

SZENT ISTVÁN EGYETEM
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR

Patológiai Tanszék

**Az emlőmirigy-daganatok peritumoralis területének
patológiai/immunhisztokémiai vizsgálata kutyákban**

*Examination of peritumoral regions of mammary gland tumors in dogs from
immunohistochemical/pathological approach*

Készítette:

Krizsán János

IV. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Jakab Csaba

egyetemi tanársegéd

SzIE ÁOTK, Patológiai Tanszék

Budapest

2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	2
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1. Az emlőmirigy anatómiája, szövettana	4
2.2. A kutyák emlőmirigy-daganatainak szövettani osztályozása	5
2.3. A kutyák emlődaganatainak prognosztikája és rizikója	6
2.4. A kutyák emlőmirigy-daganatainak peritumoralis/pericarcinomatous területe	8
2.5. Az immunhisztokémia	13
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	14
3.1. Kórszövettan	14
3.2. Immunhisztokémia.....	14
4. EREDMÉNYEK	17
5. MEGBESZÉLÉS	27
6. ÖSSZEFOGLALÁS	31
7. SUMMARY	32
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	33
9. IRODALOMJEGYZÉK	34

1. BEVEZETÉS

A szuka kutyák leggyakoribb daganatai, az emlőmirigy-tumörök (MEUTON, 2002). Egyes külföldi onkológiai felmérések szerint, a nőtény kutyák daganatos elváltozásainak gyakorlatilag az 50 %-át teszik ki (DORN, 1968; MITCHELL, 1974). A kutyák emlődaganatainak incidenciája (előfordulási gyakorisága) az állatok kora szerint is változik: idősödő szukáknál gyakrabban jelennek meg tumoros elváltozások a tejlécekben (JITPEAN, et al., 2012). A clinicopathológiai megfigyelések szerint, a sebészileg eltávolított emlőmirigy-tumörök 30%-a hisztológiailag malignus. A kutyák emlőtumoraik incidenciája fokozódik cranio-caudalis irányba: legritkábban thoracalis, valamivel gyakrabban abdominalisan és leggyakrabban inguinalisan fordulnak elő. Ez összefüggésben van a hasi és lágyéki emlőmirigyszövetek fokozottabb növekedési kapacitásával, az itt található nagyobb emlőmirigy parenchymatómeggel, ill. a fokozottabb lobularisáltsággal és szekréciós tevékenységgel (MEUTON, 2002). A korai (első oestrus előtti) ovariectomia szignifikánsan csökkenti a kutyák emlőmirigyének tumoros elváltozását (ELSE, és HANNANT, 1979).

A kutyákban kifejlődött emlőmirigy-tumörök sebészi kimetszése történhet totalis mastectomia (teljes tejLEC eltávolítás), regionalis/subtotalis mastectomia, nodulectomia és blokk dissectio/nyirokcsomó eltávolítás révén. A korszerű, morfológiai, pathológiai, klinikai prognosztikai faktorok felvilágosítást nyújtanak a tumorrecidiva valószínűségéről, a daganat metastasishajlamáról, a szövetspecifikus metastasisről, a mikrometastasisokról, a residualis tumorsejtekről, az onkológiai beteg állat átlagos és a betegségmentes túléléséről, ill. az emlőtumörök kialakulását kísérő pathológiai-molekuláris folyamatokról.

A pathológiai prognosztikai faktorok széles skáláját biztosítja az immunhisztokémiai vizsgálat. Segítségével az emlődaganat pontos szövettani típusának meghatározása mellett (az egyik legfontosabb prognosztikai faktor), számos, a kórlefolyást meghatározó egyéb, a kutyákban kialakult emlődaganatra jellemző biológiai tulajdonságról nyújt felvilágosítást, így a proliferációs aktivitásról, a peritumoralis lymphovascularis metastasisokról, az intra- és peritumoralis mikroérsűrűségről (a daganat vascularisáltságáról), a regionalis mikrometastasisokról, a daganat histogenesiséről, a műtéti eltávolítást követően, a tumorágy területén maradt residualis daganatsejtekről (HAYES, et al., 1981).

Munkánk során, kutyák sebészileg eltávolított emlőmirigy-daganatait körülölelő, ún. peritumoralis, vagy pericarcinomatous szöveti terület részletes feldolgozását tűztük ki célul, az általunk beválogatott antitestekből: ***claudin-5*** (endothel specifikus tight junction markerből), ***pancytokeratin*** (panepithelialis markerből), ***alfa-Smooth muscle actin*** (simaiizom markerből), felépülő immunhisztokémiai panelre alapozva. Elsődleges célunk a rosszindulatú simplex emlőmirigy-carcinómák körüli lymphovascularis tumoros érbetörés, a lymphogen invasio feltüntetésének kidolgozása volt kettős immunfestés alapján. Oncopathologiai munkánkhoz a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, Patológiai Tanszék tumorbankjából (hagyományos paraffin blokkos archívumából) szelektáltunk 18 simplex infiltráló emlőmirigy-carcinómát.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az emlőmirigy anatómiája, szövettana

A kutyák testének ventralis falán, a bőr alatti kötőszövetben az anatómiai középsík két oldalán paramedian, a mellkastól a lágyéktájáig terjedően találjuk a tejmirigyeket (ún. tejléceket). Az emlőmirigyek száma egy-egy oldalon 5-6, melyek közül kettő mellkasi, kettő (három) hasi, egy pedig lágyéki (FEHÉR, 1980). Az emlőmirigy fejlődését tekintve módosult verejtékmirigy, amelynek terméke a tej (lac) (FEHÉR, 1980; GUZSAL, 1981). A mirigyállomány egymással anasztomizáló, faágszerűen elágazódó rendszer, melynek legtávolabbi és legkisebb egysége az ún. *terminalis ductalis lobularis egység* (angol neve után: **TDLU**). A TDLU-t az alveolaris mirigyvégkamrából felépülő mirigylebenyke (*lobulus*), az intralobularis és extralobularis szakasszal rendelkező *terminalis ductulus* (tejvezető csatorna) és az acinusok körüli, laza, glikóz-aminoglikánokban gazdag ún. *intralobularis kötőszövet* alkotja (MEUTON, 2002). A kb. 0,1-0,25 mm átmérőjű alveolusok egyrétegű mirigyhámból, myoepithelből és alaphártyából épülnek fel, melyet a perialveolaris kötőszövet egészít ki. A tej szekrécióját végző mirigyhámsejtek mind morfológiai, mind funkcionális szempontból azonos típusúak és értékűek. A myoepithel sejtek (kosársejtek) a mirigyhámsejtek és az alaphártya között vagy a mirigyhámsejtek basalis része közé ékelődve helyeződnek, nyúlványaikkal kosárszerűen körülölelve az alveolust. A legkisebb vezetékek (a terminalis vezetékek) falát szekréciós típusú hámsejtek, myoepithel és alaphártya képezi. Az *interlobularis vezetékek* az intralobularisoknál tágabbak, gyakoriak rajtuk a befűződések, emiatt öbölszerű tágulatok alakulnak ki, illetve a hámbélésük kétrétegűvé válik és a myoepithel sejtek elmaradnak (MEUTON, 2002; FEHÉR, 1980; GUZSAL, 1981).

Az emlő az ivarézés során kezd el fejlődni az *oestrogen*, a *progesteron*, a *mellékvese-* és az *agyalapi mirigy hormonjainak* ellenőrzése, az *inzulin* és a *pajzsmirigyhormonok* szövettápláló hatása alatt. Emellett bizonyítékok szólnak a *helyi növekedési faktorok* (pl. *Epidermal Growth Factor*) szabályozó hatása mellett is (MEUTON, 2002).

2.2. A kutyák emlőmirigy-daganatainak szövettani osztályozása

A kutyák emlődaganatainak főbb histotípusait, a WHO-klasszifikáció (szövettani osztályozás) csoportjait, táblázatban összesítettük (**1. Táblázat**) (MISDROP, et al., 1999).

<i>Az emlődaganatok kutyákban</i>	
1. Malignus tumorok:	2. Benignus tumorok:
1.1 Nem infiltráló (in situ) carcinoma	2.1 Adenoma
1.2 Complex carcinoma	<i>2.1.1 Simplex adenoma</i>
1.3 Simplex carcinoma	<i>2.1.2 Complex adenoma</i>
<i>1.3.1 Tubulopapillaris carcinoma</i>	<i>2.1.3 Basaloid adenoma</i>
<i>1.3.2 Solid carcinoma</i>	2.2 Fibroadenoma
<i>1.3.3 Anaplasticus carcinoma</i>	<i>2.2.1 Hypocellularis fibroadenoma</i>
1.4 Speciális típusú carcinomák	<i>2.2.2 Hypercellularis fibroadenoma</i>
<i>1.4.1 Orsósejtes carcinoma</i>	2.3 Benignus vegyes tumor
<i>1.4.2 Laphámrák</i>	2.4 Ductalis papilloma
<i>1.4.3 Mucinosus carcinoma</i>	3. Nem klasszifikált tumorok
<i>1.4.4 Lipid-gazdag carcinoma</i>	4. Emlőmirigy hyperplasia/dysplasia:
1.5 Sarcoma	4.1 Ductalis hyperplasia
<i>1.5.1 Fibrosarcoma</i>	4.2 Lobularis hyperplasia
<i>1.5.2 Osteosarcoma</i>	<i>4.2.1 Epithelialis hyperplasia</i>
<i>1.5.3 Egyéb sarcomák</i>	<i>4.2.2 Adenosis</i>
1.6 Carcinosarcoma	4.3 Ciszták
1.7 Carcinoma vagy sarcoma a benignus tumorban	4.4 Ductectasia
	4.5 Focalis fibrosis (fibrosclerosis)
	4.6 Gynecomastia

1. Táblázat A kutyák emlődaganatainak WHO-klasszifikációja

2.3. A kutyák emlődaganatainak prognosztikája és rizikója

A kutyák emlőmirigy-daganatainak WHO-klasszifikációja lehetővé teszi a biopátum histotipizálását. Viszont a diagnosztikai eredmény, ill. a prognózis esszenciális elemei közé tartozik a műtéti minta resectiós széleinek állapota (pozitív, negatív, közeli infiltratio), valamint a sebészi szél és a histologiai tumorszél közötti, ún. peritumoralis terület paramétereinek (a nyirok-, és vérérhálózat állapota, a peritumoralis gyulladásos reakció mértéke, a tumor indukált stromasejtek -myofibroblastok- jelenléte, a perineuralis területek érintettsége, a peritumoralis praeneoplasziák) korrekt elemzése. Ezt egészíti ki a sentinel-nyirokcsomó vizsgálata.

