

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar

Belgyógyászat Tanszék és Klinika



**A cox-2 enzim expressziójának immunohisztokémiai
módszerrel történő vizsgálata kutyák emlődaganataiban**

Készítette: Dékay Valéria

Témavezető: dr. Vajdovich Péter

SZIE-AOTK, egyetemi docens

Budapest

2011

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	3
Emlődaganatok kutyában.....	4
Az emlődaganatok kialakulása.....	4
Megjelenés.....	6
Osztályozás.....	6
A prognózis meghatározása.....	8
Kezelés, terápiás lehetőségek.....	10
A Ciklooxygenáz-2 (Cox-2) enzim.....	11
A Cox-2 enzim szerepe az élettani és kóros folyamatokban.....	11
A Cox-2 enzim szerepe a daganatos sejtekben.....	12
Anyag és Módszer.....	14
A vizsgálatban szereplő állatok.....	14
A metszetek készítése.....	15
A Cox-2 expresszió kimutatásának immunhisztokémiai módszere.....	15
Értékelés.....	18
Statisztikai vizsgálatok.....	20
Eredmények.....	21
Következtetések.....	29
Összefoglalás.....	31
Summary (angol nyelvű összefoglalás).....	32
Rövidítések jegyzéke.....	33
Köszönetnyilvánítás.....	34
Irodalomjegyzék.....	35

Bevezetés

A daganatok bizonyítottan genetikus és epigenetikus folyamatok révén kialakuló elváltozások (Sarli és mtsai, 2002). Az emlődaganatok kialakulása is aberrált celluláris faktorok kifejeződésének a következményei. A túlzott hormon receptor expresszió, az elégtelenül lejátszódó apoptózis, valamint a sejt differenciálódásának diszregulációja együttesen okozói lehetnek az adott folyamatnak (Hanahan és Weinberg, 2000).

Az emlődaganatok a szuka kutyák egyik leggyakoribb daganat típusai közé tartoznak, az előforduló összes daganat típusának több mint 52%-át teszik ki (Benjamin és mtsai, 1999; Rutteman és mtsai, 2001). A kutya emlődaganatok vizsgálati eredményeit humánorvosi területeken nagyszerűen lehet hasznosítani, mivel a két típus biológiai, szövettani, és epidemiológiai viselkedése nagyon hasonló (MacEwen, 1990; Martin és mtsai., 1984; Misdorp és Hart, 1976; Rutteman és mtsai., 1988;).

A Ciklooxigenáz (Cox), más néven Prostaglandin endoperoxid szintetáz enzimek működését a daganatos sejtekben nem régóta vizsgálják a kutatók. A Ciklooxigenáznak két izoenzimjét ismerjük, a Cox-1 és Cox-2 enzimeket. Ezen gyulladásos mediátorok fehérjestruktúrája 40%-ban azonos, azonban különböző gének által kódoltak, valamint különböző biológiai funkcióval rendelkeznek (Williams és DuBois, 1998). Az egészséges sejtben is jelen lévő enzimek a prosztanoid bioszintézis lépéseit katalizálják (Hwang és mtsai, 1998). A Cox-1 a legtöbb szövetben expresszálódik, és olyan élettani folyamatokat szabályoz, mint a trombocita aggregáció, vese funkciók, gyomornyálkahártya védelme (DuBois és mtsai, 1998). A Cox-2 szerepe fontosabbnak bizonyult, mivel míg a normál emlőszövetben nem, vagy alig lehet Cox-2 expressziót detektálni, addig a daganatos sejtekben aktívan megtalálható és a közelmúlt kutatásai alapján jelentős szerepét sejtik a tumorgenezisben (Howe és mtsai, 2001). Kutatások szerint a benignus daganatok 24%-ában, malignus emlődaganatok 56-100%-ában van jelen Cox-2 (Dore és mtsai, 2003; Mohammed és mtsai, 2004). Ezen eredmények alapján szignifikáns kapcsolat látszik a Cox-2 expresszió, és az emlődaganatok között, amely kapcsolat fontos lehet a terápiás döntés során (Knapp és mtsai, 1994; Schmidt és mtsai, 2001; Dang és mtsai, 2002; Davies és mtsai, 2002).

Emlődaganatok kutyában

Az emlődaganatok a leggyakoribbak a kutyák daganat típusai közül. A szuka kutyákban előforduló daganatok több mint 50%-át teszik ki. A malignus daganat típusok közül is 20% emlődaganatos eset. Egy tanulmány szerint 10.000 kutya közül 100 hajlamos az emlődaganat kialakulására. Ugyanezen kutatás szerint az életkorral is összefüggés mutatható ki. Az eredmények alapján 1 éves kor felett 1%, 8 év felett 6%, 10 év felett pedig 13% esély van mind a benignus, mind a malignus emlődaganatok megjelenésére (Egenvall és mtsai, 2005). Egyes fajok (spániel, pudli) fokozottan érzékenyebbnak tűnnek e tumor típusok kialakulása iránt. A fentiek mellett leírtak pozitív korrelációt a testmérettel is. Egy kutatás szerint az esetek 25%-ban kis testű kutyákban, 58%-ban nagy testűekben diagnosztizálható az emlődaganat (Ishikawa és mtsai, 2005).

Az emlőkben előforduló daganatok fejlődése bizonyítottan hormonfüggő. A fiatalkori ivartalanítás tapasztalhatóan csökkenti a kialakulás esélyét. Korábban úgy gondolták, hogy a malignus daganatok megjelenését nem, de a benignus daganatokét segíti az ivartalanítás. Egy tanulmány szerint, ha a megjelenése nem is csökkent, de a 2 év alatt ivartalanított szuka kutyák túlélési ideje jelentősen megnövekedett malignus daganatok esetén is (Sorenmo és mtsai, 2000).

Az egészséges emlő szövetében jelen vannak mind ösztrogén receptorok (ERs), mind progeszteron receptorok (PRs). Kutatások szerint a jóindulatú folyamatok esetén a szövet ERs, és PRs szintje hasonlít az egészséges szöveti expresszióhoz (MacEwan és mtsai, 1985; Martin és mtsai, 1984; Takahashi és Matsuda, 1984; Rutteman és mtsai, 1988; Donnay és mtsai, 1995; Millanta és mtsai, 2005). Rosszindulatú folyamatok esetén leginkább az említett receptorok csökkent aktivitása figyelhető meg. Igen ritkán az adott daganat metasztázisainak is lehet hormonális aktivitása a különféle szövetekben (Vaage és mtsai, 1995).

Az emlődaganatok kialakulása

A daganat fejlődését nagyban segítik a hormonok, beleértve a szintetikus progeszteron hormonkészítményeket is. A progeszteron a myoepithel, és a lobuloalveoláris hyperpláziát serkenti. Az ösztrogénre a fenti tulajdonság még nincsen bizonyítva (Zilli és mtsai,

2009). A progeszteron serkenti a növekedési hormont (GH) kódoló gén expresszióját, valamint az ahhoz működésben szorosan kapcsolódó IGF-I, és IGF-II faktorok emlősejt proliferáló képességét (Mol és mtsai, 1997).

Egy igen fontos faktor az emlőtumrok kialakulásában a p53 gén, amelynek mutálódott változatát már régóta használják a humán daganatok tulajdonságainak meghatározásában. A p53 az egészséges sejtekben megtalálható szupresszor fehérje, mely gátolja a daganatos mutációk okozta daganatképződést. Egyes daganat típusok, mint amilyenek az emlődaganatok is, hordozzák a p53 gén mutációját, amely annak hibás kialakulását eredményezi. Ezeknek a hibás fehérjéknek a szupresszor hatása elmarad, azonban a sejtek citoplazmájában, esetleg magjában fokozott expresszió tapasztalható, hiszen a kimutatásuk alapját képező hapténben a mutált fehérje megegyezik az ép fehérjével. A mutált p53-as fehérjék expressziójának mértéke arányban van a daganatok malignitásának mértékével és a rövidebb túlélési idővel (Lee és mtsai, 2004). Számos kutatás folyt a kutyák daganatainak leírása érdekében is, felhasználva a p53 gént. A tanulmányok alapján 10 kutyából átlag 3-ban izolálták a gén egy mutálódott változatát. Egy vizsgálat során 69 egyed tumorának 17%-ában volt kimutatható a mutáns p53 gén (Chu és mtsai, 1998).

Egy másik jelentős fehérje a BRCA1, amely szintén a tumorszupressziós folyamatokban játszik szerepet. Mutációjának vizsgálata főleg a humán területeken jellemző, de a gén jelen van kutyákban is. Sok egyéb faktor is szerepet játszik az emlődaganatoknak a kialakulásában, úgymint az adhézión, a tight junction fehérjék működésének diszregulációja (Chang és mtsai, 2010).

A daganatos sejtekben dokumentált Cox-2 aktivitás vizsgálata alapján arra következtettek, hogy a daganat túlélése szempontjából létfontosságú folyamatokat befolyásol, úgymint angiogenezis és neovaszkularizáció, apoptózis, invazívitási és metasztatizásra való hajlam (Sheng és mtsai, 1998; Tsujii és mtsai, 1997; Sharma-Walia és mtsai, 2010). A Cox-2 enzim katalizálásával képződött eikozanoidok (például PGE₂, PGI₂) részt vesznek a daganat angiogenezisében (Madhusudan és Harris, 2002). Ezen folyamatot segítő egyéb faktorok, mint például a Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) szintén pozitívan befolyásolják a Cox-2 enzim expresszióját (Wong és mtsai, 1999). A Cox-2 intracelluláris lokalizációját vizsgálva is következtethetünk egyes fontos folyamatokban betöltött szerepére. Kutatások szerint a mitokondriumban detektálható Cox-2 aktivitásnak létfontosságú szerepe van az oxidatív stressz okozta apoptózis

szabályozásában (Liou és mtsai, 2005). A lipidtestekben lévő Cox-2 a tumor növekedésének kritikus pontjait befolyásolja (Accioly és mtsai, 2008). A citoplazmán kívül magas Cox-2 expressziót alapítottak meg a sejtmagban is, ahol a mitogenezis folyik (Morita és mtsai, 1995).

Megjelenés

A daganatos elváltozás az esetek 65%-ában a hátulsó emlőtelepeken jelentkezik, feltételezhetően azért, mert itt nagyobb mennyiségű mirigyszövet található. A jóindulatú emlődaganatok rendszerint aprók, jól körülhatárolhatóak, tapintatuk tömör. A malignus daganatok rendszerint rendkívül gyorsan nőnek, nehezen körülhatárolhatóak, szorosan kapcsolódnak a bőrhöz és a környező szövetekhez, valamint gyakran társul hozzájuk gyulladásos folyamat, fekélyesedés. A carcinomák gyakran képeznek áttétet az regionális inguinalis nyirokcsomókba, ahonnan a nyirokérhálózaton keresztül egyéb nyirokcsomókban is metasztázist képezhetnek. Az emlődaganatok áttéteket főként a tüdőbe, a májba, a vesébe és a csontokba adnak (Rutteman és mtsai, 2001.).

Osztályozás

A primer daganat kórjóslatának megítélésekor négy alap tényezőt kell figyelembe venni:

- gyors növekedés
- az invazivitás jelei (összefüggés a bőrrel vagy a pólyákkal)
- fekélyesedés
- gyulladásos carcinoma jelenléte

A betegek klinikai vizsgálata során fontos ismerni az előrehaladottság mértékét jelző, úgynevezett stádium („stage”) besorolást, amelynek ismerete a prognózist illetően létfontosságú lehet. Meghatározása a következő szempontok vizsgálata alapján történik: primer daganat (T), regionális nyirokcsomó (N), távoli áttétek (M). A WHO (World Health Organisation) 1980-ban kidolgozta a humán emlődaganatok klasszifikációját, amelyet háziállatokra is használunk. Azóta némiképp módosult a klasszifikáció, melynek jelenlegi változata a következő:

T: primer tumor

- T₁: 3 cm maximális átmérő
- T₂: 3-5 cm maximális átmérő
- T₃: 5 cm-nél nagyobb maximális átmérő

N: regionális nyirokcsomó

- N₀: szövettanilag vagy citológiai átét nem igazolható
- N₁: szövettanilag vagy citológiai igazolt átét

M: metastasis

- M₀: távoli átét nem igazolható
- M₁: igazolt átét

A fentiek alapján a TNM stádiumba sorolás a következőképpen alakul:

- **I. stádium:** T₁, N₀, M₀
- **II. stádium:** T₂, N₀, M₀
- **III. stádium:** T₃, N₀, M₀
- **IV. stádium:** bármely T, N₁, M₀
- **V. stádium:** bármely T, bármely N, M₁

A kórjóslat pontosításához elengedhetetlenek a szövettani vizsgálatok. A rutin hematoxilin-eozin festéssel számos adat deríthető fel a daganat típusával kapcsolatban, de a pontos tipizáláshoz elengedhetetlen az ún. immunfenotípus meghatározása, mely az adott szövet eredetére utal.

