membranska i fokalno citoplazmatska ekspresija CD117, CD117, LSAB2, x 400

Picture 1. High grade mast cell tumor - CD117 expression, membranous and focal cytoplasmic expression, CD117, LSAB2, 400x



Slika 2. Mastocitom niskog stepena maligniteta - membranska ekspresija CD117, CD117, LSAB2, x 400

Picture 2. Low grade mast cell tumor - CD117 expression, membranous expression, CD117, LSAB2, 400x

Syndecan-1 (CD138) je površinski ćelijski proteoglikan koji učestvuje u međućelijskoj i ćelijsko-stromalnoj reakciji i u migraciji. Normalno se ispoljava na epitelnim i endotelnim ćelijama kao i glatkomišićnim ćelijama krvnih sudova. Gubitak ekspresije CD138 na tumorskoj ćeliji dovodi do smanjenja međućelijske kohezije i povećanog invazivnog i metastatskog potencijala tumora (Ishikawa i Kramer, 2010). Međutim, udružen nalaz ekspresije CD138 na tumorskim ćelijama limfoma kod pasa i odmaklog kliničkog stadijuma, predstavlja izazov za dalja ispitivanja.

Rast metastatskog tumora je autonoman, mada je u izvesnoj meri i pod uticajem faktora rasta domaćina (*Tumor growth factor* - TGF, engl. i *Platelets derived growth factor* - PDGF, engl.) koji stimulišu rast novih krvnih sudova. Angiogeneza predstavlja stvaranje novih kapilara iz postojećih krvnih sudova i ključni je faktor u održavanju tumorskog rasta i metastaziranja. Tumor koji nije u stanju da organizuje sopstvenu vaskularizaciju ne raste, već ostaje u obliku grupe ćelija koja se hrani izmenjujući hranjive materije prostom difuzijom sa okolinom. Tumorske ćelije, posebno dobri klonovi, imaju osobinu stvaranja faktora koji stimuliše angiogenezu (*Tumor angiogenesis factor* - TAF, engl.). Ovaj ribonukleoprotein direktno deluje na stimulaciju deobe endotelnih ćelija kapilara.

Faktore angiogeneze moguće je imunohistohemijski dokazati u tkivu tumora, što ih uz ostale histološke, kliničke i biološke parametre čini značajnim za dalju prognozu i terapiju neoplazme. Angiogeneza je posredovana faktorima rasta, od kojih poseban značaj za stimulaciju migracije i proliferacije endotelnih ćelija ima vaskularni endotelni faktor rasta (*Vascular endothelial growth factor* – VEGF, engl.). Produkuju ga makrofagi, glatko-mišićne ćelije krvnih sudova i tumorske ćelije. Ovaj faktor svoje delovanje na endotelne ćelije ispoljava posredstvom dve vrste receptora koji imaju aktivnost tirozin kinaze. Prognostički značaj ekspresije VEGF dokazan je u nekim malignim tumorima: u kolorektalnom karcinomu, adenokarcinomima mlečne žlezde i skvamozno-ćelijskim karcinomima. Povećana ekspresija VEGF u pojedinim malignim tumorima kod pasa i mačaka, dovodi se u vezu sa tumorskom progresijom i većim rizikom za metastaziranjem u limfne čvorove, što korelira sa lošom prognozom (Patruno i sar., 2009).

Određivanje proliferativnog potencijala tumorskih ćelija, imunohistohemijskom detekcijom Ki-67 (MIB-1), koristi se često u gradiranju nekih tumora kod pasa i mačaka, pre svega limfoma, tumora mlečne žlezde, mastocitoma i tumora nervnog sistema. Pored ekspresije Ki-67, za utvrđivanje proliferativnog potencijala tumora koriste se i detekcija ćelijskog antigena proliferacije (*proliferating cell nuclear antigen* - PCNA, engl.) kao i argirofilnog nukleolarnog organizacionog regiona – AgNOR. Međutim, od svih navedenih metoda, detekcija Ki-67 i AgNOR se smatraju najjednostavnijim i najpouzdanijim tehnikama (Jelesijević i sar., 2003; Webster i sar., 2007). Posebno korisni rezultati dobijeni su kod određivanja proliferativnog potencijala mastocitoma kod pasa primenom ovih tehnika (Aleksić-Kovačević i sar., 2005; Majkić-Singh, 2006). Takođe je u nekim neoplazmama kod

Ijedi dokazano da ekspresija Ki-67 ima prediktivan značaj za reakciju tumora na hemioterapiju.