A humán- és állatorvosi vonalon használt prognosztikai faktorokat táblázatban foglaltuk össze (**2. Táblázat**) (MEUTON, 2002).

<i>Prognosztikai faktor</i>	<i>Ember</i>	<i>Kutya</i>
Késői felismerés	-	-
Lokalizáció	-	+
Az elsődleges tumor klinikai állapota	+	+
Tumorméret, tumortérfogat	+	+
Kórszövettani típus	+	+
Kórszövettani grade (a malignitás foka)	+	+
A növekedés típusa	+	+
Gyógykezelés típusa	+	-
Regionális nyirokcsomó áttét	+	+

2. Táblázat Prognosztikai faktorok emberben és kutyában

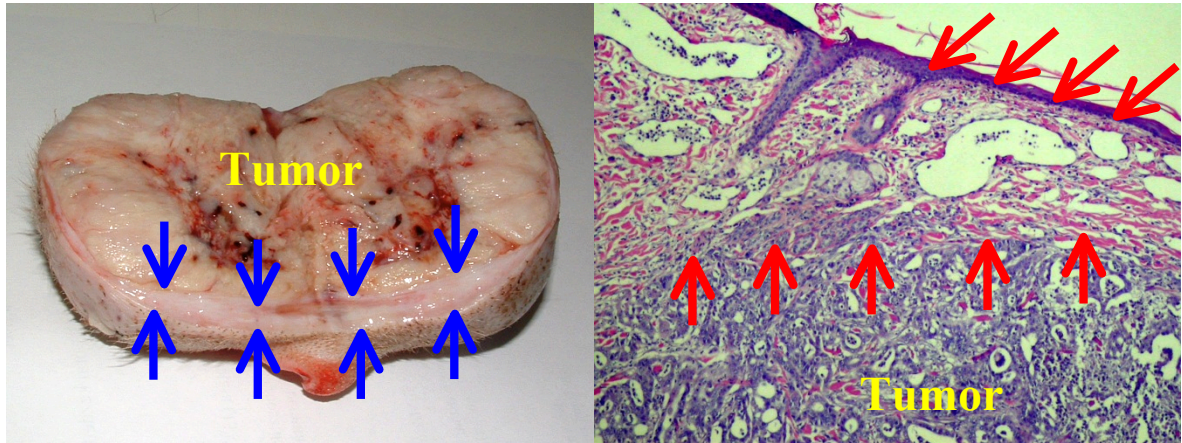
Az emlődaganat műtéti eltávolítása során, ill. a kiegészítő képalkotó eljárások segítségével, a klinikusnak tájékozódnia kell a tumor méretéről, a regionalis-, és a távoli metastasis meglétéről, valamint hiányáról. Ennek során meghatározza a kutyák emlődaganatának klinikai stádiumát (*staging system*) (**3. Táblázat**) (PHILIBERT, et al., 2003).

<i>T: Primer tumor</i>
T₁ = a daganat legnagyobb átmérője < 3 cm T₂ = a daganat legnagyobb átmérője 3-5 cm T₃ = a daganat legnagyobb átmérője > 5 cm
<i>N: Regionalis lymphonodus (RLN)</i>
N₀ = szövettanilag v. cytologiailag nem észlelhető RLN metastasis N₁ = szövettanilag v. cytologiailag igazolható RLN metastasis
<i>M: Távoli metastasis</i>
M₀ = nem mutatható ki távoli metastasis M₁ = kimutatható távoli metastasis

3. Táblázat A kutyák emlőmirigy-daganatainak staging (TNM)-rendszere

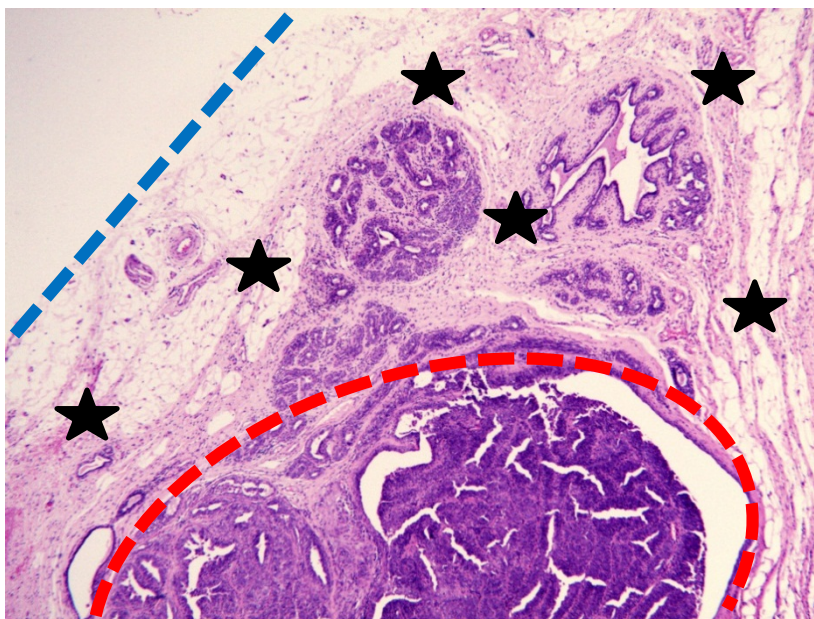
2.4. A kutyák emlőmirigy-daganatainak peritumoralis/pericarcinomatosis területe

A kutyák emlőmirigy-carcinómáinak peritumoralis területe (1. ábra) fontos prognosztikai információt tartalmaz. Alapvető kérdés, hogy mit tekintünk peritumoralis területnek.

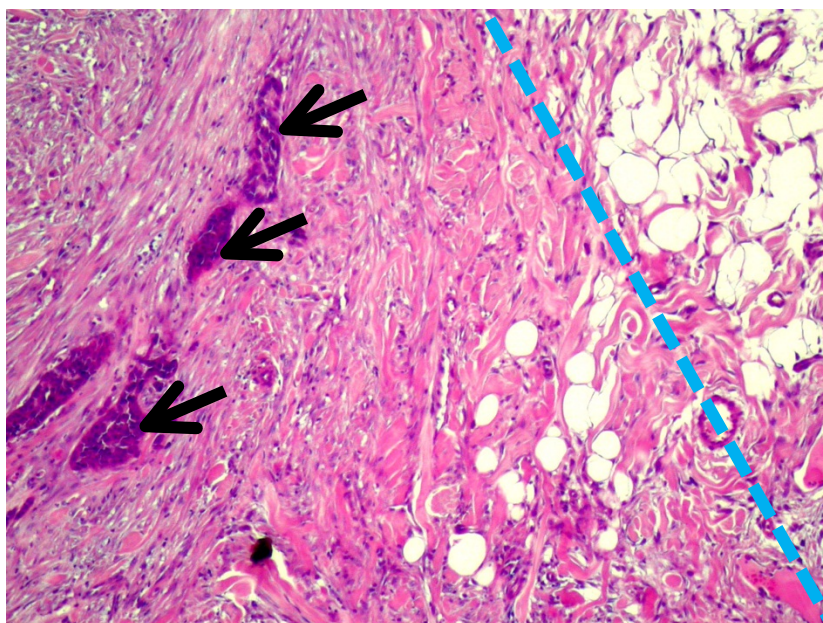


1. ábra. A bal oldalon kutyából műtétilag eltávolított emlőmirigy-carcinoma metszészlapja látható, a peritumoralis terület kiemelésével (kék nyilak), ill. jobb oldalt a tumor és a pericarcinomatosis terület kórszövettani felvétele látható (piros nyilak). Haematoxylin és eosin-festés (H.-E.), 100x.

A *peritumoralis szöveti terület*, a daganat mikroszkópos határa és a sebészi (resectiós) szél közötti terület (2. ábra). A daganat mikroszkópos határának pontos meghatározása során figyelembe kell venni, hogy a stromát, azaz tumor indukált myofibroblastokat nem aktiváló emlőmirigy-rák esetén, a daganat parenchymájának a szövettani marginalisa, míg az ún. desmoplasticus (stromadús, tumor indukált myofibroblastban gazdag) emlőmirigy-carcinómák esetén, a stroma szövettani határa azonos a daganat mikroszkópos határával (3. ábra).

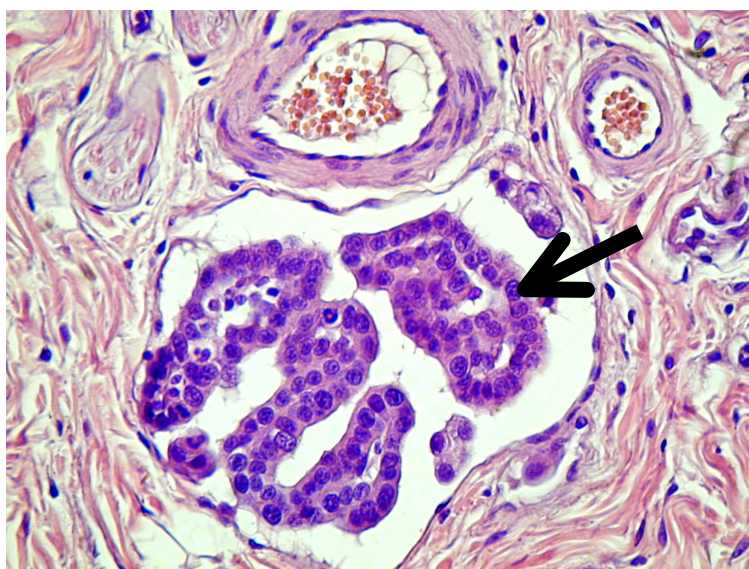


2. ábra. Kutyaából műtétilag eltávolított, nem stromagazdag emlőmirigy-daganat peritumoralis területének mikroszkópos képe. Piros szaggatott vonal jelzi a daganat mikroszkópos határát, a kék szaggatott vonal a resectiós szélt. A csillagokkal jelölt rész a peritumoralis szöveti terület. H.-E., 40x.