A kutyák emlődaganatainak típusai szövettani vizsgálatok alapján:

I. Malignus tumorok

- Nem infiltratív, in situ carcinoma
- Komplex carcinoma
- Egyszerű carcinoma: tubulopapillaris, szolid, anaplasztikus

- Speciális carcinoma típusok: orsósejtes, pikkelysejtes, mucinosus, zsírdús
- Sarcoma: fibrosarcoma, osteosarcoma, egyéb sarcomák
- Carcinosarcoma
- Carcinoma vagy sarcoma jóindulatú daganatban

II. Benignus tumorok

- Adenoma: egyszerű, komplex, basaloid
- Fibroadenoma: sejtszegény, sejtdús
- Benignus kevert daganat
- Ductalis papilloma (Misdorp és mtsai., 1976).

A prognózis meghatározása

A daganatos sejtek szaporodóképességének mértéke szintén a daganatok fontos tulajdonsága. A proliferáció mértékének ismeretében határozzuk meg a malignitás fokát („grade”), amely lényeges prognosztikai adat. A proliferáció mértékének megállapítását számos paraméter segíti, amelyek egy része a rutin szövettani vizsgálat során is vizsgálható. Ilyenek például a sejtmagok nagysága, kromatinállomány tagoltsága, sejtmagvacskák mérete, mitotikus alakok száma.

Számos immunhisztokémiai eljárással kimutatható paraméter, illetve marker ismert, amely segítséget nyújt az immunfenotípus meghatározásában, így pontosabb elemzést tesznek lehetővé. Kísérletek alapján megállapították, hogy az emlődaganatok prognózisát kutyák esetében a legjobban a Ki-67-es fehérje megjelenése (Sarli és mtsai, 2002), és a DNS-ploiditási vizsgálatok adják (Rutteman és mtsai, 2001).

A Ki-67-es fehérje egy immunhisztokémiai módszerekkel kimutatható, sejtmagban expresszáldó antigén. A fehérje akkor jelenik meg a sejtmag felületén, amikor a sejt épp osztódási ciklusban van. Ki-67 elleni jelölt ellenanyaggal mutatják ki azokat a sejteket, amelyekben expresszáldik ez a fehérje, így megállapítható a Ki-67 pozitív (jelölhető) sejtek %-os aránya a szövettani metszetekben (Kiupel és mtsai, 1999.).

Egy másik proliferációs marker a sejtek úgynevezett Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) száma, illetve AgNOR felületének nagysága. Az AgNOR módszer egy ezüstkolloidos festési eljárás, amellyel metszeteket vagy citológiai keneteket vizsgálunk (Crocker és mtsai, 1998). Egy másik kutatásban igazolták, hogy kutyák emlődaganatainak sejtmagjában az AgNOR-felület nagysága jelentősebb eltérést mutat az ép és a daganatos sejtek között, mint az AgNOR-pontok magbeli száma (Juntas és mtsai, 1995). Kutyákban a jó- és a rosszindulatú emlődaganatok között is sikerült különbséget kimutatni e tekintetben, miszerint a tumor sejtmagjainak AgNOR-felülete és AgNOR-száma között is jelentősebb különbségek vannak (Destexhe és mtsai, 1995).

A p53 gén többek között a proliferating cell nuclear antigen (PCNA) és a multidrug resistancia (MDR) gének expresszióját is igazoltan csökkenti. Egy tanulmányban megállapították, hogy a kutyák rosszindulatú emlődaganataiban a p53-as fehérjéjét kódoló gén „germ-line” régiója pontmutációt szenved, ami által a termelt fehérje inaktívvá válik, de ez a mutáns protein immunhisztokémiával kimutatható (Veldhoen és mtsai, 1999). Egy másik kutatás igazolta, hogy ennek a fehérjének a túlprodukciója szintén negatív prognosztikai faktornak minősül (Lee és mtsai, 2004).

A daganatos sejtekben dokumentált Cox-2 aktivitás vizsgálata alapján arra következtettek, hogy a daganat túlélése szempontjából létfontosságú folyamatokat befolyásol, úgymint angiogenezis és neovaszkularizáció, apoptózis, invazívítási és metasztázisra való hajlam (Sheng és mtsai, 1998; Tsujii és mtsai, 1997; Sharma-Walia és mtsai, 2010). Ezen folyamatok szabályozása révén a Ciklooxygenáz enzim aktivitása jelentősen befolyásolhatja a túlélési időt, ezáltal a prognózist. Számos kutatás vizsgálta korábban is a Cox-2 szerepét a prognózis megbecsülésében az immunhisztokémiai reaktivitás és a dokumentált túlélési idők alapján. A tapasztalatok szerint a malignus daganatokban a Cox-2 expresszió magasabb volt, mint a benignus elváltozásokban. A rosszindulatúbb daganatok esetén (Stage 3, 4), több esetben volt tapasztalható lokális invazívitás és áttét a regionális nyirokcsomókba. Ezen felül a magasabb Cox-2 szint esetén rosszabbak voltak a túlélési arányok. Azon betegek, amelyeknél a reaktivitás gyenge volt, 24 hónap elteltével magasabb recidívamentes túlélési időt (disease free survival, DFS) és teljes túlélési időt (overall survival, OS) produkáltak (Queiroga és mtsai, 2008; 2010). Ennek alapján megállapítható, hogy a Cox-2 expresszió mértéke korrelál a túlélési idővel és a prognózissal.

Kezelés, terápiás lehetőségek

A sebészi eltávolítás már sok éve használatos, és jó kezelési lehetősége az emlődaganatoknak. A műtét előtt javasolható a regionális nyirokcsomóból való mintavétel, illetve annak sebészi eltávolítása is (Ferguson, 1985). A vékonytű-aspirációs mintavétel után a kenet citológiai vizsgálata információt szolgáltat arról, hogy van-e a nyirokcsomóban áttét, és ezáltal melyik stádiumba sorolható (Gilbertson és mtsai., 1983). Sebészi úton a klinikai vizsgálat indoklása szerint eltávolítható egy emlőtelep, vagy akár az egész emlőléc is (MacEwen és mtsai, 1985).

Manapság egyre inkább teret nyernek a kemoterápiás szerek, mind kiegészítő terápiával, mind pedig önmagukban alkalmazva. A kombinációs, és multimodularitáson alapuló eredményes kezelések pontos protokollja még számos kutatás alapját képezi, azonban közismert, hogy az emlődaganatok igen rosszul reagálnak a konzervatív, nem műtéti beavatkozásokon alapuló kezelésekre (Karayannopoulou és mtsai, 2001). A konzervatív kezelések lehetőségeinek részletes tárgyalása nem témája a dolgozatunknak.

A sebészeti beavatkozást követően önmagában, vagy kemoterápiás szerrel kombinálva kezdhethetünk Nem-szteroid terápiát (NSAID) a Ciklooxygenáz (Cox) enzimek gátlása érdekében. A Cox-gátló kezelés egyértelműen hatékony voltát a kutyák hólyagcarcinómája esetén igazolták, amely piroxikám adagolására igen jól reagált. Knapp és munkatársai által 1994-ben közzétett tanulmányukban 34 hólyagcarcinómában szenvedő beteget vizsgáltak a 2 éves piroxikámterápia alatt. A 34 betegből pedig 25 egyáltalán nem kapott kemoterápiás kezelést. A betegek középtávú túlélési időket produkáltak (átlagosan 200 nap) és két páciens esetében a postmortem vizsgálat során makroszkóposan nem találtak daganatot. A kutatások alapján igazolták, hogy a piroxikámterápia nagyon jól kiegészíti a palliatív kezelést, valamint jelentősen növeli a betegek életminőségét (Knapp és mtsai, 2000; Mutsaers és mtsai, 2003). A piroxikám egy nem-specifikus Cox-1 és Cox-2 enzimgátló Nem-szteroid gyulladáscsökkentő (NSAID) gyógyszer. Az NSAID szerek legfőbb támadáspontja az arachidonsav prosztaglandin H_2 -vé (PGH_2) való alakulását katalizáló Cox-1 és Cox-2 enzimeknél van (Thun és mtsai, 2002). A legújabb kutatások a firocoxib specifikus Cox-2 antagonistá hatásával foglalkoznak, mely egyben kevésbé vesekárosító és a legkevesebb gastrointesztinális melléhatást okozó NSAID (Queiroga mtsai, 2008). A fent leírt példák indokolják a Cox-gátló kezelés továbblépésének kutatását.

A Ciklooxigenáz-2 (Cox-2) enzim

A Ciklooxigenáz-2 enzim (Cox-2), vagy más néven a prosztaglandin-endoperoxid-szintetáz-2 (PGES-2) a Myeloperoxidáz enzimek családjába tartozó Ciklooxigenáz egyik izoenzimje. Levine és mtsai 1977-ben kutyaveséből származó mintákban fokozott prosztaglandin-E₂ (PGE₂) és prosztaglandin-F₂α (PGF₂α) produkciót írtak le, mitogénekkal, tumor promóterekkel és carcinogénekkal való stimulust követően (Hassid és Levine, 1977). Fontos tényező, hogy az újonnan keletkezett prosztaglandinok protein szintézisükben és transzkripciójukban gátoltak voltak, ezáltal megjelenésüket nem katalizálhatta a Cox-1 enzim, igen kicsi aktivitása következtében. Tehát jelen kellett lennie egy másik Ciklooxigenáznak, amely segítette a prosztaglandinok képződését (Pong és mtsai, 1977; Ohichi és Levine, 1978). Hla és mtsai 1992-ben klónoztak és expresszáltak egy új Cox-gént humán sejtvonalból, amelyet Ciklooxigenáz-2 enzimnek (Cox-2) neveztek el (Hla és Neilson, 1992). A Cox-2 mérése alapján meghatározták, hogy legnagyobb aktivitása azokban a sejtekben van, amelyekben magas a gyulladásos citokinek szintje (Jones és mtsai, 1993). Ezen eredmények alapján kimutatták, hogy míg a Cox-1 homeosztatikus celluláris funkciókat lát el (Otto és Smith, 1995), addig a Cox-2 kóros folyamatokban vesz részt, úgymint gyulladás, hiperalgéria, tumorgenezis (Seibert és mtsai, 1994; Williams és mtsai, 1999).

A Cox-2 enzim szerepe az élettani és kóros folyamatokban

A Cox-2 egyes sejtekben fiziológiásan is jelen van, szabályozva az arachidonsav metabolikus transzformációját prosztaglandinokká (Otto és Smith, 1995) megfelelő stimulus hatására. A prosztaglandinok a sejtmembrán foszfolipidjeiből sérülés és a foszfolipáz-A₂ hatására felszabaduló arachidonsavból enzimatisz uton képződnek. A Ciklooxigenázok az arachidonsavból először egy labilis, rövid életidejű endoperoxidot, a prosztaglandin-G₂-t (PGG₂), majd prosztaglandin-H₂-t (PGH₂) képeznek. A PGH₂ a cytoplazmában az izomerázok hatására stabil prosztaglandinokká, prosztaglandin-E₂-vé (PGE₂), prosztaglandin-F₂-vé (PGF₂), prosztaglandin-D₂-vé (PGD₂), valamint tromboxán A₂-vé (TXA₂) és prosztaciklinné (PGI₂) alakul (Vane, 1971; Morita és mtsai, 1995). A gyulladás során keletkező prosztaglandinok fajtája nem a gyulladásos folyamatot elindító jeltől, hanem a folyamatban résztvevő sejtek típusától függ. A keletkező prosztaglandinok