Pored navedenih markera ćelijske proliferacije u tkivima, u onkologiji se danas intenzivno određuje prisustvo i koncentracija tumorskih markera u krvi ili telesnim tečnostima. Tumorski markeri su supstance koje stvaraju ili sami tumori ili domaćin kao odgovor na tumor, a koriste se za utvrđivanje prisustva tumora. Takve supstance se nalaze u ćelijama, tkivima ili telesnim tečnostima, a mere se kvalitativno ili kvantitativno, hemijski, imunološki, genomskim ili proteomskim metodama. Tumorski markeri mogu biti biohemijski ili imunološki pokazatelji stadijuma tumora. Brojni tumorski markeri odražavaju supstance koje se normalno embriološki stvaraju u odgovarajućim tkivima. Prvi opisani tumorski marker je bio *Bence-Jonesov* protein. Mnogo godina posle ovog otkrića, identifikovani su brojni hormoni, enzimi, izoenzimi i drugi proteini, čija se koncentracija u telesnim tečnostima menja usled postojanja malignog procesa. Primena tumorskih markera je ograničena u oblasti skrininga, dijagnostikovanja, procenjivanja prognoze, utvrđivanja stepena i lokalizacije tumora. To znači da je većina tumorskih markera prvenstveno značajna za praćenje terapije, a da je samo nekoliko njih korisno za rano otkrivanje tumora. Skoro nijedan tumorski marker nije značajan u prevenciji oboljenja. Nove tehnologije u biomedicini će svakako omogućiti razvoj i primenu novih biomarkera kao tumorskih markera (Majkić-Singh, 2006).

Zaključujemo da je za postavljanje valjane dijagnoze, predikcije i terapije tumora od neprocenjivog značaja izučavanje bioloških prognostičkih faktora u samom tkivnom isečku tumora. Ovo favorizuje imunohistohemijsko određivanje, pre svega, prognostičkih faktora rasta, odnosno markera ćelijske proliferacije, faktora angiogeneze i brojnih aktivirajućih i inhibitornih proteina. Rezultati imunohistohemijskih metoda, dobijeni primenom odgovarajućih primarnih antitela, predstavljaju danas esencijalni preduslov za prognozu i terapiju neoplastičnih bolesti kod pasa i mačaka.

Literatura / References

1. Aleksić-Kovačević S, Jelesijević T. Morphological, histopathological and immunohistochemical study of canine malignant lymphoma. *Acta Vet* 2001; 51: 245-54.
2. Aleksić-Kovačević S, Kukulj V, Jelesijević T, Jovanović M. Retrospective analysis of canine mesenchymal tumors of skin and soft tissues. *Acta Vet* 2005; 55: 521-9.
3. Aleksić-Kovačević S, Kukulj V, Marinković D, Knežević M. Retrospective study of canine epithelial and melanocytic tumors. *Acta Vet* 2005; 55: 319-26.
4. Aleksić-Kovačević S. Limfomi pasa i mačaka. Srbija, Beograd: Mladost biro, 2005.
5. Aleksić-Kovačević S. Retrovirusne infekcije mačaka. Srbija, Beograd: Minax, 1999.
6. Andreyev N, Norman R, Cunningham D. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the RASCAL II study. *Br J Cancer* 2001; 85: 692-6.
7. Da Costa RMG, Matos E, Rema A, Lopes C, Pires MA, Gärtner F. CD117 immunorexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Vet Res* 2007; 3: 19-29.