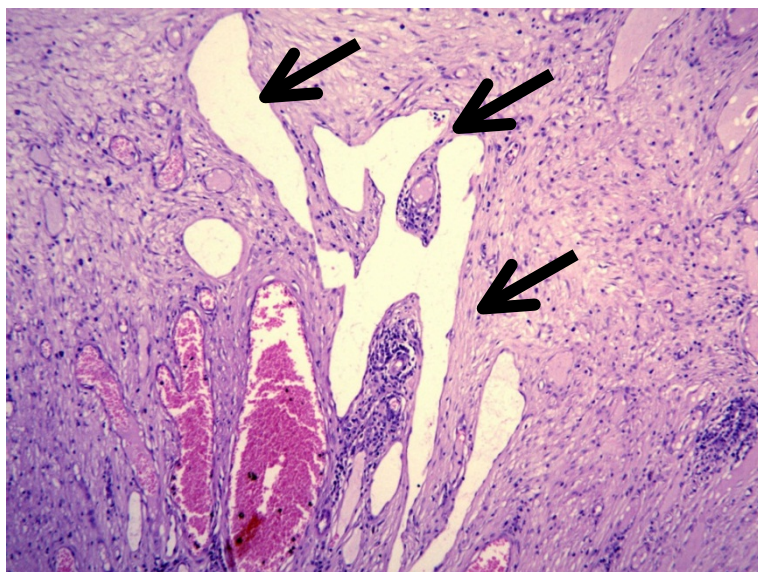


3. ábra. Kutyaából műtétilag eltávolított, stromagazdag, desmoplasticus emlőmirigy-carcinoma szövettani határa (kék szaggatott vonal). A nyilak a parenchymasejteket jelölik. H.-E., 100x.

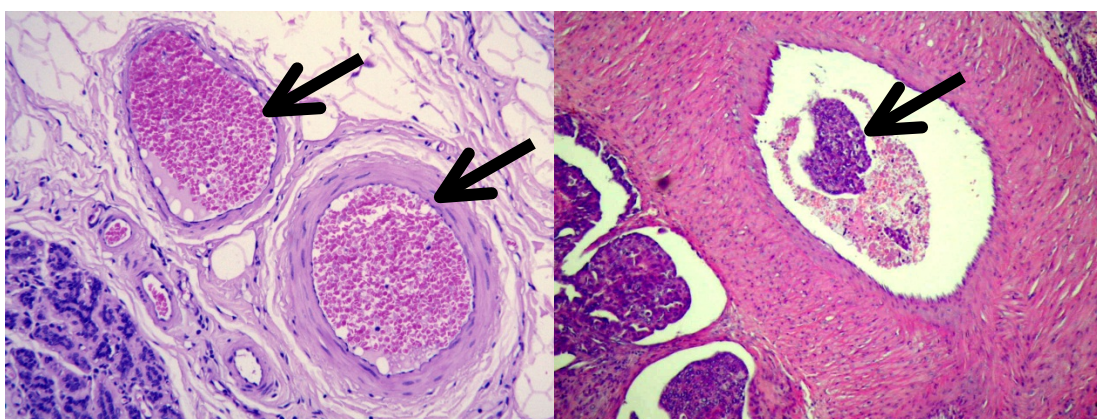
A sebészileg eltávolított emlőmirigyrákok peritumoralis területein a következő, *prognosztikai* szempontból fontos struktúrákat, *paramétereket* kell figyelembe venni: (I.) A peritumoralis nyirokerek állapota: (a) tumorembolussal való terheltsége (tumoros intravasatio jele) (**4. ábra**), (b) enyhe fokú – mérsékelt - kifejezett tágulata daganatos nyirokérbetörés jelei nélkül (**5. ábra**). (II.) A peritumoralis vérerek tumorembolussal való terheltsége (tumoros intravasatio jele) (**6. ábra**). (III.) Tumorosan infiltrált unilaterális, bilaterális, basalis, vagy basolateralis sebészi szélek; negatív szélek; közeli infiltratio. (IV.) A peritumoralis gyulladásos reakció jelenléte, mértéke (**7. ábra**).



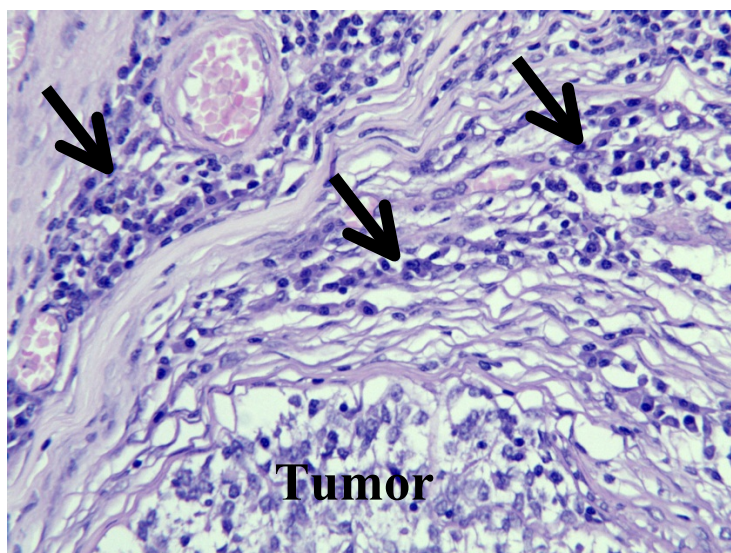
4. ábra. Kitágult peritumoralis nyirokérben lévő emlőmirigyrák-embolus (tumoros intravasatio,) (nyíl) kutyában. H.-E., 200x



5. ábra. Mérsékelten tágult peritumoralis nyirokerek (lymphostasis, nyirokpangás), kutya emlőmirigy-carcinoma környezetében, tumorembolus terheltség jele nélkül (nyilak), enyhe reaktív lymphocytás reakcióval. H.-E., 100x



6. ábra. Bal oldalon intact, tumorembolus mentes peritumoralis vérerek (nyilak). H.-E., 200x. Jobb oldalon tumoros intravasatio peritumoralis vérérben (nyíl). H.-E., 40x



7. ábra. Pericarcinomatosis reaktív, lymphohistiocytás, gyulladásos beszűrődés (nyilak).
H.-E., 400x

A kutyák sebészileg eltávolított emlőmirigy-daganatainak mikroszkópos vizsgálata során felállított, pathologiai-diagnosztikai leletben minden esetben nyilatkozni kell arról, hogy a minta ép szövetben, azaz tumorosan nem infiltrált, negatív **sebészi szélekkel** lett-e eltávolítva, vagy a vizsgálat során lateralisán és/vagy basalisan észlelte-e pozitív, tumorosan infiltrált resectiós szél. Ez utóbbi esetben a tumor eredeti talajszövetében maradt ún. tumorreziduum miatt, recidiva várható. A leletben fel kell tüntetni azt is, hogy a tumor a sebészi széleket jelentősen megközelítette-e. Ebben az esetben javasolt a sorozatmetszetek készítése és kiértékelése. Ezek az adatok csak akkor jelennek meg a diagnosztikai eredményben, ha a megfelelően konzervált, teljes minta kerül pathologiai feldolgozásra. Biopsziafragmentumok beküldése esetén nincs lehetőség a sebészi szélekről nyilatkozni. A resectiós szélek állapotának megítéléséhez általában elegendő feltételeket nyújt rutin H.-E. alapú kórszövettan, de emlőmirigy-carcinómák esetén javasolt az epithelialis markerekre alapozott immunhisztokémiai vizsgálat, mivel ezek a malignomák nemcsak cohesiv solid csoportokban, hanem individualisan, unicellularisan is képesek amoeboid mozgással infiltrálni, ami összetéveszthető reaktív histiocytákkal, ill. egyéb gyulladásos sejtes elemekkel (JAKAB, 2012). A daganatstroma a daganat nem neoplasticus részét képezi. Tartalmaz tumor-indukált mikroereket, reaktív lymphocytákat, histiocytákat, extracellularis matrix elemeket és tumor-indukált myofibroblastokat (CHOMETTE, et al., 1990; RØNNOV, és PETERSEN, 1993; RØNNOV-JESSEN, et al., 1992). A stromagazda, ún. desmoplasticus emlőmirigyrákrok esetén a daganatsejteket körülölelő, bőséges stroma, amely jelentős részt myofibroblast sejteket tartalmaz, a rutin H.-E. alapú kórszövettani vizsgálat során könnyen összetéveszthető, az

eredeti interstitiummal, ami fibroblast és collagen rost gazdag. Ezekben az esetekben javasolt a simaizom actin (α -SMA) alapú immunhisztokémiai vizsgálat, mivel ez egyértelműen feltűnteti a ráksejteket körülölelő, bőséges stroma által adott daganathatárt.

A legfontosabb információt a *peritumoralis szöveti terület nyirok- és vérereinek* állapota adja. Amennyiben tumoros intravasatio észlelhető a daganatkörüli nyirokerekben, javasolni kell a sentinel (őrszem), vagy helyi nyirokcsomók kórszövettani és immunhisztokémiai vizsgálatát, metastasis terheltség szempontjából (JAKAB, et al., 2010). A tumorembolusokkal terhelt nyirok- és vérerek esetén, az emlőmirigy-carcinomát már nem helyi, hanem szisztémás betegségként kezeljük. Többszörös, meghatározott időszakonkénti, postoperatív mellkas radiológiai (röntgen) vizsgálatot, valamint hasi UH-vizsgálatot kell kivitelezni a távoli, esetleges szervi metastasisok detektálása végett. A peritumoralis szöveti terület nyirokereinek feltűntetésére javasolt az endothel-specifikus anti-claudin-5 és az anti-CD31 antitestek. Segítségükkel kiküszöbölhető, a biopsziás minta formaldehid oldatban történt konzerválása okozta szöveti retractio miatti, nyirokérbetörést utánozó histológiai jelenség (JAKAB, et al., 2008).