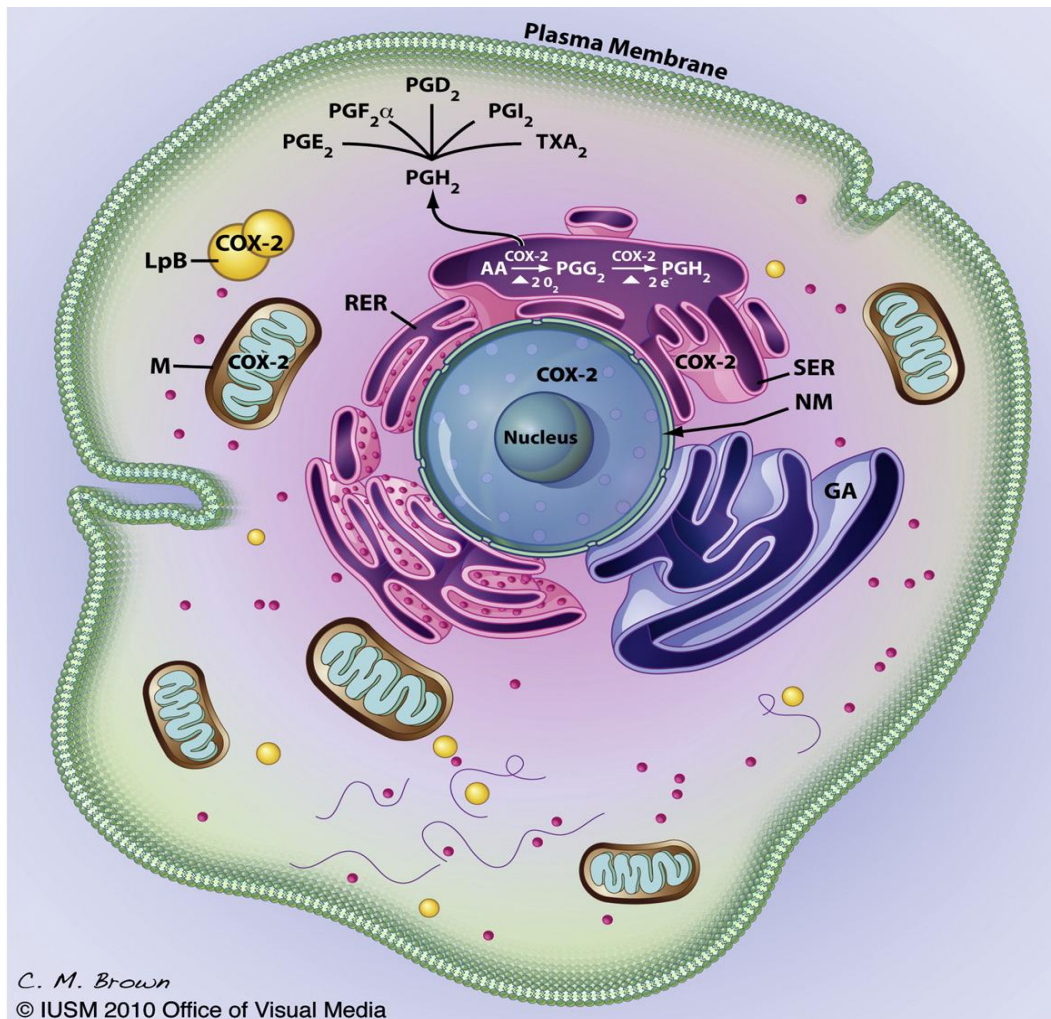
hatásukban eltérőek. Egyesek vazokonstrikciót, trombocita-aggregációt és -adhéziót, mások pedig vasorelaxációt okoznak, illetve gátolják az aggregációt és az adhéziót. Ennek a kettős hatásnak a következménye, hogy nemcsak effektor funkciót töltenek be, hanem a gyulladásos folyamatok regulációjában is lényeges szerepet játszanak (Jouzean és mtsai, 1997, Lipsky, 1999).

Normál szövetben a Cox-2 legtöbbször detektálhatatlan, de hormonális, gyulladásos, vagy neoplasztikus stimulusokra indukálódhat. Ilyen mediátorok a Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF), a basic Fibroblast Growth Factors (bFGF), valamint az oncogének és egyes specifikus intracelluláris állapotok, mint például a hypoxia (Fosslien, 2000; Tamura és mtsai, 2001). A gyulladásos mediátorok hatására a Cox-2 enzim expresszálódik, aktivitása lényegesen megnő. A stimulus megszűnése után azonban az expresszió mértéke az alapvonal alá csökken. Ezzel ellentétben a daganatokban -főleg a rosszindulatú folyamatok esetében- a Cox-2 aktivitása folyamatosan magas szinten detektálható. Ez a biológiai jel pedig kedvezőtlen klinikai végeredményt feltételez (Khuder és Mutgi, 2001; Chang és mtsai, 2004; Chan és mtsai, 2005; Salinas és mtsai, 2010).

A Cox-2 enzim szerepe a daganatos sejtekben

A Cox-2 expresszió vizsgálatát napjainkban már használják humán daganatok esetében (Costa és mtsai, 2002; Edwards és mtsai, 2002; Giles és mtsai, 2002; Kim és mtsai, 2002). A Cox-2 vizsgálatát, mint kemopreventív faktort alkalmazzák, mivel az enzim expressziójának mértéke bizonyítottan korrelál a prognózissal emberek esetében (Davies és mtsai, 2002; Dang és mtsai, 2002). Kutyák daganatainak vizsgálata során is azonosították a Cox-2 magas szintű expresszióját, ideértve az intestinális carcinomát (McEntee és mtsai, 2002), az átmeneti sejtes carcinomát (TCC) (Mohammed és mtsai, 1999), saquamosus sejtes carcinomát (SCC) (Pestili és mtsai, 2001), a vese carcinomát (Khan és mtsai, 2001), valamint az emlőcarcinomát (Dore és mtsai, 2003). A Cox-2 enzim legmagasabb intracelluláris aktivitása az endoplazmatikus reticulumban mérhető, mivel a gyulladásos folyamatokban fontos szerepet játszó prosztaglandinok (PGG_2 , PGH_2) itt képződnek. Azután a citoplazmában a PGH_2 -ből PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, prosztaciklin (PGI_2) és tromboxán-A₂ (TXA_2) keletkezik (Morita és mtsai, 1995) (1. Ábra).

1.Ábra: Cox-2 enzim expressziója és intracelluláris funkciói (NM-nukleusz membrán, GA-Golgi-apparátus, SER-simafelületű endoplazmatikus retikulum, RER-recés endoplazmatikus retikulum, M-mitokondrium, LpB-lipid test; AA-arachnoidsav, PGG₂, PGH₂, PGE₂, PGD₂, PGF₂α-prosztaglandinok, PGI₂-prosztaciklin, TXA₂-tromboxán) (Morita és mtsai, 1995)



A normál sejtekkel ellentétben a daganatok, ezen belül is legfőképp a malignus elváltozások esetén a Cox-2 aktivitása folyamatosan magas szinten detektálható (Khuder és Mutgi, 2001; Chang és mtsai, 2004; Chan és mtsai, 2005; Salinas és mtsai, 2010). Kutatások alapján a daganatos sejtek citoplazmájában az endoplazmatikus retikulumon kívül a Cox-2 jelen van a mitokondriumokban, és a lipidtestekben. A mitokondrium a sejt szintű védelem felállításának a színtere. A vizsgálatok szerint a mitokondriumban detektálható Cox-2 aktivitásnak létfontosságú szerepe van az oxidatív stressz okozta apoptózis szabályozásában (Liou és mtsai, 2005). A lipidtestekben lévő Cox-2 a tumor növekedésének kritikus pontjait befolyásolja (Accioly és mtsai, 2008). A citoplazmán kívül magas Cox-2 expressziót alapítottak meg a sejtmagban is, ahol a mitogenezis folyik (Morita és mtsai, 1995) (1.Ábra).

Anyag és Módszer

A vizsgálatban szereplő állatok

Tanulmányunk során 31 különböző korú és fajtájú kutyából származó daganatmintát vizsgáltunk. A betegeket dr. Michalik László és dr. Thuróczy Julianna egyetemi docens, klinikavezető műtötték. A műtétek során minden egyes daganatból rutin szövettani mintát vettünk. A szövettani eredmények alapján az alábbi típusú daganatokat vizsgáltuk: az emlődaganatok közül 4 benignus daganatból származott; komplex adenoma (n=2), simplex adenoma (n=1) és fibroma (n=1), 22 minta pedig malignus elváltozásból. A 22 rosszindulatú daganat között carcinoma simplex és in situ carcinoma (n=8), tubulopapillaris carcinoma (n=4), carcinoma complex (n=5), adenocarcinoma (n=2) és egyéb emlőtájéki daganatok (n=3, carcinosarcoma, fibrosarcoma, mastocytoma) fordultak elő. A fent felsoroltakon kívül 5 minta lymphomás kutyák nyirokcsomójából származott, melyeket összehasonlítási alapként használtunk fel. A vizsgált páciensek közül a carcinoma simplex típusú daganatban szenvedők közül két esetben volt áttétképződés (metasztázis), a tubulopapillaris daganatos betegeknél egy esetben, a többi esetben nem figyeltünk meg áttétképződést.

Az emlődaganatos betegek életkora; 3 éves (n=1), 5 éves (n=4), 7 éves (n=2), 8 éves (n=6), 10 éves (n=3), 11 éves (n=1), 12 éves (n=4), 13 éves (n=3), 14 éves (n=1) és 15 éves (n=1). A kutyák életkora átlagosan 9 év volt. A pácienseket fajtájuk alapján csoportosítva a vizsgált egyedek között az alábbiak fordultak elő; cocker spániel (n=4), óriás schnautzer (n=2), tascsó (n=3), német juhász (n=1), uszkár (n=2), kerry blue terrier (n=1), málatai selyemkutya (n=1), csivava (n=1), berni pásztor (n=1), puli (n=1), magyar vizsla (n=1), belga juhász (n=1), skót juhász (n=1), ír szetter (n=1), rottweiler (n=1), valamint keverék kutya (n=4).

A Cox-gátló Non-szeroidok (NSAID) egyértelműen hatékony volta a kutyák hólyagcarcinomájának kezelésében már bizonyítást nyert. Egyes kutatások szerint a nem-specifikus Cox-1 és Cox-2 gátló piroxikám adásával jelentősen meg tudták nyújtani a recidívamentes túlélési időt (disease free survival, DFS) és teljes túlélési időt (overall survival, OS) (Chun és mtsai, 1997; Knapp és mtsai, 2000; Mutsaers és mtsai, 2003). Az emlődaganatokban detektált magas Cox-2 expresszió arra enged következtetni, hogy a daganat terápiájában fontos szerepe lehet a Cox-gátló gyulladáscsökkentőknek (Knapp és

mtsai, 1994; Schmidt és mtsai, 2001; Davies és mtsai, 2002; Thun és mtsai, 2002). Tanulmányunk során ezen megállapításokra támaszkodva alkalmaztunk per os piroxicámot (Feldene kapszula, 10 mg) betegeink terápiájában (n=6).

A metszetek készítése

Az immunhisztokémiai vizsgálathoz paraffinba ágyazott metszeteket használtunk. A műtétilag eltávolított daganatok mintáit 4%-os neutrális formalin oldatban kerültek fixálásra, majd ezután történt a paraffinba való beágyazás. A metszetek elkészítése során készen vásárolt xilanizált tárgylemezt használtunk. Az elkészült paraffinos metszeteket 12 órán át 56 °C-os termosztátban tároltuk. Ezen eljárásoknak köszönhető, hogy később a feltárás során alkalmazott hő hatására a metszetek nem váltak le a tárgylemezről, illetőleg szobahőmérsékleten korlátlan ideig tárolhatók voltak. A minták feldolgozása eddig a fázisig az Országos Állategészségügyi Intézet Emlőskórbonctani Osztályának Szövetani Laboratóriumában történt.

A Cox-2 expresszió kimutatásának immunhisztokémiai módszere

A Cox-2 expresszió immunhisztokémiai kimutatását Queiroga és munkatársai 2007-ben megjelent cikke, és az Országos Onkológiai Intézet munkatársainak ajánlása alapján végeztük az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ (ÁHOK) laboratóriumában kisebb módszertani módosításokkal.

A minták deparaffinálását xilol segítségével végeztük. A paraffin oldását követően leszálló alkoholsorral rehidráltuk a metszeteket. A 2x20 perces xilollal (Reanal Kft.) való kezelést 2x5 perc abszolút-alkoholban, majd 2x5 perc 96%-os alkoholban (Reanal Kft.) történő áztatás követte. Ezután a metszeteket desztillált vízzel öblítettük. Az endogén peroxidázokat (például a vörösvérsejtekben található pszeudoperoxidázok) 3%-os hidrogén-peroxid oldattal blokkoltuk 10 percig. A rendelkezésünkre álló 30%-os hidrogén-peroxidot (Reanal Kft.) desztillált vízzel hígítottuk fel a kívánt koncentrációra. Ezután a metszetek PBS-es (foszfát pufferes) öblítése következett. A PBS-t a SZIE-ÁOTK Belgyógyászati Tanszék és Klinika laboratóriumának munkatársai készítették számunkra a következő recept alapján: 10 liter desztillált vízben 80g nátrium-kloridot (NaCl, Reanal 1000g), 29g dinátrium-hidrogénfoszfát-12-hidrátot (Na_2HPO_4 , Reanal

1000g), 2g kálium-kloridot (KCl, Reanal 1000g), valamint 2g kálium-dihidrogénfoszfátot (KH_2PO_4 , Reanal 1000g) oldottak fel. Ezt követően az oldat kémhatását pH 8-ra állították be 1 mólos NaOH, illetve 1 mólos HCl oldat hozzáadásával.