8. Dong M, Wei H, Hou JM, Gao S, Yang D, Lin ZH. Possible prognostic significance of p53, cyclin D1 and Ki-67 in the second primary malignancy of patients with double primary malignancies. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(7): 3975-83.
9. Ferreira E, Bertognoli AC, Cavalcanti MF, Schmitt F, Cassali GD. The relationship between tumor size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumors. *Vet Comp Oncology* 2009; 7: 230-5.
10. Ishikawa T, Kramer RH. Sdcl1 negatively modulates carcinoma cell motility and invasion. *Exper Cell Res* 2010; 316: 951-65.
11. Jelesijević T, Jovanović M, Knežević M, Aleksić-Kovačević S. Quantitative and qualitative analysis of AgNOR in benign and malignant canine mammary gland tumors. *Acta Vet* 2003; 53(5-6): 353-60.
12. Jović S, Magaš V, Aleksić-Kovačević S. Co-expression of vimentin and cytokeratin in bitch mammary gland tumors. *Acta Vet* 2007; 57: 247-55.
13. Kabuusu RM, Stroup DF, Fernandez C. Risk factors and characteristics of canine transmissible venereal tumors in Grenada, West Indies. *Vet Comp Oncol* 2010; 8: 50-5.
14. Kang H, Song KH, Jeong KC, Kim S, Choi C, Lee CH, Oh SH. Involvement of Cox-2 in the metastatic potential of chemotherapy-resistant breast cancer cells. *BMC Cancer* 2011; 11: 334.
15. Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB, Miller R, Yuzbasiyan-Gurkan V. The use of kit and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 2004; 41(4): 371-7.
16. Knudsen CS, Williams A, Brearley MJ, Demetriou JL. COX-2 expression in canine anal sac adenocarcinomas and in non-neoplastic canine anal sacs. *Vet J* 2013; 197(3): 782-7.
17. Kovačević S, Kipar A, Kremendahl J, Teebkenschuler D, Grant CK, Reinacher M. Immunohistochemical diagnosis of feline leukemia virus infection in formalin-fixed tissue. *E Journ Vet Pathol* 1997; 3: 67-72.
18. Kurishima K, Kagohashi K, Ishibashi A, Takayashiki N, Satoh H. Nodular metastatic lung tumor from thyroid carcinoma. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2014; 20: 449-52.
19. Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang M, Kim D, Kweon OK. Mutation and overexpression of p53 as prognostic factor in canine mammary tumors. *J Vet Sci* 2004; 5(1): 63-9.
20. Magaš V, Jović S, Nešić V, Bacetić D, Aleksić-Kovačević S. Morphological and immunohistochemical assays of surgically removed mammary gland tumors in bitches. *Acta Vet* 2007; 57: 37-45.
21. Majkić-Singh N. Tumorski markeri: biohemija i klasifikacija. *Jugoslov Med Biohem* 2006; 25: 79-88.
22. Marinković D, Milčić-Matić N, Jovanović M, Vučićević I, Aleksić-Kovačević S. Morphological features and KIT receptor expression in dogs with canine cutaneous mast cell tumor and systemic mastocytosis. *Acta Vet* 2015; 65 (in press).
23. Millanta F, Citi S, Della Santa D, Porciani M, Poli A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 98: 115-20.
24. Murakami Y, Tateyama S, Rungsipat A, Uchida K, Yamaguchi R. Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *J Vet Med Sci* 2000; 62: 743-50.
25. Patruno R, Arpaia N, Gadaleta CD, Passantino L, Zizzo N, Misino A, Lucarelli NM, Catino A, Valerio P, Ribatti D, Ranieri G. VEGF concentration from plasma-activated platelets which correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. *J Cell Mol Med* 2009; 13(3): 555-61.
26. Pinho S, Carvalho S, Cabral J. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl Res Volume* 2012; 159(3): 214-9.

27. Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, Maruyama S, Sato T, Hayashi H, Ono T, Yamanoi A, Kohno H, Nagasue N. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. *Clin Cancer Res* 2001; 7:325-32.
28. Reguera MJ, Rabanal RM, Puigdemont A, Ferrer L. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *Am J Dermatopathol* 2000; 22(1): 49-54.
29. Roelofs HM, Te Morsche RH, van Heumen BW, Nagengast FM, Peters WH. Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC Gastroenterol* 2014; 14: 1.
30. Sfacteria A, Bertani C, Costantino G, Del Bue M, Paiardini M, Cervasi B, Piedimonte A, De Vico G. Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. *J Comp Pathol* 2003; 128: 245-51.
31. Stevanović O, Damjan R, Vučićević I, Marinković D, Aleksić-Kovačević S. Morphology, gradation and frequency of mastocytoma in dogs. *Veterinarski glasnik* 2013; 67(3-4): 153-62.
32. Terzić T. Patohistološki i imunohistohemijski parametri značajni za prognozu i terapiju nediferentovanog karcinoma nazofarinksa. Doktorska disertacija 2010.
33. Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics* 2009; 10: 135-9.
34. van Nes JG, de Kruijf EM, Faratian D, van de Velde CJ, Putter H, Falconer C. COX2 expression in prognosis and in prediction to endocrine therapy in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 125(3): 671-85.
35. Valli V, Jacobs R, Parodi A, Vernau W, Moore P. WHO international histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals. 2nd series, vol VIII. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 2002.
36. Vučićević I. Ekspresija antigena ćelijske proliferacije na mastocitima i njihov značaj za gradaciju mastocitoma pasa. Doktorska disertacija 2014.
37. Wang N, Wei H, Yin D, Lu Y, Zhang Y, Jiang D. Cyclin D1b overexpression inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in cervical cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(7): 4016-23.
38. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol* 2007; 44: 298-308.
39. Yamashita SI, Masuda Y, Yoshida N, Matsuzaki H, Kurizaki T, Haga Y, Ikei S, Miyawaki M, Kawano Y, Chujyo M, Kawahara K. p53AIP1 Expression can be a prognostic maker in non-small cell lung cancer. *Clin Oncol* 2008; 20: 148-51.
40. Youle RJ, Strasser A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 47-59.
41. Zenz T, Habe S, Denzel T, Winkler D, Dohner H, Stilgenbauer S. How little is too much? P53 inactivation: from laboratory cutoff to biological basis of chemotherapy resistance. *Leukemia* 2008; 22: 2257-8.

**PATHOHISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PARAMETERS
SIGNIFICANT FOR PROGNOSIS AND THERAPY OF TUMOURS IN CATS AND DOGS****Aleksić-Kovačević Sanja, Vučićević Ivana, Aničić M.**

The development of tumours implies a disproportion between proliferation, growth and differentiation, which is accompanied by significant genotypic and phenotypic variations in the diseased. The scenario of multiple oncogenic effects on the inhibition of cell growth, apoptosis and maturation, on the stimulation of proliferation, on cell migration and tissue invasion, is responsible for the occurrence of tumours both in humans and in animals. The qualitative and quantitative determination of biological prognostic factors in the tissue of affected cats and dogs directly indicates a possible tumour metastasizing, and consequently also the prognosis of neoplastic disease. Monitoring of clinical and biological prognostic factors is important for therapy and prediction of tumours in humans and animals. The determination of the proliferative potential of tumour cells by immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA is used in grading certain tumours in cats and dogs. It is also possible immunohistochemically to prove factors of angiogenesis and numerous activating and inhibiting proteins in the tumour tissue. In addition to other histological, clinical and biological parameters, they are significant for the further prognosis and therapy of neoplastic diseases.

Key words: prognostic markers, tumours, immunohistochemistry, dogs, cats

**ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ,
СУЩЕСТВЕННЫЕ ПРИ ПРОГНОЗИРОВАНИИ И ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛЕЙ
У СОБАК И КОШЕК****Алексич-Ковачевич Саня, Вучичевич Ивана, Аничич М.**

Развитие опухоли предполагает диссонанс между пролиферацией, ростом и дифференцировкой, что сопровождается существенными генотипическими и фенотипическими вариациями у больной особи. Многочисленные онкогенные эффекты ингибируют старение клетки, апоптоз и созревание, и стимулируют пролиферацию, клеточную миграцию и тканевую инвазию у людей и животных. Качественное и количественное определение биологических прогностических факторов в тканях больных собак и кошек дает информацию о способности метастазирования опухоли, и, тем самым, о прогнозе опухолевого заболевания. Мониторинг клинических и биологических прогностических факторов имеет существенное значение для терапии и прогнозирования опухоли у человека и животных. Определение пролиферативного потенциала опухолевых клеток путем иммуногистохимической детекции Ki-67 и PCNA используется при классификации некоторых опухолей у собак и кошек. Также иммуногистохимическим методом можно доказать присутствие в ткани опухоли факторов ангиогенеза и многочисленных активирующих и ингибиторных протеинов. Наряду с прочими гистологическими, клиническими и биологическими параметрами

они имеют существенное значение для прогнозирования и лечения опухолевых заболеваний.

Ключевые слова: прогностические маркеры, опухоли, иммуногистохимия, собаки, кошки