2.5. Az immunhisztokémia

Az immunhisztokémia az immunológia fejlődése során, annak egy mellékágaként jött létre az 1950-es években és vált napjainkra a modern pathologia nélkülözhetetlen diagnosztikus és kutató módszerévé (KRUTSAY, 1999). Az immunhisztokémia végrehajtható gyorsfagyasztott, vagy formaldehid oldatban konzervált és paraffinba, vagy műgyantába ágyazott preparátumon is. A módszer az immunológiából jól ismert *antigén-antitest reakción* alapszik: az immunsejtek által termelt ellenanyagok nagy specificitással kötődnek azokhoz a molekulákhoz, molekularészletekhez (antigénekhez), amelyek ellen termelődtek. Az antitesteknek ezt a kötődését fel lehet használni arra, hogy az antigének jelenlétét, eloszlását a szövetekben, sejtekben kimutassuk (KRUTSAY, 1999; DELELLIS, és DAYAL, 1987). Az immunhisztokémia során nagy molekulású vegyületeket: strukturális, vagy funkcionális fehérjéket, glikoproteineket, vagy komplex szénhidrátokat (poliszacharidokat), lipideket mutatunk ki a sejtekben, vagy az extracelluláris térben a különböző megbetegedések (pl. daganatos elváltozás) kórisméjének pontos meghatározása céljából (CAMPBELL, és PIGNATELLI, 2002; CEREJIDO, et al., 1998; KOPPER, és TÍMÁR, 2002; KRUTSAY 1999; MASON, és GATTER, 1987; MIETTINEN, 1993; MERZ, et al., 1993).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kórszövettan

A munkánk során a patológiai tanszék tumorbankjából (conventionalis paraffinos blokk archívumából) szelektáltunk 6 solid infiltráló, grade III-as, nem desmoplasticus, nyirokérbetörés jeleit nem mutató; 6 solid infiltráló, grade III-as, desmoplasticus nyirokérbetörés jeleit mutató és 6 solid infiltráló, grade III-as, nem desmoplasticus nyirokérbetörés jeleit mutató, kutyákból sebészileg eltávolított emlőmirigy-carcinoma simplexet. Az általunk beválogatott mintákat szobahőmérsékleten (20°C-os), 24 órán át, 8 %-os pufferolt (PBS, pH 7.0) formaldehid oldatban konzerváltuk. Az így nyert szövetmintákat *Shandon excesor szövet-előkészítő automatával* tettük alkalmassá a további feldolgozásra. Az automata szövet-előkészítő gép a 14 órás programja alatt 6 lépcsős felszálló alkohol-sorozat (4x1 óra, majd 2x1,5 óra) és 3 lépcsős felszálló xylol-sorozat (3x1 óra) után 3 lépésben (3x80 perc) 60°C-os paraffinnal (*Shandon Histoplast Pelletised Paraffin Wax*) kontaminálta a szövetmintákat. A szövet-előkészítést a paraffinos beágyazás követte. A paraffinos blokkokból 3-4 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket haematoxylinnal és eosinnal festettünk meg, *Shandon Varistain 24-4 automata festőgép* segítségével. A metszeteket *Nikon Optiphot-2 típusú fénymikroszkóp* segítségével analizáltuk (**8-9. ábrák**, EREDMÉNYEK fejezetben).

3.2. Immunhisztokémia

A továbbiakban az indirekt immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a metszeteket kétszer váltott xylolban (2x10 percen keresztül), majd háromszor váltott alkoholban (3x5 percen át 100%-os, 70%-os és 50%-os alkohol) deparaffináltuk, majd 1x-es PBS-sel való mosás után antigén feltárást végeztünk. Az antigének feltárása magas hőmérsékleten, mikrohullámmal (30 perc, 800 W) történt, kiegészítve Target Retrieval Solution feltáró oldattal (DAKO, Glostrup, Dánia, pH 6). Az endogen-peroxidáz aktivitását 0,3%-os H₂O₂-dal, metanolban blokkoltuk 5 percen keresztül. A vizsgálatainkhoz felhasznált antitesteket táblázatban foglaltuk össze (**4. Táblázat**). Az immunhisztokémiai reakciókat avidin-biotin immunperoxidáz rendszerrel (DAKO LSAB2 Kit) és DAB (diamino-benzidin) chromogennel tettük láthatóvá. A kontrasztfestés haematoxylinnal történt. A negatív kontroll metszeteket az elsődleges antitestek kihagyásával készítettük. Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelése során külső pozitív kontrollokat használtunk (**5. Táblázat**).

1. anti- <i>claudin-5</i> (monoclonalis egér ellenanyag, 1:100, Zymed Inc.)
2. anti- <i>α-smooth muscle actin</i> (α -SMA) (monoclonalis egér ellenanyag, 1:8000, Sigma)
3. anti- <i>pancytokeratin</i> (AE1-AE3) (monoclonalis egér ellenanyag, 1:100, DAKO)

4. Táblázat Az immunhisztokémiai vizsgálat során felhasznált ellenanyagok összesítése.

Antitest	Külső pozitív kontroll
1. Claudin-5	Kutya haemangioma
2. α -SMA	Kutya vaginalis leiomyoma
3. Pancytokeratin	Kutya bőr eredetű laphámrák

5. Táblázat Az immunhisztokémiai vizsgálat során felhasznált külső pozitív kontrollok összesítése.

A mintákban a következő peritumoralis struktúrákat vizsgáltuk: peritumoralis nyirokerek, vérerek; intravasalódott (érbetört) tumorsejtek, peritumoralis tumor-indukált myofibroblastok.

A megvizsgált mintákban tapasztalt immunreaktivásokat, a megbízható, külső pozitív kontrollhoz viszonyítottuk. Ha a mintákban megfigyelt immunreaktivitás megegyező volt a külső pozitív kontroll mintában észleltekkkel, akkor az „intenzív” jelzőt használtuk a reakció leírására, ha kevésbé volt erős, akkor a „gyenge” jelzőt alkalmaztuk. A tapasztalt immunreakciók kiterjedésénél a diffúz jelzőt használtuk amennyiben a szövetben kiterjedten érzékeltük a pozitivitást, a focalis (multifocalis) jelzőt használtuk, ha nem kiterjedten, hanem körülírt területe(ke)n észleltük a reaktivitást. Homogen minőségi jelzőt használtunk, ha az immunreaktivitás egyenletes volt intenzitásban, ill. inhomogen jelzőt, ha eltérő intenzitású szöveti területeket észleltünk. A sejtekben észlelt immunreaktivások cellularis helyeződését táblázatban összesítettük (**6. Táblázat**).

Antitest	Immunreakció
1. Claudin-5	Membrán
2. α -SMA	Cytoplasmaticus
3. Pancytokeratin	Cytoplasmaticus

6. Táblázat Az immunhisztokémiai reakciók (immunreaktivások) cellularis típusai.

Az **egy antitest komponensű** (claudin-5, vagy α -SMA, vagy pancytokeratin) alapú, indirekt immunhisztokémiai **festések** mellett, **kettős immufestéseket** is terveztünk. Ez utóbbi során az immunoperoxidáz enzim szubsztrát rendszer mellett, alkalikus foszfátázt is alkalmaztunk, ill. nitroblue tetrasolium (NT)/bromo chloro indolyl foszfát (BCIP) chromogenszubsztrátokat használtunk. Ennek alapján, a következő kombinációkat teszteltük (**7. Táblázat**).

Antitest	Enzim-chromogen rendszer	Színreakció
<i>Claudin-5</i>	Peroxidáz/DAB	Barna
<i>Pancytokeratin</i>	Alkalikus-foszfátáz/(NT/BCIP)	Püspöklila
Antitest	Enzim-chromogen rendszer	Színreakció
<i>Claudin-5</i>	Alkalikus-foszfátáz/(NT/BCIP)	Püspöklila
<i>Pancytokeratin</i>	Peroxidáz/DAB	Barna
Antitest	Enzim-chromogen rendszer	Színreakció
<i>α-SMA</i>	Peroxidáz/DAB	Barna
<i>Pancytokeratin</i>	Alkalikus-foszfátáz/(NT/BCIP)	Püspöklila
Antitest	Enzim-chromogen rendszer	Színreakció
<i>α-SMA</i>	Alkalikus-foszfátáz/(NT/BCIP)	Püspöklila
<i>Pancytokeratin</i>	Peroxidáz/DAB	Barna