Az antigéneket 90 °C-ra előmelegített, lúgos kémhatású, PBS-sel 1:3 arányban hígított Retrieve All 1. oldatban (Signet Laboratories) 10 percig tártuk fel. Erre a lépésre azért volt szükség, mert a formaldehid alapú szöveti rögzítés során a fehérjék természetes konformációját többnyire irreverzibilisen megváltoztató keresztkötések létesülnek. Ennek révén az antigén determinánsok (epitópok) az antitestek számára hozzáférhetetlenné válhatnak. Az antigén (epitóp)-feltárás célja, hogy az antigén determinánsokat felszabadítsuk, a számunkra fontos epitópokat hozzáférhetővé tegyük úgy, hogy közben a szöveti finomszerkezet nem sérüljön lényegesen.

A feltárás után desztillált vizes öblítés, majd 5 perc PBS-ben történő áztatás következett. A nem immuneredetű kötődéseket PBS-sel 1:10 arányban hígított 4%-os normál lószérumban (Vector Laboratories) való 20 perces inkubációval blokkoltuk. Nemspecifikus kapcsolatok forrása lehet többek között a pozitív töltésű szöveti molekulák (például kollagén, magfehérjék, elasztin) és a reagens negatív csoportjai között kialakuló elektromos vonzóerő, mivel a legtöbb IgG izoelektromos pontja enyhén savas közegben van, így neutralis vagy lúgos pH-n enyhén negatívak. Hasonló problémát okozhat még a szöveti aldehidcsoportok és az immunglobulinok között, illetve a szövet és az immunglobulinok hidrofób csoportjai között kialakuló kapcsolat (a formaldehydes rögzítés ugyanis hidrofóbbá teszi a szövetet). Ezen folyamatok miatt kell a metszet nemspecifikus kötőhelyeit nagy koncentrációjú indifferens fehérjeoldattal (esetünkben lószérummal) telíteni még az immunreagens alkalmazása előtt.

A lószérummal való inkubáció után 2x5 perc PBS-ben való áztatás következett. A PBS-t követően a mintákat monoklonális primer IgG1 (Rat Cox-2 aa. 368-604) ellenanyaggal inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át. A monoklonális ellenanyag jellemzője, hogy egyetlen antigén determináns szekvenciához, vagy konformációhoz kötődik. A monoklonális ellenanyagokat antigén-aktivált B-sejtek és myeloma sejtek fúziójából kialakuló monoklonális hibridoma sejtvonalak segítségével termelik. Ezen primer ellenanyagok legtöbbször egér sejtekből származnak, de ismeretesek patkány, illetve újabban nyúl monoklonális antitestek is. A mintákat PBS-sel 1:100, illetve 1:40 arányban hígított primer ellenanyaggal inkubáltuk nedves kamrában, annak érdekében, hogy elkerüljük a beszáradást.

A következő nap reggelén a mintákat kivettük a hűtőből és a nedves kamrából. A primer ellenanyag eltávolítását követően 2x10 perc PBS-es öblítés következett, majd 45 percig inkubáltuk a metszeteket ló anti-egér biotinilált ellenanyaggal, amelyet a Vectastain Elite ABC kit-ben lévő (Vector Laboratories) alapanyagokból, a gyártó utasítása alapján készítettünk el. Az elkészítés pontos menete a következő volt: 3 csepp, kitből származó normál lószérumot 10 ml PBS-ben oldottunk fel, majd ehhez 1 csepp kitben található biotinilált ellenanyagot cseppentettünk. A biotinilált ellenanyaggal való kezelés célja a primer antitest kötődésének kimutatása. Ez az eljárás egy indirekt immunreakció, mivel a primer ellenanyag kötődését biotinnel konjugált második antitesten keresztül mutatjuk ki.

A 45 perces inkubációt 2x5 perces PBS-es öblítés követte, majd 60 percig inkubáltuk a mintákat a gyártó utasítása alapján előkészített ABC-oldatban. Az ABC-reagenst 30 perccel a felhasználás előtt készítettük el a következő módon: a kitből származó 2 csepp „A” reagenst 5 ml PBS-ben oldottuk fel, majd az így készült keverékhez 2 csepp „B” jelzésű reagenst cseppentettünk. Az S-ABC (streptavidin-biotin-peroxidáz komplex) módszer lényege röviden a következő: alapja az avidin-biotin kötés nagy affinitása és stabilitása. A *Streptomyces avidinii* tenyészetből izolálható 60 kDa-os streptavidin 4 biotin molekulát is képes megkötni. Lényeges előnye a hasonló tulajdonságú avidinnel szemben, hogy izoelektromos pontja a neutrális tartományba esik, és nem tartalmaz oligoszacharid oldalláncokat, amelyek nonspecifikusan a szöveti lektinekhez kötődhetnek. Az ABC-kitben a reakció láthatóvá tételében kulcsfontosságú szerepet játszó peroxidáz a streptavidinhez kovalens kötéssel volt kapcsolva.

A metszetek 2x5 perces PBS-es öblítése után a mintákat a közvetlenül felhasználás előtt, a gyártó utasítása alapján elkészített diamino-benzidin (DAB, Vector Laboratories) oldatban inkubáltuk 2 percig. A DAB elkészítésének pontos menete a következő volt: 5 ml desztillált vízhez 2 csepp, a kitben található Buffer Stock Solution-t tettünk, alapos rázás után a keverékhez 4 csepp DAB Stock Solution-t adtunk, összeráztuk, hozzáadtunk 2 csepp H_2O_2 oldatot, majd a kész keveréket összeráztuk. A reakció láthatóvá tételének rövid elméleti háttere a következő: az elbontott szubsztrát (H_2O_2) oxidálja az elektrondonor kromogént (DAB), amelyből rosszul oldódó sötétbarna színű polimerizált csapadék válik ki.

Az utolsó lépések az alábbiak voltak: kétszer egymást követően öblítés desztillált vízzel, festés haematoxin oldattal (2 percig), majd csapvízben kékítés (2 percig). A metszetek száradását követően folyékony halmazállapotúra melegített glicerinzselatint

tartalmazó oldattal (DPX mountant BDH Laboratory Supplies) fedtük le a mintáinkat (Queiroga és mtsai, 2010).

Az immunhisztokémiai reakciók végrehajtásának feltétele a megfelelő pozitív és negatív kontroll beiktatása. A pozitív kontroll a specifikus ellenanyagkötődés megtörténtét hivatott bizonyítani. A mi pozitív kontrollunk az irodalomban javasolt kontrollal megegyezően egészséges kutya máj és vese minták voltak (Queiroga és mtsai, 2007).

Értékelés

A mintákat fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk és értékeltük. A Cox-2 enzim expresszióját Queiroga és munkatársai által 2007-ben leírt tanulmánya alapján bíráltuk el.

Az értékelést fénymikroszkópos vizsgálattal végeztük 100-400x-os, esetenként 1000x-es nagyítással trinokuláris mikroszkóppal (Nikon Eclipse 400). Metszetenként minimum 300-500 sejtet számoltunk meg, és feljegyeztük a pozitív festődést mutató sejtek %-os arányát. A vizsgálat „double-blind” módszerrel történt két gyakorlott vizsgáló segítségével.

Queiroga és munkatársai által használt bírálati rendszert a mi igényeinkhez alakítva vizsgáltuk a mintákat. A pozitivitást a citoplazmában, esetleg a magban feltűnő barna szín jelezte. A felhasznált tanulmányban a kapott eredményekből a kutatók felállították az immunreaktív sejtek besorolhatósági rendszerét („grade”), amely a következőképpen került megalkotásra: (grade 0); 0-10% (grade 1); 11-50% (grade 2); 51-80% (grade 3); 81-100% (grade 4). Ezen felül a festődés intenzitása szerint is csoportosították a mintáikat: negatív (0); gyenge (+); közepes (++); erős (+++). Ettől a rendszerezéstől eltérően a mi vizsgálatainkban csak a %-os megoszlást elemeztük, mert a „grade” meghatározása nem bizonyult sokkal specifikusabb vizsgálatnak. A festődés intenzitását feljegyeztük, de nem jelentett több információt, hiszen általában azok a sejtek mutattak erősebb intenzitást, amelyek közül a pozitív festődést mutató sejtek %-os aránya is nagyobb volt.

A felhasznált irodalom szerint a normál emlő szövetében is látható a Cox-2 expressziót jelölő barna szín multifokálisan az epitheliális sejtek citoplazmájában gyenge intenzitással. Ez a megfigyelés megfelel annak az állításnak, hogy alig detektálható mennyiségben ugyan, de egészséges emlőszövetben is van Cox-2 enzim (Howe és mtsai, 2001). A mi mintáink között nem szerepelt normális emlőből származó szövettani minta,

azonban a benignus, és a rosszindulatú elváltozások vizsgálata során tapasztalt színváltozások alátámasztották a felhasznált tanulmány adatait. A benignus daganatminták vizsgálatakor az epithelsejtek citoplazmájában heterogén mintázatú Cox-2 expressziót lehetett tapasztalni kis mértékben, de viszonylag erős intenzitással.

A malignus emlődaganatokból vett mintákban a Cox-2 immunreaktivitása jóval intenzívebb volt, mint a benignus daganatmintákban. Azon kívül, a rosszindulatú elváltozások között is markánsabb expresszió volt tapasztalható a lumeneket bélelő sejtekben. Különbségek felfedezhetőek az egyes szövettani típusok között is. Carcinoma simplex és in situ carcinomák esetében a Cox-2 magas citoplazmatikus granuláris expressziót mutatott. Ezzel szemben az emlőkörüli daganatok csoportjába sorolt carcinosarcomából származó minta nukleáris homogén immunreaktivitása volt látható. Általánosan a rosszindulatú daganatok nagy részében a Cox-2 expresszió legintenzívebben a citoplazmában perinucleárisan granulárisan detektálható.

Statisztikai vizsgálatok

A minták értékelését követően és az eredmények feldolgozása érdekében a pácienseket több csoportra osztottuk a kórszövettani vizsgálatok eredményei alapján; jóindulatú daganatok (n=4), carcinoma simplex és in situ carcinoma (n=8), tubulopapilláris carcinoma (n=4), carcinoma komplex (n=5), adenocarcinoma (n=2), egyéb emlőtájéki rosszindulatú daganat (n=3), lymphoma (n=5).

A csoportok között számos paramétert vizsgáltunk:

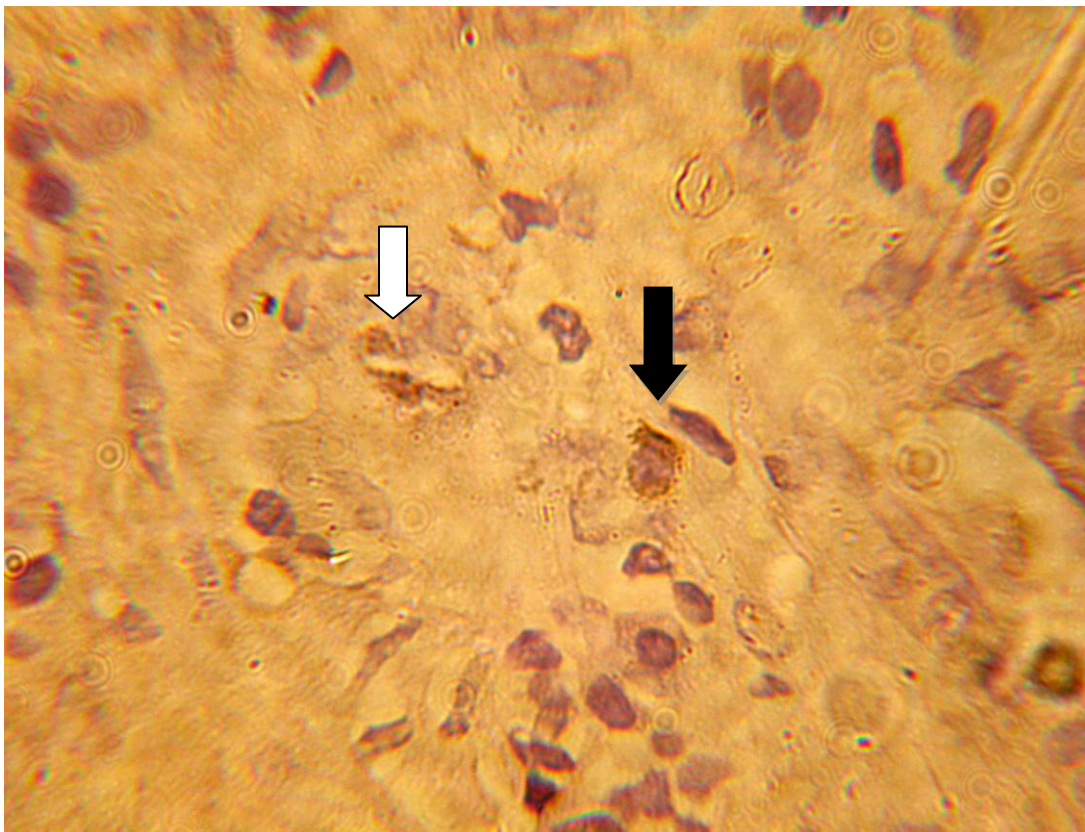
- A betegek életkorát a műtét idején
- Volt-e áttét (metasztázis) a vizsgálat ideje alatt
- Recidíva előfordulása a vizsgálat ideje alatt
- A daganat mérete
- Az előrehaladottság mértékét jelző, úgynevezett stádium („stage”) besorolást (1-4-ig)
- Az emlődaganat kialakulását megelőzően ivartalanított volt-e a kutya
- Hány esetben történt elhullás a megfigyelt időszak alatt
- Ahol elhullás történt, ott a túlélési időt hónapokban

A különböző paraméterek különbségét Wilcoxon rank-sum tesztel és kétmintás, nem egyenlő varianciájú Student-féle t-próbával vizsgáltuk a különböző diagnózisú csoportok között SAS-STAT számítógép software-rel. A paraméterek között Pearson-féle korrelációs analízist is végeztünk az SPSS 8.0 számítógépes program segítségével.