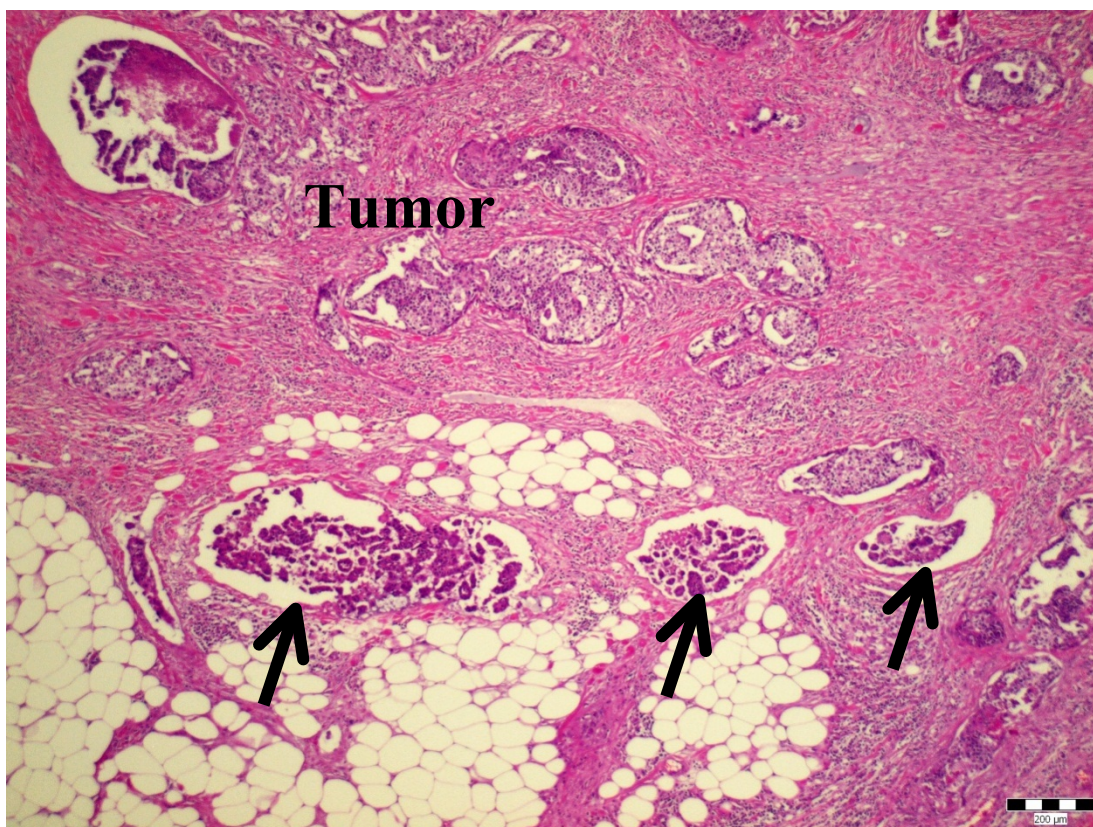
7. Táblázat A kettős immunhisztokémiai reakciók kombinációi

Célunk, a kettős immunfestés alkalmazásával az volt, hogy a kutyák emlőmirgy-carcinómái körüli, peritumoralis/pericarcinomatosis szöveti területen a tumorembolus és az általa érintett nyirokérstruktúrák egy metszetben, együtt váljanak morfológiailag detektálhatóvá. A pancytokeratin a nyirokérben sodródó rákembolust jelöli, a claudin-5 a nyirokér nem roncsolt endotheliumát és az α -SMA a nyirokerek endothel rétege alatti simaizomsejtjeit. DAB esetén barna színreakció, míg NT/BCIP esetén püspöklila színreakció mutatja a pozitív jelet, az immunreaktivitást a ráksejtek cytoplasmájában (pancytokeratin antitest), az endothel sejtek membránjában (claudin-5 antitest) és a simaizomsejtek cytoplasmájában (α -SMA antitest).

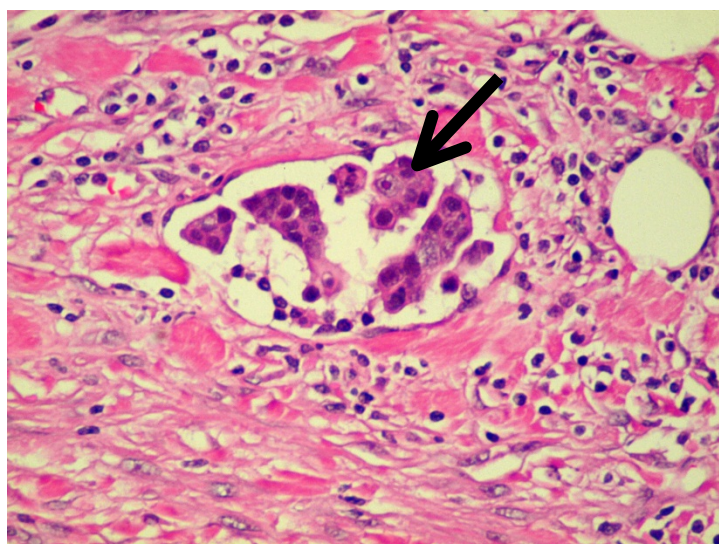
4. EREDMÉNYEK

Az egy antitest komponensű immunhisztokémiai vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a kutyák emlőmirigy-carcinomáit körülölelő intact, ill. tumorembolussal terhelt nyirokerek ép endothelsejtjei intenzív, homogén, diffúz claudin-5 membránpozitivitást adnak. A tumorsejtek által destruált endothelszakaszon claudin-5 negativitást észleltünk (**10. ábra**). Az α -SMA antitesttel végzett peritumoralis vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a nyirokérfalakban lévő simaizomsejtek intenzív, homogén α -SMA pozitivitást adnak (**11. ábra**), azonban a simaizomsejtmentes kis nyirokkapillárisokban ez a pozitív reakció elmaradt. A pancytokeratin epithelialis marker intenzív pozitivitást adott a carcinoma sejtekben, mind a primaer tumorban, mind pedig a nyirokérben lévő ráksejtembolusokban (**12. ábra**).

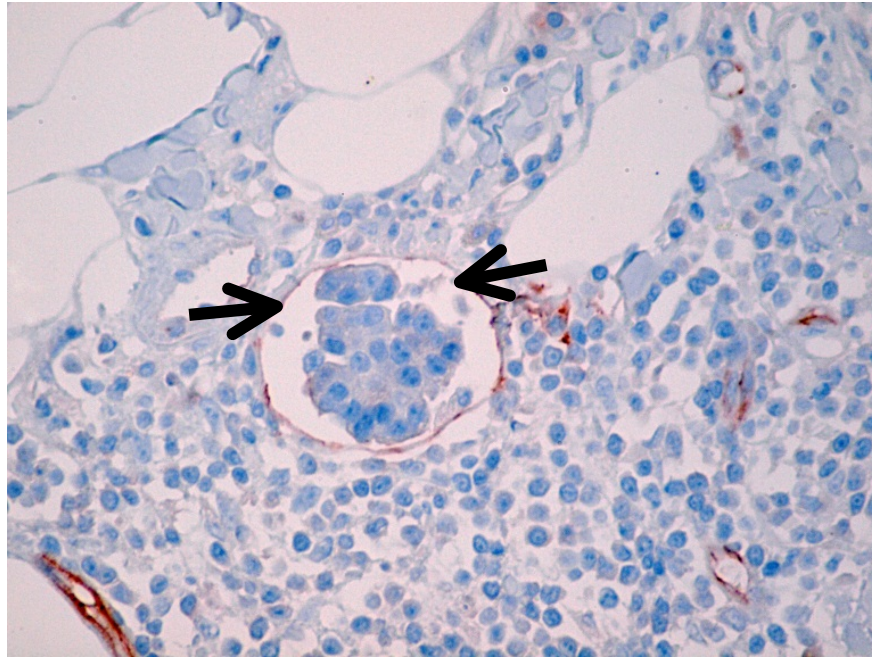
Az egykomponensű immunhisztokémiai reakciók esetén azt tapasztaltuk, hogy a pericarcinomatosis nyirokerekben, a daganatembolusok és a daganat invasio okozta endothel károsodás miatt gyakorta volt észlelhető claudin-5 negativitás, ami zavarta a tumorterhelt nyirokér felismerését. Ezt kompenzálta az α -SMA pozitív simaizomsejtréteg a nyirokérfalban, viszont a kisméretű nyirokkapillárisok simaizomsejtmentessége miatt az α -SMA alkalmatlan volt a kapilláris feltüntetésére. A pancytokeratin intenzív, homogén immunreaktivitást mutatott a peritumoralis ráksejtekben, de nem lehetett eldönteni egyértelműen, a formaldehid oldat konzerválása miatti szöveti zsugorodás miatt érzékelhető szöveti hézag a ráksejtek körül, vagy ténylegesen nyirokér lumenben vannak.



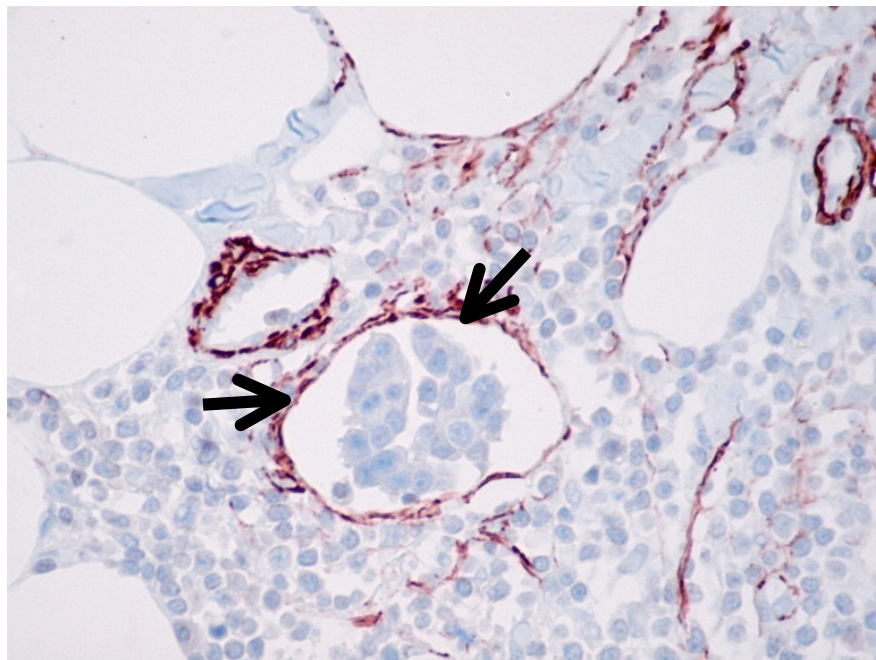
8. ábra. High grade solid szöveti szerkezetű, desmoplasticus infiltráló simplex emlőmirigy-carcinoma, többsejtes tumorembolusokkal terhelt, peritumoralis, kitágult nyirokerekkel (nyilak). H.-E., 40x.



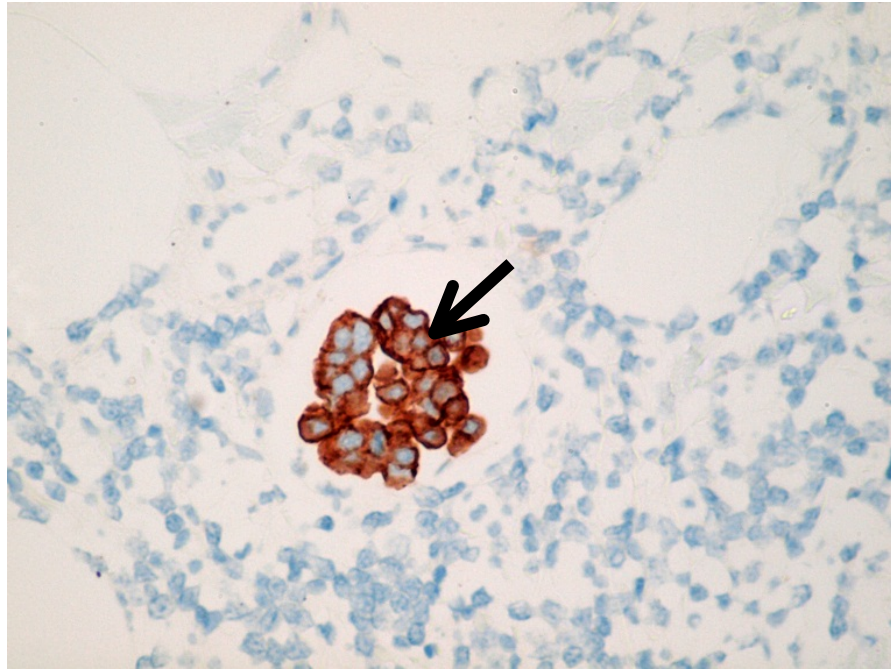
9. ábra. A multicellularis ráksejtembolussal (nyíl) terhelt, kitágult pericarcinomatosisus nyirokér. H.-E., 400x.



10. ábra. Az egy antitest komponensű IHC reakciók közül, a claudin-5 immunreaktivitás (barna színreakció) észlelhető, a nyirokér endotheliumában (nyilak), ill. az intravasalis claudin-5 negatív rákembolus. IHC., 400x.

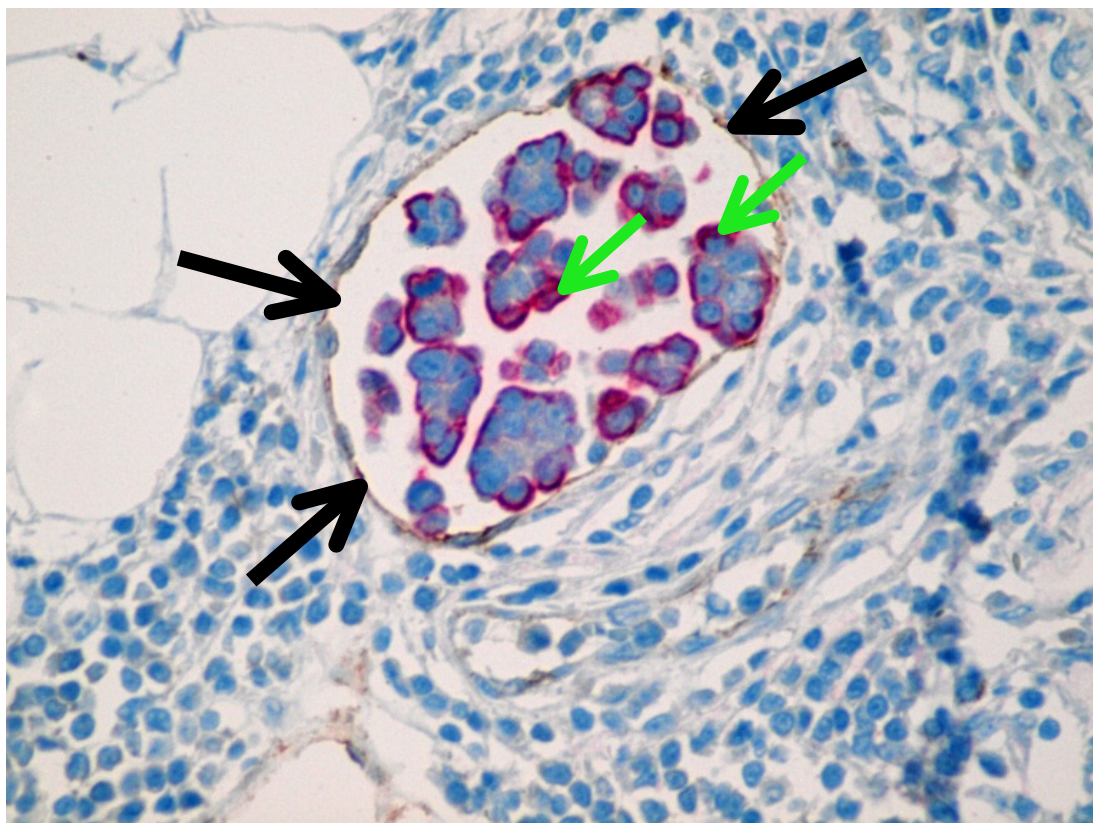


11. ábra. Az egy antitest komponensű IHC reakciók közül, az α -SMA immunreaktivitás (barna színreakció) észlelhető, a nyirokér falban lévő simaizomsejtekben (nyilak), ill. az intravasalis α -SMA negatív rákembolus. IHC., 400x.



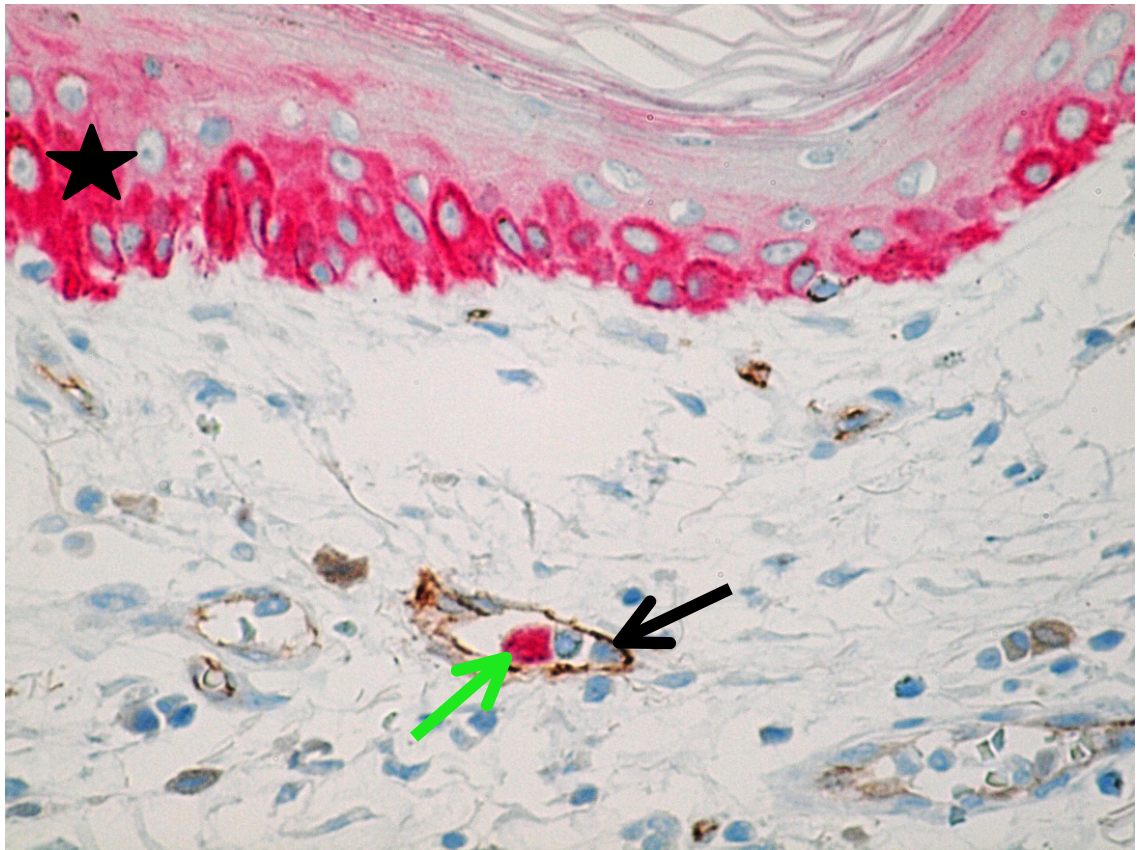
12. ábra. Az egy antitest komponensű IHC reakciók közül, a pancytokeratin immunreaktivitás észlelhető (barna színreakció), a nyirokérben sodródó rákembolusban (nyíl). IHC., 400x.

A kettős immunfestések során azt tapasztaltuk, hogy a *peroxidáz/DAB alapú claudin-5 és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin kettős immunhisztokémia* adta a legelfogadhatóbb morfológiai segítséget a peritumoralis nyirokér tumorterheltségének detektálása során. Ennek során a nem destruált lymphaticus endothel intenzív claudin-5 reaktivitása (barna linearis elszíneződése) és a nyirokérben sodródó ráksejtek intenzív, pancytokeratin cytoplasmaticus pozitivitása (püspöklila elszíneződése) volt egyidejűleg észlelhető (**13. ábra**).