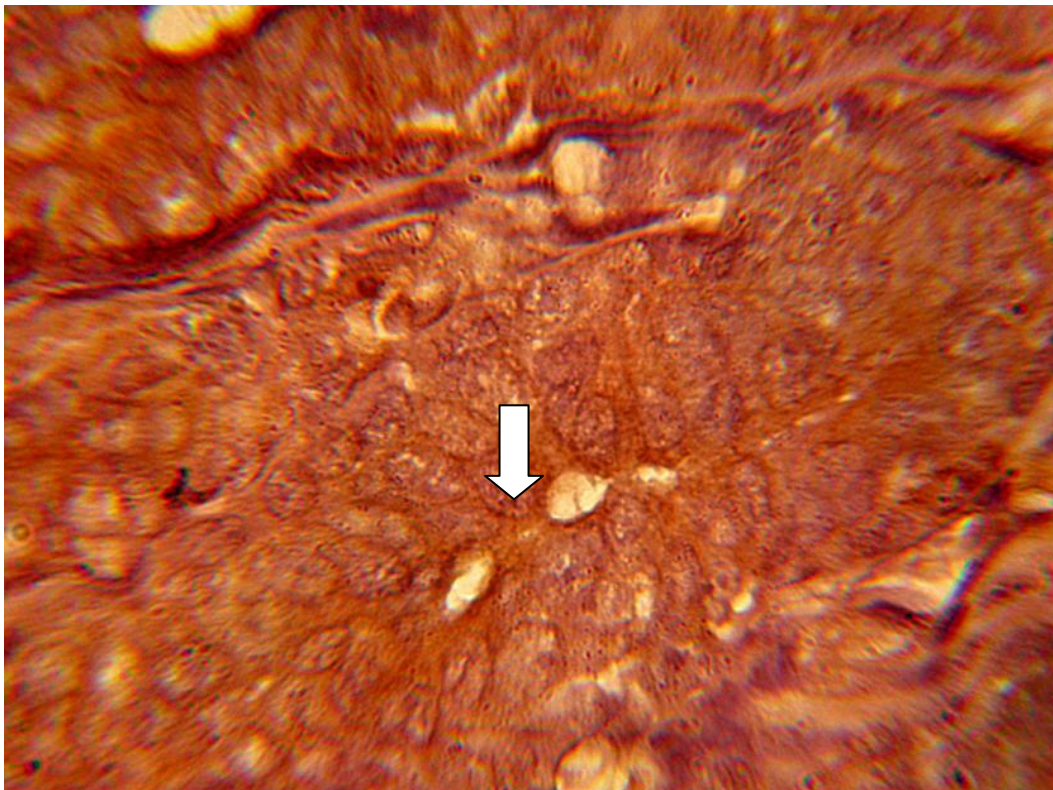
Eredmények

A fénymikroszkópos vizsgálat során megállapítottuk, hogy a Cox-2-expresszió az epithelsejtek citoplazmájában kifejezett a felhasznált irodalomnak megfelelően. Ezen felül a malignus daganatokban erősebb Cox-2-reaktivitást tapasztaltunk, mint a benignus daganatok esetében. A két csoport között különbségek tapasztalhatóak az intracelluláris lokalizációt illetően is. A benignus daganatokból vett mintákban főként az epithelsejtek citoplazmájában gyenge heterogén mintázatú Cox-2 expressziót lehetett tapasztalni (2. Ábra). A rosszindulatú daganatokból vett mintában közepes, illetve erős reaktivitást lehetett látni, mely leginkább perinukleárisan helyezkedett (2. Ábra) homogén, vagy granuláris mintázattal. Vizsgálatunk során metszetenként minimum 300-500 sejtet számoltunk meg, és feljegyeztük a pozitív festődést mutató sejtek %-os arányát (3. Táblázat). A vizsgálat „double-blind” módszerrel történt két gyakorlott vizsgáló segítségével.

2. Ábra: Complex adenoma. A kép közepén (fehér nyíl) látható sejt citoplazmájában látható a gyenge, heterogén Cox-2 expresszió. Erős expresszió látható a macrophagesejtben (fekete nyíl)

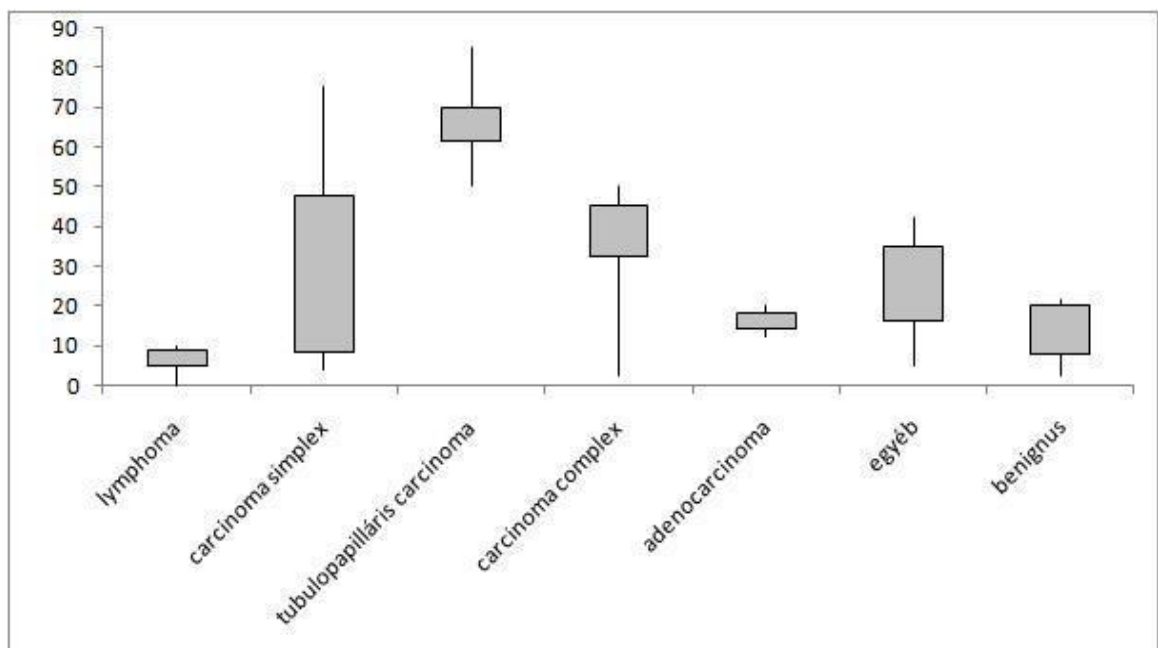


3. Ábra: Simplex carcinoma. A daganatsejtek erős diffúz Cox-2 expressziót mutatnak (fehér nyíl) .



Az alkalmazott statisztikai vizsgálatok során elsőként az egyes daganattípusokat csoportokba rendeztük, és az egyes csoportok Cox-2 expresszió értékeit hasonlítottuk össze (4. Ábra, 3. Táblázat).

4. Ábra: A cox-2 expresszió átlageredményeinek összehasonlítása a különböző daganattípusok között.



Student-féle t-próbával a különbség szignifikánsnak bizonyult a lymphoma és a carcinoma simplex, a carcinoma complex, valamint a tubulopapilláris és az adenocarcinoma között. A carcinoma simplex szignifikáns különbséget mutatott a tubulopapilláris carcinomával, valamint az adenomával. A tubulopapilláris carcinoma és az adenoma közötti kapcsolat kifejezetten szignifikáns, de a tubulopapilláris carcinoma különbséget mutat még a carcinoma complexel és az adenocarcinomával. Az adenoma a fent leírtakon kívül a carcinoma complexel is szignifikáns különbséget mutat (3. Táblázat).

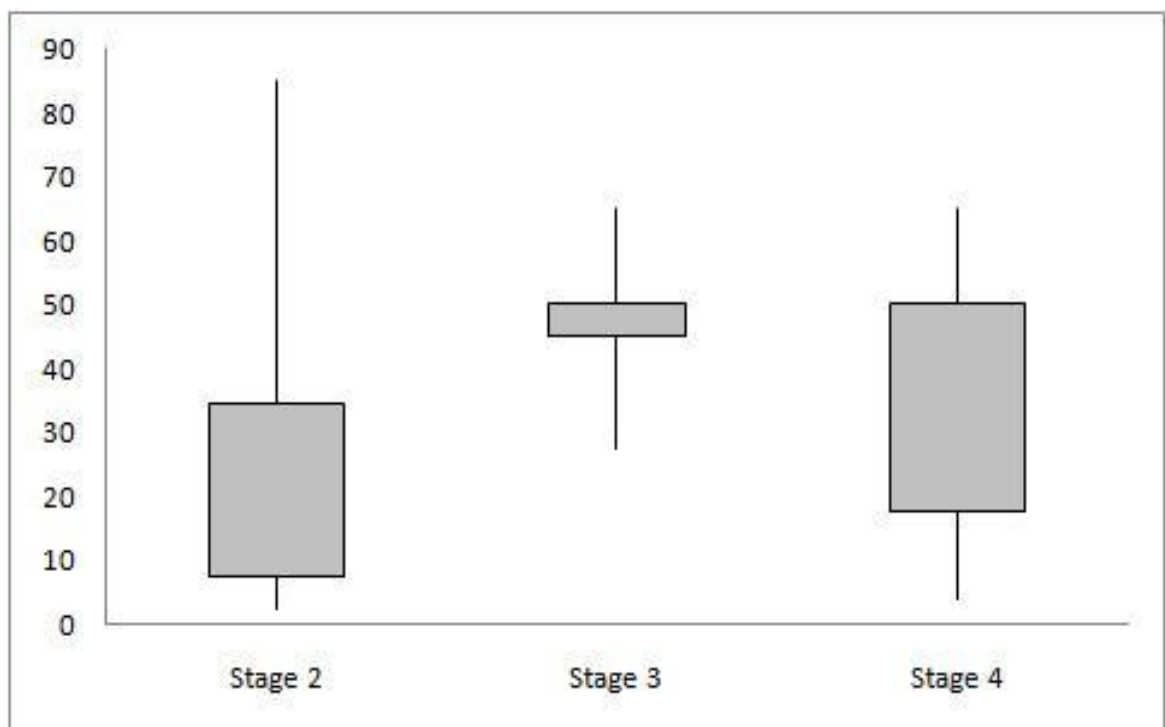
3. Táblázat: A Cox-2 expresszió mértéke az egyes daganattípusok között vizsgálva

Daganat típusok	Cox-2 (%)
Adenoma (n=4)	
átlag	13,50
Szórás	±8,93
Carcinoma simplex (n=8)	
átlag	32,25
Szórás	±25,94
Tubulopapilláris carcinoma (n=4)	
átlag	66,25
Szórás	±14,36
Carcinoma complex (n=5)	
átlag	33,30
Szórás	±18,54
Adenocarcinoma (n=2)	
átlag	16,25
Szórás	±5,3
Emlő körüli daganat (n=3)	
átlag	25,00
Szórás	±18,87
Lymphoma (n=5)	
átlag	6,30
Szórás	±3,99

Szignifikáns, ill. közel szignifikáns különbségek	P-értékek
lymphoma: carcinoma simplex	0,02552381
lymphoma: tubulopapillaris carcinoma	0,00252406
lymphoma: adenocarcinoma	0,07364469
lymphoma: carcinoma complex	0,02952902
carcinoma simplex: tubulopapillaris carcinoma	0,01580186
carcinoma simplex: adenoma	0,09761324
tubulopapillaris carcinoma: adenoma	0,00152872
tubulopapillaris carcinoma: carcinoma complex	0,01983486
tubulopapillaris carcinoma: adenocarcinoma	0,00357829
adenoma: carcinoma complex	0,08035274

A betegek daganatait stádiumok („Stage”) szerint is csoportokba rendeztük. Minthogy Stage 1 esetünk csak 1 volt, így csak a Stage 2, Stage 3 és Stage 4 csoportokat hasonlítottuk össze a Cox-2 expresszió (5. Ábra) %-os megoszlása szerint és a malignitás és az elhullások figyelembe vételével (4. Táblázat).