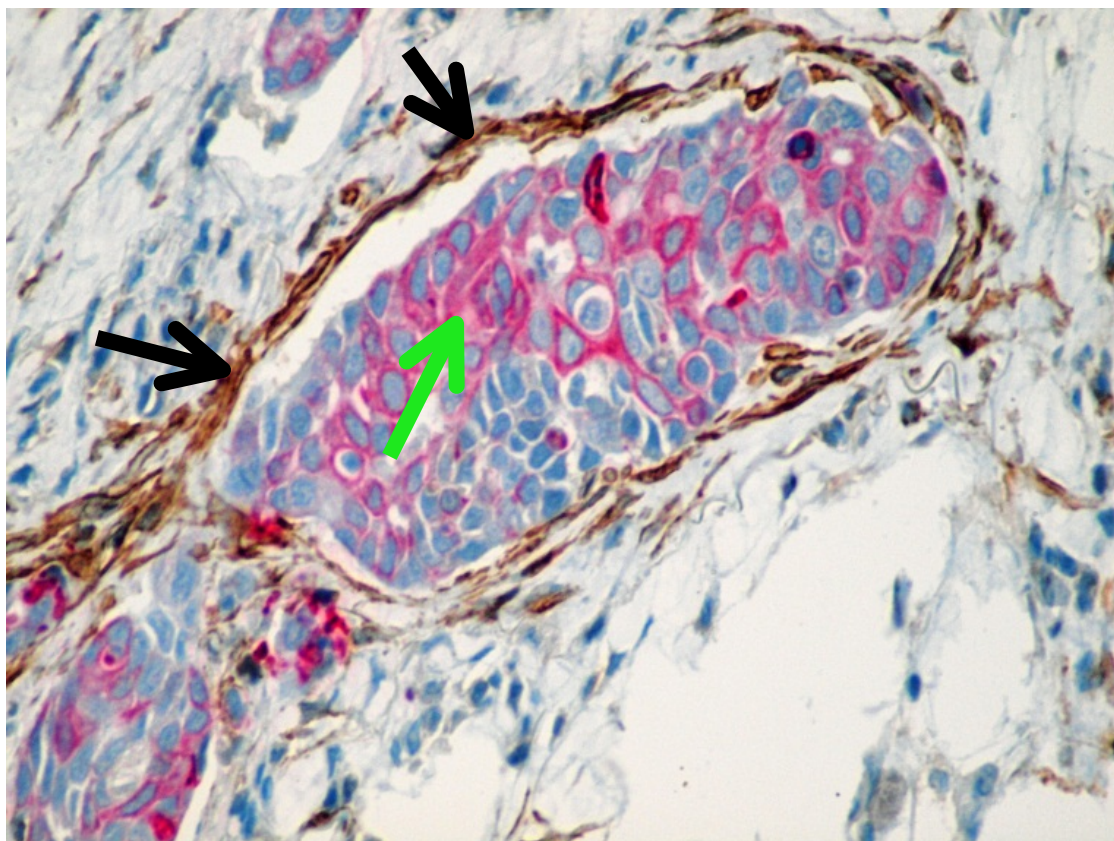
13. ábra. A képen a *peroxidáz/DAB alapú claudin-5 és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin kettős immunfestés* eredménye látható. A nyirokér endothel intenzív claudin-5 pozitivitást (barna színreakciót) adott (fekete nyilak), míg a benne sodródó tumorembolusok intenzív pancytokeratin cytoplasmaticus pozitivitást (püspöklila színreakciót) adtak (zöld nyilak). IHC., 400x.

A *peroxidáz/DAB alapú claudin-5 és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin kettős immunhisztokémia* a kisméretű peritumoralis ereket és a bennük sodródó unicellularis- és oligocellularis ráksejtembolusokat is egyértelműen jelezte. Az intact felszíni hámréteg megbízható pancytokeratin belső kontrollként volt hasznosítható (**14. ábra**).



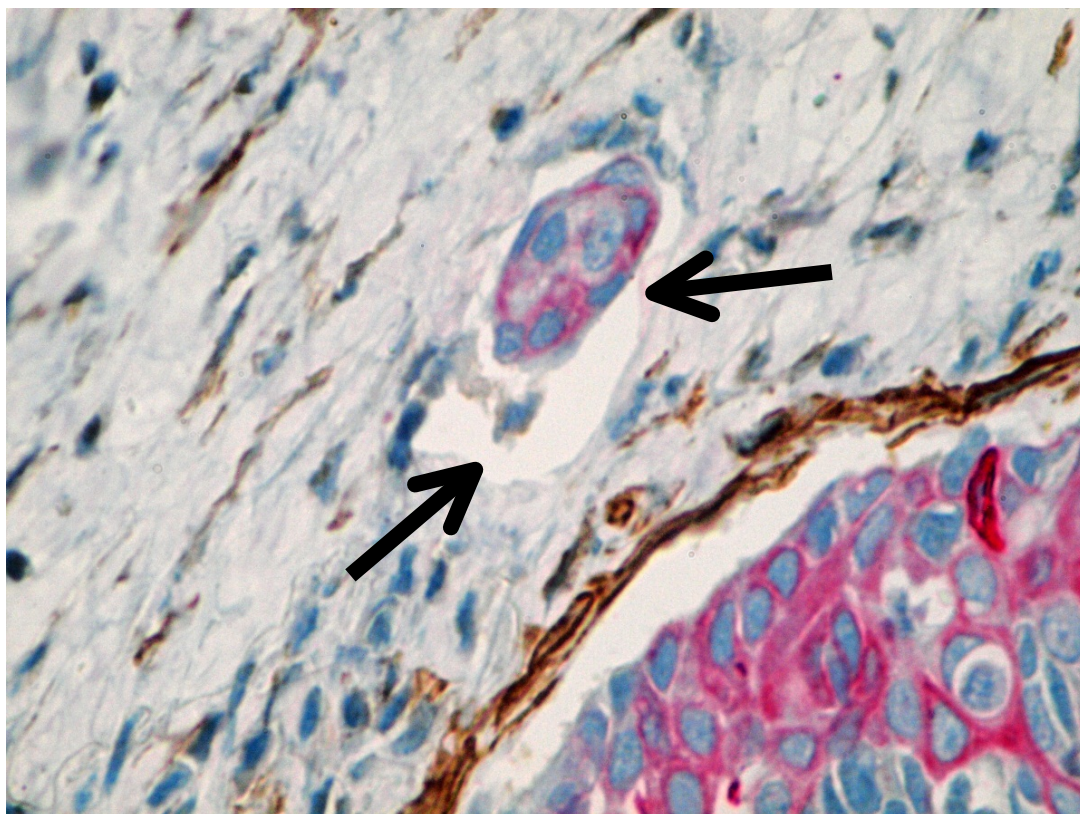
14. ábra. A képen a *peroxidáz/DAB alapú claudin-5 és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin kettős immunfestés* eredménye látható. A kisméretű nyirokér endothel intenzív claudin-5 pozitivitást (barna színreakciót) adott (fekete nyíl), ill. a benne sodródó ráksejt (unicellularis tumorembolus) intenzív pancytokeratin cytoplasmaticus pozitivitást (püspöklila színreakciót) mutat (zöld nyíl). Csillaggal jelölve a megbízható pancytokeratin belső pozitív kontrollt adó, intact felszíni hám. IHC., 400x.

A *peroxidáz/DAB alapú α -SMA és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin kettős immunhisztokémia* szintén intenzív, jól értékelhető jeleket adott, de nem volt egyértelműen eldönthető minden esetben, hogy a tumorsejtek körüli α -SMA-pozitivitás (barna színreakció) a peritumoralis nyirokérfali simaizomsejtektől, vagy az emlőmirigy-carcinoma sejtek közvetlen környezetében indukálódott stromalis myofibroblastoktól eredt-e (**15. ábra**).



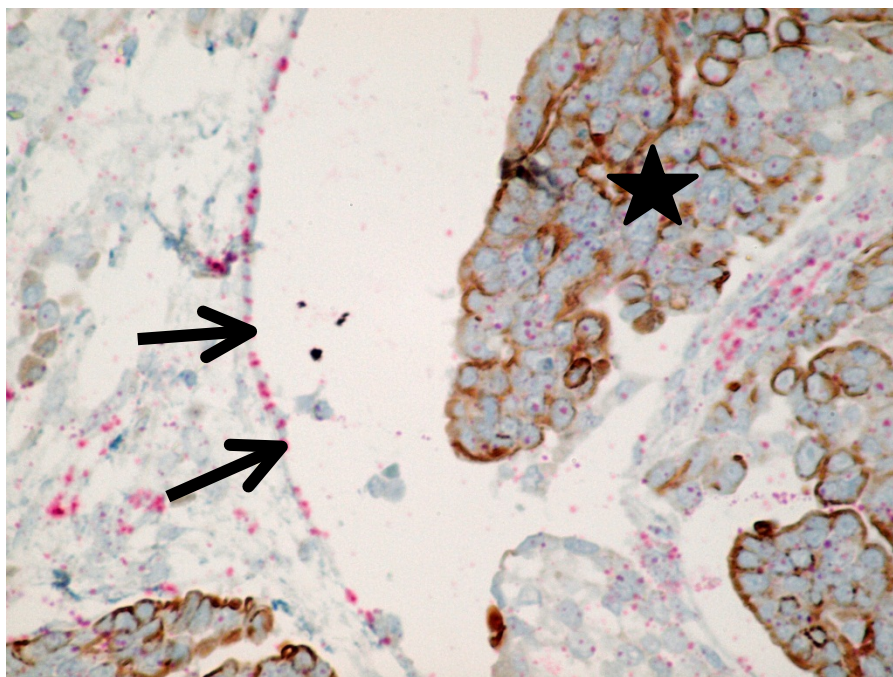
15. ábra. A képen a *peroxidáz/DAB alapú α -SMA és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin kettős immunfestés* eredménye látható. A peritumoralis nyirokérfa li simaizomsejtekben intenzív α -SMA pozitivitás (barna színreakciót) látható (fekete nyilak), ill. a benne sodródó ráksejtek (multicellularis tumorembolus) intenzív pancytokeratin cytoplasmaticus pozitivitást (püspöklila színreakciót) mutat (zöld nyíl). IHC., 400x.