5. Ábra: A Cox-2 expresszió átlageredményeinek összehasonlítása az egyes stádiumok („Stage”) között



4. Táblázat: A stádiumok („Stage”) összehasonlítása a Cox-2 expresszióval, a malignus daganatok számának figyelembe vételével, valamint az elhullási adatokkal

Stage	Cox-2	Malignus daganatok száma	elhullott
2 (n=15)			
átlag szórás	22,10 ±22,70	0,71 ±0,46	0,07 ±0,26
3 (n=7)			
átlag szórás	47,14 ±11,12	1 0	0,14 ±0,37
4 (n=4)			
átlag szórás	34,12 ±26,54	1 0	0,75 ±0,50

A Student-féle t-próbával szignifikáns különbség látszik a Stage 2 és Stage 3 között a malignitás, valamint az átlagos Cox-2 expresszió tekintetében. A Stage 2 és Stage 3 között pedig úgyszintén fennáll a szignifikáns kapcsolat a malignus daganatok számában, illetve az elhullás tekintetében (5. Táblázat). Ez alapján igazolható, hogy a Stage 3, és 4 kategóriába sorolt betegek közül több volt az elhullás és a Cox-2 expresszió is.

5. Táblázat: Szignifikáns különbségek az egyes stádium („Stage”) csoportok között a Cox-2 expresszió, a malignitás és az elhullások tekintetében

Szignifikáns, ill. közel szignifikáns különbségek	Cox-2 átlag	Malignus daganatok száma	elhullás
Stage 2: Stage 3	P=0,003065167	P=0,04009291	
Stage 2: Stage 4		P=0,04009291	P=0,067954

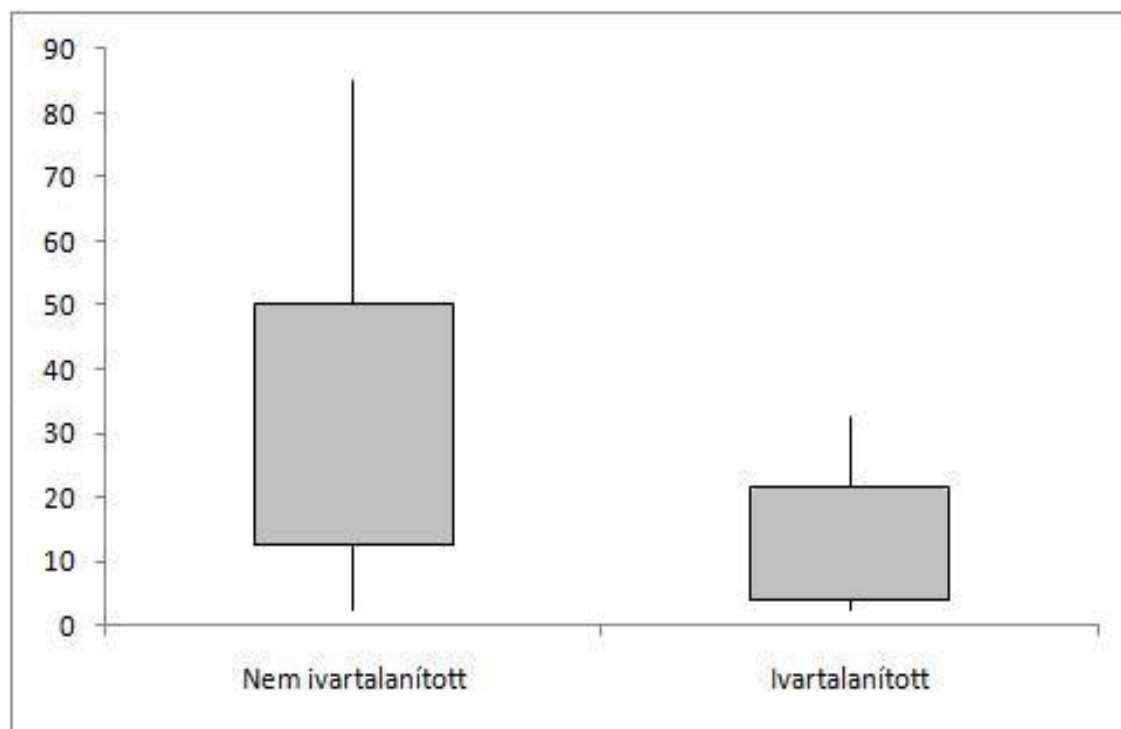
Tanulmányunk során dokumentáltuk az egyes daganatok méretét is. Érdekes megfigyelés, hogy a kisebb méretű daganattal rendelkező betegek jelentősen tovább éltek (Túlélési idő: átlag 26 hónap), míg a nagyobb méretű elváltozással rendelkező páciensek túlélési ideje jóval rövidebbnek bizonyult (átlag 4,6 hónap). A méret tekintetében a Pearson-féle korrelációs vizsgálattal pozitív korrelációt tapasztaltunk a Cox-2 expresszióval, a daganat típusával, valamint az életkorral és az ivartalanítással is (6. Táblázat).

6. Táblázat: A méret összehasonlítása a különböző paraméterekkel Pearson-féle korrelációs vizsgálattal.

Összehasonlított paraméterek	Korrelációs együttható	Szignifikancia
Méret: Cox-2 (%)	$r=0,617$	$P<0,01$
Méret: életkor	$r=0,754$	$P<0,01$
Méret: ivartalanított	$r=0,615$	$P<0,01$

Az ivartalanítás tekintetében a nem ivartalanítottakban magasabb volt az Cox-2 átlagos expressziója, mint a 2 éven belül ivartalanított betegek esetében. A két csoport között Student-féle t-próbával szignifikáns különbséget fedeztünk fel (6. Ábra, 7. Táblázat).

6. Ábra: A Cox-2 expresszió átlageredményeinek összehasonlítása az ivartalanított és a nem ivartalanított betegek esetében



7. Táblázat: Az ivartalanítás összehasonlítása a Cox-2 expresszióval

Ivartalanítás	Cox-2 expresszió (%)
nem ivartalanítottak	
átlag szórás	36,69 ±24,52
ivartalanítás 2 éven belül	
átlag szórás	16,1 ±12,69
Szignifikáns különbségek	Cox-2 átlag
ivartalanított: nem ivartalanított	P=0,02121034

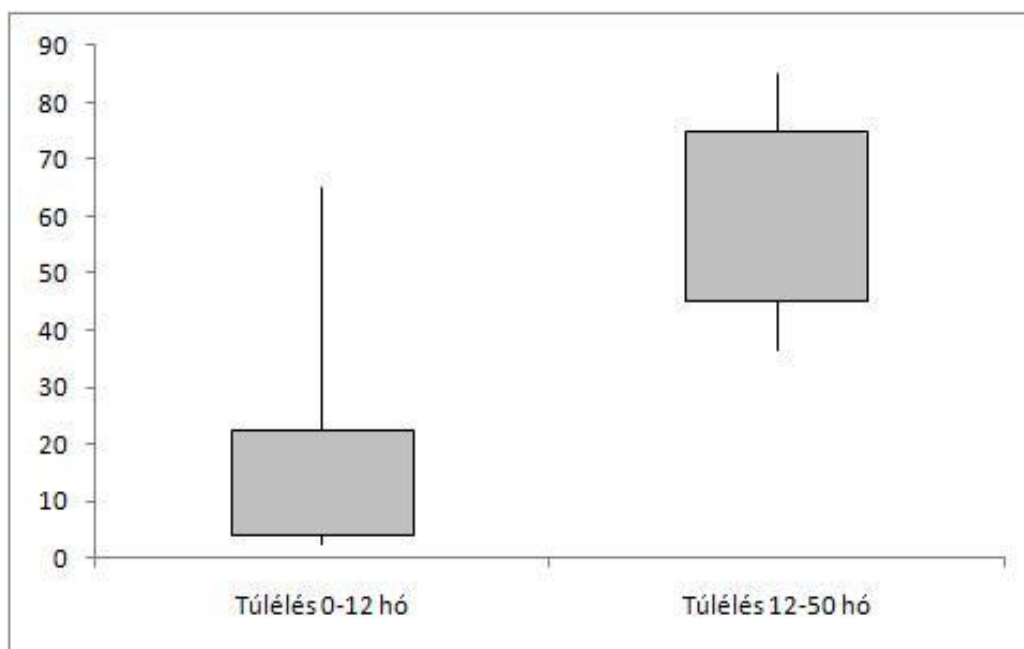
A metasztázisok megjelenését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy azokban a betegekben, ahol a Cox-2 expresszió 20% alatt volt (n=8), ott csupán 1 esetben jelentkezett áttétképződés. Ezzel szemben azoknál a betegeknek, amelyek daganatában a Cox-2 expresszió 20% felett volt (n=15), ott 3 esetben tapasztaltunk metasztázist. A χ^2 -próbával szignifikáns különbség nem adódott (p= 0,785), mégis a Pearson-féle korrelációs vizsgálat alapján azt tapasztaltuk, hogy a metasztázis jelenléte erősen korrelál az elhullások számával és a stádiummal. Ebből következik, hogy a stádium és az elhullások száma között is korreláció van. A metasztázis megjelenésén kívül vizsgáltuk recidíva megjelenését is (n=2), amely alapján szoros korreláció fedezhető fel a recidíva megjelenése és a Cox-2 expresszió között (8. Táblázat).

8. Táblázat: Különböző paraméterek összehasonlítása Pearson-féle korrelációs vizsgálattal

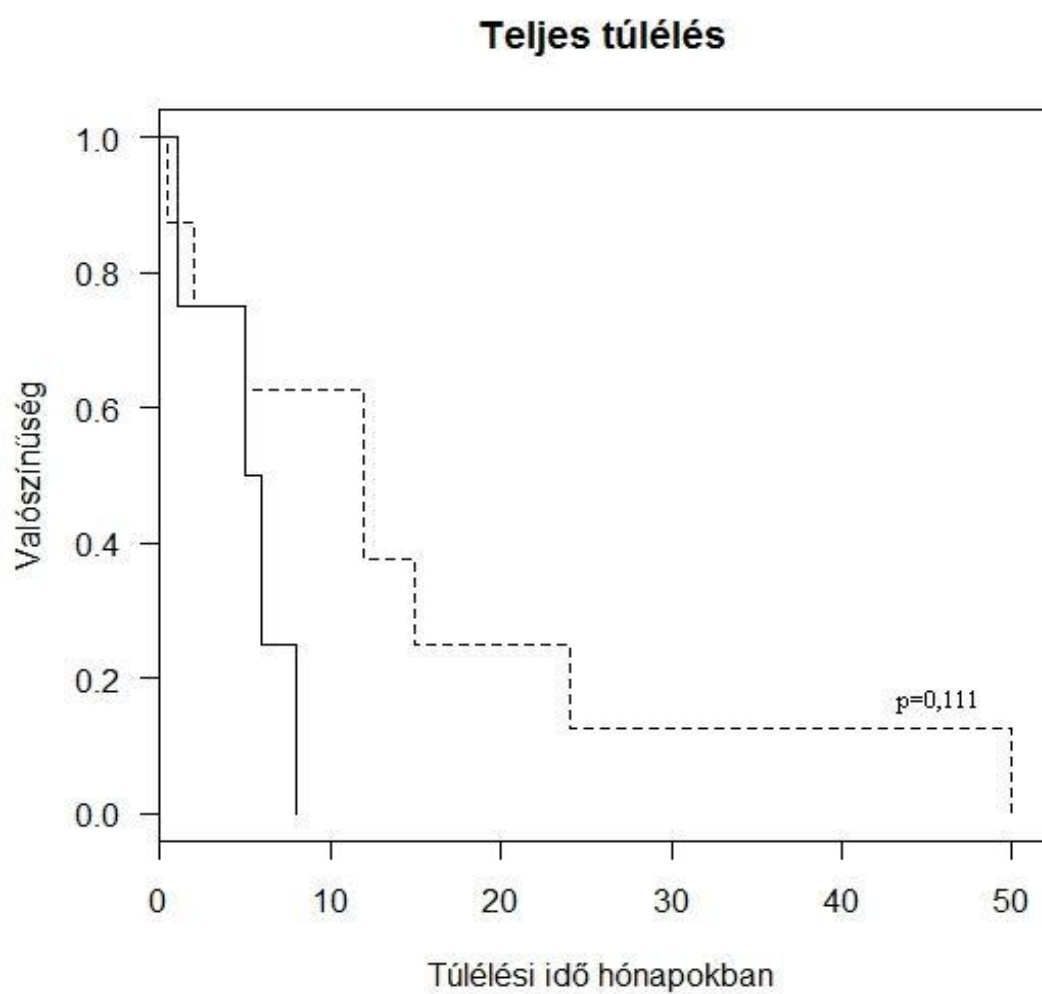
Összehasonlított paraméterek	Korrelációs együttható	Szignifikancia
Metasztázis: elhullás	r=0,778	p<0,01
Metasztázis: Stage	r=0,432	p<0,01
Stage: elhullás	r=0,432	p<0,01
Recidíva: Cox-2 (%)	r=0,427	p<0,01

A vizsgálatainkban szereplő kutyákról számon tartottunk az elhullott betegek teljes túlélési idejét (n=10). A tanulmányozott irodalomban leírtakkal ellentétben azt tapasztaltuk, hogy a túlélési idő egyenesen aránylik a Cox-2 expresszió mértékével (7. Ábra, 8. Ábra.).

7. Ábra: Túlélési adatok a Cox-2 expresszióhoz (%) viszonyítva



8. Ábra: A Cox-2 immunexpresszió és a teljes túlélési idő közötti kapcsolat



Következtetések

Az eredmények egyeztetése és összegzése során megállapítottuk, hogy a tanulmányozott irodalomnak megfelelően az emlődaganatokban magas a Cox-2 enzimek immunreaktivitása más daganatokhoz viszonyítva (Howe és mtsai, 2001; Chan és mtsai., 2005; Salinas és mtsai, 2010). A mi vizsgálatunkban lymphomás kutyákból vett mintákat vetettük össze a különböző típusú emlődaganatokkal. Látható, hogy a lymphomák esetén átlagosan 6,3%-os volt a Cox-2 expresszió, ellenben a jóindulatú emlődaganatok esetén is már átlagosan 13,5%-os expressziót tapasztaltunk, amely még a kis elemszám ellenére is csaknem szignifikáns különbségnek adódott ($p=0,0736$). Egyes rosszindulatú emlődaganatoknál (például a tubulopapilláris carcinomák) pedig átlagosan 66,25%-os átlagos expressziót is mértünk. Tanulmányunk során bizonyítást nyert az a megállapítás is, miszerint a benignus emlődaganatokban alacsonyabb a Cox-2 szintje, mint a malignus elváltozásokban (Dore és mtsai, 2003; Mohammed és mtsai, 1999). Statisztika vizsgálataink alapján egyértelműen kijelenthető, hogy közel szignifikáns különbség van az adenoma és a carcinoma simplex ($p=0,0976$), a carcinoma complex ($p=0,0803$), valamint a tubulopapilláris carcinoma ($p=0,0015$) között (4. Ábra, 3. Táblázat). A legmagasabb expressziót az igen agresszív tubulopapilláris carcinoma produkálta (átlag 66,25%), a kevésbé malignus carcinoma simplex és carcinoma complex ellenben alacsonyabb, 32,7% körüli Cox-2 expressziót mutattak. A legalacsonyabb és egyben leggyengébb expresszió az emlődaganatok közül a benignus adenomákban volt tapasztalható (13,5%). Ez egyben azt is jelenti, hogy nem csupán a malignus és benignus emlődaganatok között van különbség, hanem a malignitás foka is számottevően befolyásolja a Cox-2 expressziót. Ugyanakkor a nagyobb stádiumú („Stage”) daganatok mintáiban átlagosan nagyobb a Cox-2 detektálható szintje (5. Ábra, 4. Táblázat). A legszignifikánsabb különbséget a Stage 2 és Stage 3 stádiumú daganatok között találtuk ($p=0,003065167$) (5. Táblázat). A Stage 2 besorolású betegeknél átlagosan 22,1%, míg a Stage 3 stádiumú betegek esetén ennél magasabb, 47,14% Cox-2 expresszió volt tapasztalható (4. Táblázat). Ennek a magyarázata az lehet, hogy a daganat sejttöszetetele változik a növekedése, és a fejlődése során. Minthogy a növekedési potenciál és a metasztatikus hajlam is függ a Cox-2 expressziótól, így idővel egyre több olyan daganatos sejt fog elszaporodni a szövetben, amely expresszálja ezt az enzimet. Tehát, a szövettani metszet daganatsejtjei között egyre szaporodnak a „pozitív” sejtek, így nő az arányuk is a többi daganatsejthez képest.

Tanulmányunk során a különböző típusú emlődaganatok olyan egyéb paramétereit is vizsgáltuk, amelyeket még kevésbé kutattak. Eredményeink szerint a Cox-2 expresszió összefügg a daganat méretével, valamint a recidíva megjelenésével is. Ez a megállapítás érdekes szempontként szolgálhat olyan jövőbeni kutatásokhoz, amelyek a Cox-2 gátló Nemszteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) hatását vizsgálják az emlődaganatos betegeken. Külön csoportokra szedve az ivartalanított, illetőleg a nem ivartalanított betegeket szintén érdekes összefüggéseket tapasztaltunk. A nem ivartalanított betegek esetében a Cox-2 expresszió átlagosan 36,69% volt, ellenben az ivartalanított pácienseknél 16,1% átlagos Cox-2 szint volt detektálható. A két vizsgált csoport között szignifikáns kapcsolat ($p=0,0212$) volt. Ennek háttérében az állhat, hogy a 2 éven belül ivartalanított kutyákban, ha daganatok alakulnak ki, akkor ezek jóindulatúak, vagy kevésbé rosszindulatúak. Amennyiben az ivartalanítás valóban szorosan összefügg a Cox-2 expresszióval, úgy feltételezhetjük, hogy az esetlegesen kialakuló daganatok malignitásával és a recidíva mentességgel is kapcsolatban van, így javíthatja a betegség várható prognózisát. Bár a túlélési idővel összehasonlított eredmények ellentétben állnak a vizsgált irodalomban leírtakkal (7. Ábra, 8. Ábra), fontos megjegyezni, hogy a mi betegeink közül összesen négynek volt jóindulatú daganata, és többnyire kifejezetten nagy malignitású daganatokat vizsgáltunk. Egyes tanulmányok, amelyek kifejezetten a túlélési idő és a Cox-2 expresszió kapcsolatával foglalkoztak, fordított betegszelekciót alkalmaztak és a vizsgált betegeket elhullási idejük alapján választották ki, így létrejött egy kedvező szelekció, melyek között számos jóindulatú formát is bevontak a vizsgálatba (Queiroga és mtsai, 2008; 2010).

A korábbi kutatásoknak megfelelően a tanulmányunk sikeresen alátámasztotta azt a feltételezést, miszerint a Cox-2 enzimek létfontosságú szerepet töltenek be a tumorgenezisben, a daganatok növekedésében, a malignitás fokában, valamint a metasztázisra és a recidívára való hajlam rizikójának kialakításában (Schmidt és mtsai, 2001; Davies és mtsai, 2002; Madhusudan és Harris, 2002; Sharma és mtsai, 2005). Ezeknek a felfedezéseknek köszönhetően a jövőben igen fontos szerepet vállalhatnak a konzervatív terápiában a metasztázisok kialakulási rizikójának csökkentésében, ennek következtében hosszú távon részt vehetnek a klinikai remisszióban. A nem-specifikus Cox-1 és Cox-2 gátló és specifikus Cox-2 gátló Non-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (NSAID) új lehetőségeket nyitnak meg a daganatterápiában, hasznossá válhatnak az inoperábilis betegek palliatív kezelésében és az életminőség javításában.

Összefoglalás

Tanulmányunk célja a Ciklooxigenáz-2 (Cox-2) enzim expressziójának vizsgálata volt kutyák különböző típusú emlődaganataiban. A Cox-2 enzim expressziójának detektálását 31 különböző korú és fajtájú kutyából származó daganatmintán végeztük el. A szövettani eredmények alapján a betegeket daganattípusok szerint 7 csoportra osztottuk; benignus daganat (n=4), carcinoma simplex (n=8), tubulopapilláris carcinoma (n=4), carcinoma complex (n=5), adenocarcinoma (n=2), egyéb emlőtájéki daganat (n=3) és lymphoma (n=5).

A daganatmintákból a Cox-2 expresszió mértékét immunhisztokémiai vizsgálattal mutattuk ki. A Cox-2 szint detektálását fénymikroszkóp alatt végeztük. Az eredmények értékelése során megállapítottuk, hogy a Cox-2 expressziója kifejezetten magasabb az emlődaganatok esetén (13,5-66,25%) a lymphomából vett mintákhoz viszonyítva (6,3%). Ezen felül a Cox-2 expresszió szignifikánsan magasabb volt a malignus daganatokban, mint a benignus elváltozások esetén. A malignitás mellett vizsgáltuk a stádium („Stage”) besorolást is. A Stage 3 esetében szignifikánsan magasabb átlagos Cox-2 expressziót detektáltunk, mint a Stage 2 esetében ($p=0,0030$). Tanulmányunk magába foglalta az emlődaganatok méretének és a recidíva megjelenésének vizsgálatát is. Eredményeink szerint a Cox-2 expresszió pozitívan korrelál a daganat méretével ($r=0,617$), valamint a recidíva megjelenésével ($r=0,427$). A mi vizsgálataink során ellentétes eredményt kaptunk a teljes túlélési időt illetően, mint a tanulmányozott szakirodalom szerint, azonban ez nem volt szignifikáns, és kevés jóindulatú daganatot vizsgáltunk.

A vizsgálataink alapján gyanítható, hogy a metsztázisra, és a recidívára való hajlam összefügg a Cox-2 expresszió mértékével, és a daganatok malignitásával is. Ezen tapasztalatok alapján javasolható Cox-2 antagonistá terápiaát is alkalmazni a hagyományos terápiaás modularitások mellett nem-specifikus Cox-1 és Cox-2 gátló vagy specifikus Cox-2 gátló Nemszteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) alkalmazásával.

Summary

The aim of this study was to investigate immunohistochemically the expression of Cyclooxygenase-2 (Cox-2) in canine mammary tumors of different histological types. Cox-2 enzyme expression was evaluated in 31 samples with reliable results from dogs with different age and breed. According to the results of histological examinations we divided the patient into 7 groups; benign tumour (n=4), carcinoma simplex (n=8), tubuopapillary carcinoma (n=4), carcinoma complex (n=5), adenocarcinoma (n=2), other neoplasm (n=3) and lymphoma (n=5).

The extent of Cox-2 expression was detected by immunohistochemical analysis. We detected the Cox-2 levels with microscope. Evaluation of results we found that in mammary gland tumours the Cox-2 expression was higher (13.5 to 66.25%), compared to lymphoma samples (6.3%). In addition, the Cox-2 expression was significantly higher in malignant tumours than in the benign counterparts. We also investigated the stage of malignancy („Stage”) classification. There was significantly higher Cox-2 expression in Stage 3 than in Stage 2 ($p=0.0030$). Our study was also included the investigation of the sizes and recurrent diseases. We found that the Cox-2 expression is correlated positively with sizes of the tumour ($r=0.617$), and also with the recurrence disease ($r=0.427$). In the case of overall survival time (OS) we found opposite results than the studied literature, but this was not significant. In addition, we examined just a few benign tumours.

The study showed that the tendency to malignancy, metastasis and recurrent disease is related to the level of Cox-2 expression. This suggest that Cox-2 inhibitor non-specific or specific non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID's) may have an useful role to play in the treatment of the mammary gland tumours in addition to conventional therapy modularity.

Rövidítések jegyzéke

ABC: avidin-biotin-peroxidáz komplex
AgNOR: Arginophilic nucleolar organizer region
bFGF: basic Fibroblas Growth Factors
Cox: Ciklooxygenáz enzim
DAB: diamino-benzidin
DFS: disease free survival
IGF: Interleukin Growth Factors
MDR: multidrog rezisztencia
NSAID: Non-Steroid Antiinflammatory Drug
OS: overall survival
PBS: phosphate buffered saline
PCNA: proliferating cell nuclear antigen
PGG₂, PGH₂, PGE₂, PGD₂, PGF₂ α : prosztaglandinok
PGI₂: prosztaciklin
SCC: Squamosus Cell Carcinoma
TCC: Transitional Cell Carcinoma
TXA₂: tromboxán
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factors
WHO: World Health Organisation

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni konzulensemnek, dr. Vajdovich Péternek a rengeteg segítségét és türelmét.

Nagyon köszönöm dr. Koltai Zsófiának a szakmai segítséget, valamint köszönöm dr. Thuróczy Juliannának és dr. Michalik Lászlónak a beteganyag összegyűjtésében nyújtott nagy segítségét.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani a családtagjaimnak és a barátaimnak a munkám során nyújtott segítségért és biztatásért.

Irodalomjegyzék

- Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, et al. 2008 Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res* 68 p. 1732–40.
- Benjamin, SA, Lee, AC, Saunders, WJ, 1999. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Veterinary Pathology* 36 (5), p. 423–436.
- Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Curhan GC, Fuchs CS. 2005 Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA* 294 p. 914–23.
- Chang C, Chiou P, Chen W, Li Y, Cheng Y, Chen S, Lin C, Lai Y 2010 Assessment of the tumorigenesis and drug susceptibility of three new canine mammary tumor cell lines. *Research in Veterinary Science*, 88. p. 285-293.
- Chang ET, Zheng T, Weir EG, et al. 2004 Aspirin and the risk of Hodgkin's lymphoma in a population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst* 96 p. 305–15.
- Chu LL, Rutteman GR, Kong JM, Ghahremani M, Schmeing M, Misdorp W, van Garderen E, Pelletier J 1998 Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. *Breast Cancer Res. Treat.*, 50. (1) p. 11-25.
- Chun R, Knapp DW, Widmer WR et al 1997 Phase II clinical trial of carboplatin in canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder, *J Vet Intern Med* 11 p. 279-283
- Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC 2002 Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol* 55(6) p. 429–434
- Crocker J, Boldy D, Egan M 1998 How should we count AgNOR's. *J. Pathol.*, 158. p. 185-188.
- Dang, CT, Shapiro, CL and Hudis, CA 2002 Potential role of selective COX-2 inhibitors in cancer management. *Oncology*, 16, p. 30-36.

- Davies, G., Martin, L. A., Sacks, N. and Dowsett, M. 2002 Cyclooxygenase-2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention. *Annals of Oncology*, 13, p. 669-678.
- Destexhe E., Vanmanshove P., Coignoul F. 1995 Comparisom of argyrophilic nucleolar organizer regions by counting and image analysis in canine mammary tumors. *American Journal of Veterinary Research.*, 56(2). p. 185-187.
- Donnay I, Rauis J, Devleeschouwer N. 1995 Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *Am J Vet Res* 56 p. 1188-1194.
- Dore M, Lanthier I, Sirois J 2003 Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors, *Vet Pathol* 40 p. 207-212.
- DuBois, R. N., Abramson, S. B., Croord, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B. and Lipsky, P. E. 1998 Cyclooxygenase inbiology and disease. *FASEBJournal*, 12, p. 1063-1073
- Edwards JG, Faux SP, Plummer SM, Abrams KR, Walker RA, Waller DA, O'Byrne KJ 2002 Cyclooxygenase-2 expression is a novel prognostic factor in malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* 8(6) p. 1857–1862
- Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P. 2005 Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev VetMed* 69 p. 109-127.
- Ferguson RH 1985 Canine mammary gland tumors. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 15 p. 501-511
- Fosslien E 2000 Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 30(1) p. 3–21
- Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE et al 1983 Canine mammary epithelial neoplasms: biological implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet Pathol* 20 p. 127-142
- Giles FJ, Kantarjian HM, Bekele BN, Cortes JE, Faderl S, Thomas DA, Manshour T, Rogers A, Keating MJ, Talpaz M, O'Brien S, Albitar M 2002 Bone marrow cyclooxygenase- 2 levels are elevated in chronic-phase chronic myeloid leukaemia and are associated with reduced survival. *Br J Haematol* 119(1) p. 38–45

- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000 The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1) p. 57–70.
- Hassid A, Levine L. 1977 Induction of fatty acid cyclo-oxygenase activity in canine kidney cells (MDCK) by benzo (a) pyrene. *J Biol Chem* 252 p. 6591–3.
- Hla T, Neilson K 1992 Human cyclooxygenase-1 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: p. 7384–8.
- Howe, L.R., Subbaramaiah, K., Brown, A.M. and Dannenberg, A. J. 2001 Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine Related Cancer*. 8, p. 97-114.
- Hwang, D., Scollard, D., Byrne, J. and Levine, E. 1998 Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 90, p. 455-460.
- Ishikawa K., Itoh T, Uchida K, 2005 Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *Vet Med Sci* 67 p. 345-347.
- Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. 1993 Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 268 p. 9049–54.
- Jouzean JY, Terlain B, Abid A, et al 1997 Cyclo-oxygenase isoenzymes: How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs* 53. p. 563-82
- Juntes P, Cor A, Pogacnik M, Senk L 1995 Comparison of the results of the silver nucleolar organizer region (AgNO₃)R technique on normal and carcinomatous mammary glands of dogs using two different image analysis systems. *Zbornik Veterinarske Fakultete Univerza Ljubljana*., 32 (1). p. 7-12.
- Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC 2001 Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer, *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48 p. 85-96
- Khan KN, Stanfield KM, Trajkovic D, Knapp DW 2001 Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol* 38(1) p. 116–119
- Khuder SA, Mutgi AB. 2001 Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis. *Br J Cancer* 84 p. 1188–92.

- Kim YB, Kim GE, Cho NH, Pyo HR, Shim SJ, Chang SK, Park HC, Suh CO, Park TK, Kim BS 2002 Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer* 95(3) p. 531–539
- Kiupel, M., Bostock, D., Mergmann, V. 1999 The prognostic significance of AGNOR counts and PCNA-positive cell counts in canine malignant lymphomas. *J. Comp. Pathol.*, 119. p. 407-418.
- Knapp DW, Glickman NW, DeNicola DB et al 2000 Naturally-occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a relevant model of human invasive bladder cancer. *Urol Oncol* 5 p. 47-59
- Knapp DW, Richardson RC, Chan TC, Bottoms GD, Widmer WR, DeNicola DB, Teclaw R, Bonney PL, Kuczek T 1994 Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Vet Intern Med* 8(4) p. 273–278
- Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang MS, Kim DY, Kweon OK. 2004 Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *J.Vet.Sci.*, 5(1) p. 63-69
- Liou J-Y, Aleksic N, Chen S-F, Han T-J, Shyue S-K, Wu KK. 2005 Mitochondrial localization of cyclooxygenase-2 and calcium-independent phospholipase A2 in human cancer cells: implication in apoptosis resistance. *Exp Cell Res* 306 p. 75–84.
- Lipsky EP 1999 Specific COX-2 inhibitors in arthritis, oncology, and beyond: Where is the science headed? *J Rheumatol* 26 suppl 56. p. 25-30
- MacEwen EG, Harvey HJ, Patnaik AK et al 1985 Evaluation of effects of levamisole and surgery on canine mammary cancer, *J Biol Response Mod* 4 p. 418-426
- MacEwen, E.G., 1990 Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Reviews* 9, p. 125–136.
- Madhusudan S, Harris AL 2002 Drug inhibition of angiogenesis. *Curr Opin Pharmacol* 2 p. 403-414.
- Martin PM, Cotard M, Mialot JP. 1984 Animal models for hormone-dependent human breast cancer, *Cancer Chemother Pharmacol* 2 p. 13-17,

- McEntee MF, Cates JM, Neilsen N 2002 Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. *Vet Pathol* 39(4) p. 428–436
- Millanta F, Calandrella M, Bari G. 2005 Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues, *Res Vet Sci* 79 p. 225-232.
- Misdorp, W., Hart, A.A.M., 1976 Prognostic factors in canine mammary cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 56 p. 779–786.
- Mohammed SI, Knapp DW, Bostwick DG, Foster RS, Khan KN, Masferrer JL, Woerner BM, Snyder PW, Koki AT. 2004 Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder. *Cancer Res* 15;59(22) p. 5647–5650
- Mol JA, Selman PJ, Sprang EPM. 1997 The role of progestins, insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review, *J Reprod Fertil Suppl* 51 p. 339-344.
- Morita I, Schindler M, Regier MK, et al. 1995 Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 270 p. 10902–8.
- Mutsaers AJ, Widmer WR, Knapp DW 2003 Canine transitional cell carcinoma, *J Vet Intern Med* 17 p. 136-144
- Ohichi K, Levine L. 1978 Stimulation of prostaglandin synthesis by tumor-promoting phorbol-12, 13-diesters in canine kidney (MDCK) cells. Cycloheximide inhibits the stimulated prostaglandin synthesis, deacylation of lipids, and morphological changes. *J Biol Chem* 253 p. 4783–90.
- Otto JC, Smith WL. 1995 Prostaglandin endoperoxide synthases -1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12 p. 139–56.
- Pestili de Almeida EM, Piche C, Sirois J, Dore M 2001 Expression of cyclo-oxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J Histochem Cytochem* 49(7) p. 867–875
- Pong SS, Hong SL, Levine L 1977. Prostaglandin production by methylcholanthrenetransformed mouse BALB/3T3. Requirement for protein synthesis. *J Biol Chem* 252 p. 1408–33.

- Queiroga F.L., Lobo L., Lopes C.S. 2008 Prognostic value of Cox-1 and Cox-2 immunohistochemical expression in canine malignant mammary tumours. Study present at the 1st World Veterinary Cancer Congress, Copenhagen, Denmark
- Queiroga FL, Alves A, Pires I and Lopes C 2007 Expression of Cox-1 and Cox-2 in Canine Mammary Tumours. *J Comp. Path.* 136 p. 177-185
- Queiroga FL, Pires I, Lobo L, Lopes CS 2010 The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science* 88 p. 441–445
- Rutteman RG, Withrow SJ, MacEwen EG 2001 23. Tumors of the mammary gland, p. 455-466. In: Withrow SJ, MacEwen EG (ed) *Small Animal Clinical Oncology* 3rd. ed.: W. B. Saunders Co. Philadelphia.
- Rutteman, G.R., Cornelisse, C.J., Dijkshoorn, N.J., Poortman, J., Misdorp, W., 1988 Flow cytometric analysis of DNA ploidy in canine mammary tumors. *Cancer Research* 48, p. 3411–3417
- Salinas CA, Kwon EM, Fitzferald LM, et al. 2010 Use of aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory medications in relation to prostate cancer risk. *Am J Epidemiol* 172 p. 578–90.
- Sarli, G., Preziosi, R., Benazzi, C., Castellani, G., Marcato, P.S., 2002 Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14, p. 25–34.
- Schmidt BR, Glickman NW, DeNicola DB, de Gortari AE, Knapp DW 2001 Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1;218(11) p. 1783–1786
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, et al. 1994 Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 p. 12013–7.
- Sharma S, Zhu L, Yang SC, et al. 2005 Cyclooxygenase 2 inhibition promotes IFN γ -dependent enhancement of antitumor responses. *J Immunol* 175 p. 813–9
- Sharma-Walia N, Paul AG, Bottero V, et al. 2010 Kaposi's sarcoma associated herpes virus (KSHV) induced COX-2: a key factor in latency, inflammation, angiogenesis, cell survival and invasion. *PLoS Pathog* 6:e1000777.

- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. 1998 Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 58 p. 362–6.
- Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH 2000 Effects of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma, *J Vet Intern Med* 14 p. 266-270
- Takahashi N, Matsuda H. 1984 Estrogen and progesterone receptors and progesterone metabolism in canine mammary tumours, *Jpn J Vet Sci* 46 p. 797-803
- Tamura M, Sebastian S, Gurates B 2001 Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87(7) p. 3504–3507
- Thun MJ, Henley SJ, Patrono C 2002 Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 94 p. 252-266.
- Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. 1997 Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 p. 3336–40.
- Vaage J., Donovan D., Loftus T. et al. 1995 Prophylaxis and therapy of mouse mammary carcinomas with doxorubicin and vincristine encapsulated in sterically stabilised liposomes. *European Journal of Cancer*, 31A, No.3 p. 367-372.
- Vail, D. M., MacEwen, E. G., Young, K.M. 2001 Canine lymphoma and lymphoid leukemias In: Withrow, S. J. et al.: *Small Animal Clinical Oncology*, 3rd ed. Philadelphia, p. 558-584.
- Vane JR 1971 Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature* 231. p. 232-5
- Veldhoen N, Watterson J, Brash M et al. 1999 Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer, *Br J Cancer* 81 p. 409-415.
- Williams CS, Mann M, DuBois RN. 1999 The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 18 p. 7908–16.
- Williams, C. S. and DuBois, R. N. 1998 Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *American Journal of Physiology*, 270 p. 393-400.

- Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY, Chung LP 1999 Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early premalignant stage of colorectal tumour progression. *Int J Cancer* 81 p. 845-850.
- Zilli M., Grassadonia A., Tinari N., Giacobbe A., Gildetti S. 2009 Molecular mechanism of endocrine resistance and their implications in the therapy of breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1795 p. 62-81.