A *peroxidáz/DAB alapú α -SMA és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin kettős immunhisztokémia* során a kisméretű nyirokkapillárisok falában, a simaizomsejtek hiánya miatt, nem volt érzékelhető α -SMA pozitivitás (**16. ábra**).

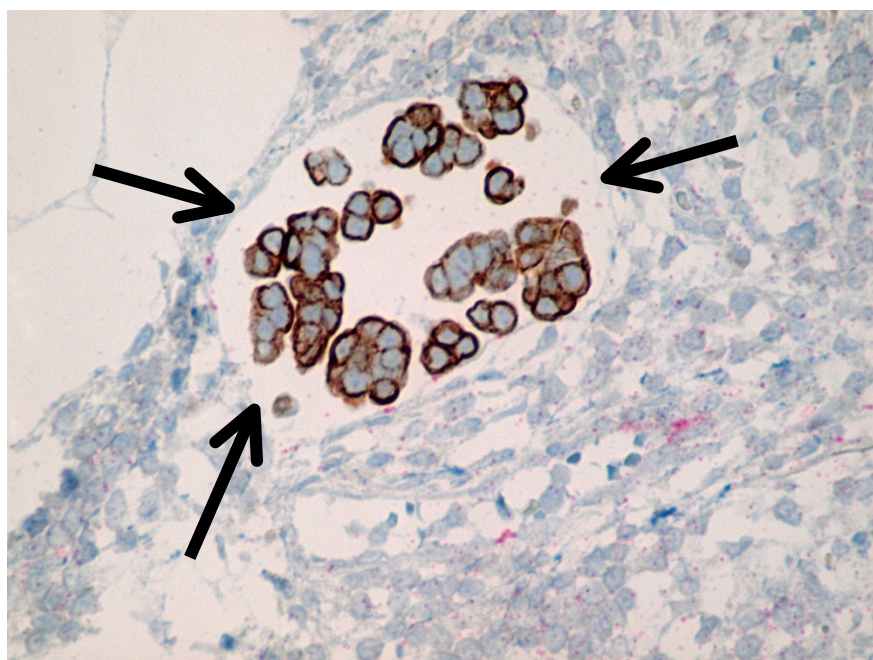


16. ábra. A képen a *peroxidáz/DAB alapú α -SMA és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin kettős immunfestés* eredménye látható. A peritumoralis kisméretű nyirokcapilláris falában, a simaizomsejtek hiánya miatt, α -SMA negativitás észlelhető (fekete nyilak). A kép jobb alsó sarkában a 15. kép részlete észlelhető, α -SMA pozitív (barna) nyirokérfallal és pancytokeratin pozitív (püspöklila) rákembolussal. IHC., 600x.

A *peroxidáz/DAB alapú pancytokeratin és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú claudin-5*, valamint a *peroxidáz/DAB alapú pancytokeratin és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú α -SMA kettős immunhisztokémiai* reakciók során nem tapasztaltunk, vagy gyenge jelet tapasztaltunk a claudin-5 és az α -SMA immunreaktivitások esetében (17-18. ábrák). A *peroxidáz/DAB alapú pancytokeratin és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú claudin-5 kettős immunfestés* során az intact erek endotheliuma a claudin-5 szempontjából, ill. a felszíni hám és az intact peritumoralis lobulusok luminalis hámsejtjei a pancytokeratin szempontjából bizonyultak megbízható belső pozitív kontrollnak (19. ábra).

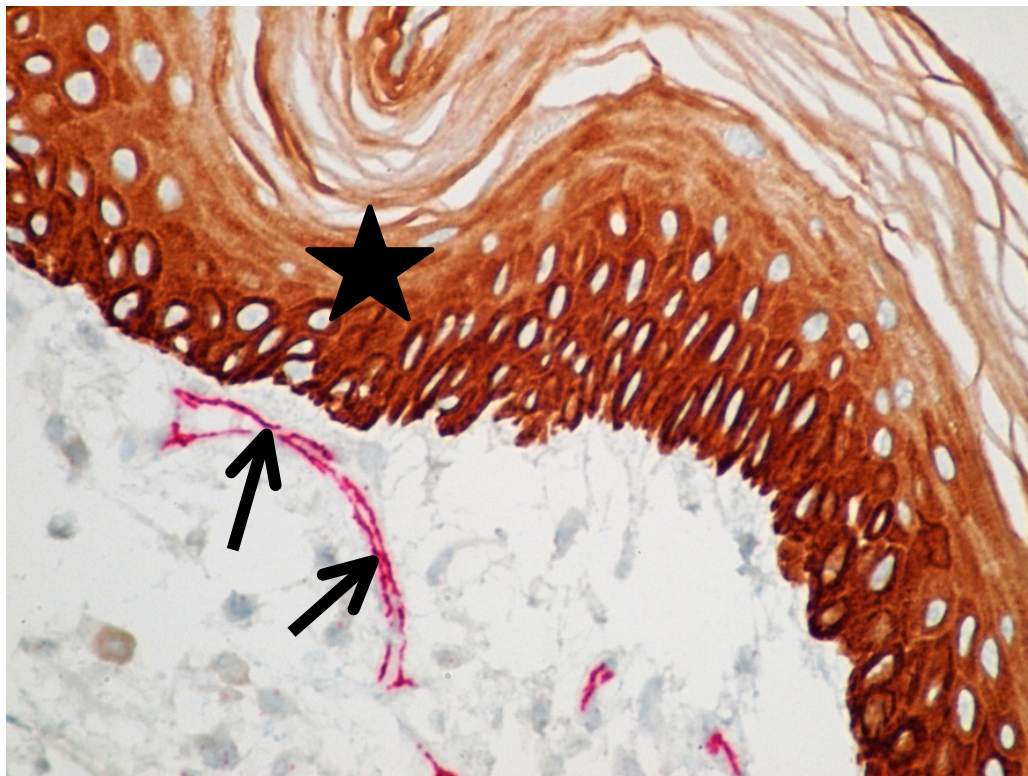


17. ábra. A képen a *peroxidáz/DAB alapú pancytokeratin és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú claudin-5 kettős immunfestés* eredménye látható. A peritumoralis nagyméretű nyirokér endothelben gyenge claudin-5 immunreaktivitás (püspöklila elszíneződés) észlelhető (fekete nyilak), ill. a tumorembolusokban perifériás pancytokeratin pozitivitás (barna színreakció) látható (csillag). IHC., 400x.



18. ábra. A képen a *peroxidáz/DAB alapú pancytokeratin és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú claudin-5 kettős immunfestés* eredménye látható. A peritumoralis kisméretű nyirokér endothelben hiányzik claudin-5 immunreaktivitás (püspöklila elszíneződés) (fekete nyilak),

ill. a tumorembolusokban intenzív pancytokeratin pozitivitás (barna színreakció) látható.
IHC., 400x.



19. ábra. A *peroxidáz/DAB alapú pancytokeratin és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú claudin-5 kettős immunfestés* megbízható pancytokeratin belső pozitív kontrollnak bizonyult az intact felszíni hám (csillag), ill. megbízható claudin-5 belső pozitív kontrollnak bizonyult az intact erek endothelje (nyilak). IHC., 400x.

5. MEGBESZÉLÉS

Az immunhisztokémiai reakciók csak megalapozott kórszövettani tudás esetén hasznosulhatnak a pathológiai diagnosztikában. A vizsgálónak alapvetően ismernie kell az általa használt antitestek indikációs területét, antigén specificitását, szenzitivitását, lehetséges keresztreakcióit és diagnosztikus specificitását, mert csak így biztosítható megfelelően a biztonságos alkalmazás. Megfelelő tapasztalattal kell rendelkeznie az álpozitív, vagy az álnegatív reakció termékek felismerésére (KRUTSAY, 1999; MASON, és GATTER, 1987; MIETTINEN, 1993). Az immunhisztokémiai reakciók értékelésekor tisztában kell lenni azzal, hogy az adott reakció a sejt melyik alkotóelemében alakul ki. Vannak cytoplasmaticus, a magra, a membránra lokalizálódó reakciók, ill. ezek kombináció (különösen daganatok esetén) (MASON, és GATTER, 1987; MIETTINEN, 1993). Jelen vizsgálatunk során az anti-claudin-5 az endothelsejtek membránjában-, az anti- α -SMA a simaizomsejtek, a myofibroblastok cytoplasmájában-, ill. az anti-pancytokeratin a ráksejtek cytoplasmájában expresszáldott.

A kutyák emlődaganatainak kiemelten fontos prognosztikus jellemzője a peritumoralis/pericarcinomatosis terület lymphogen- és/vagy haematogen inváziója, az intravasálódott (érbetört) tumorsejtek jelenléte, valamint a peritumoralis tumor-indukálta myofibroblastok, ezért esszenciális minden kórszövettani technikai segítség, amellyel közelebb kerülünk a korrekt, teljes értékű definitív diagnózishoz, így segítve a további gyógykezelési eljárásokat. A kórszövettani vizsgálatok során számos objektív és szubjektív hibaforrás merülhet fel. Ezeket a pontatlan, ezáltal a gyakorlatban nem legalizálható kórszövettani diagnosztikai véleményhez vezető tényezőket a modern pathológiai vizsgálati módszer, az immunhisztokémia képes kiküszöbölni és helyes mederbe sodorni a diagnosztikai algoritmust és a ráalapozott prognosztikát.

A korábbi hazai tanulmányokban leírták, hogy a kórszövettani analízisre küldött malignus hámeredetű emlőmirigy-daganatok rutin, haematoxylinnal és eosinnal festett metszeteinek fénymikroszkópos vizsgálata esetén gyakorta tapasztalható hisztotechnikai műtermékként észlelhető, hogy az egyes daganatos sejtfészkek leválnak az őket közvetlenül körülölelő daganat stromáról (kötőszöveti vázról), s így a tumor és a kötőszövet között kialakult, artefactualis hézag a vizsgálóban azt a benyomást keltheti, hogy a daganatsejtek egy kitágult nyirokér átmetszetében láthatók. Ilyen esetben az anti-claudin-5 immunhisztokémiai vizsgálat

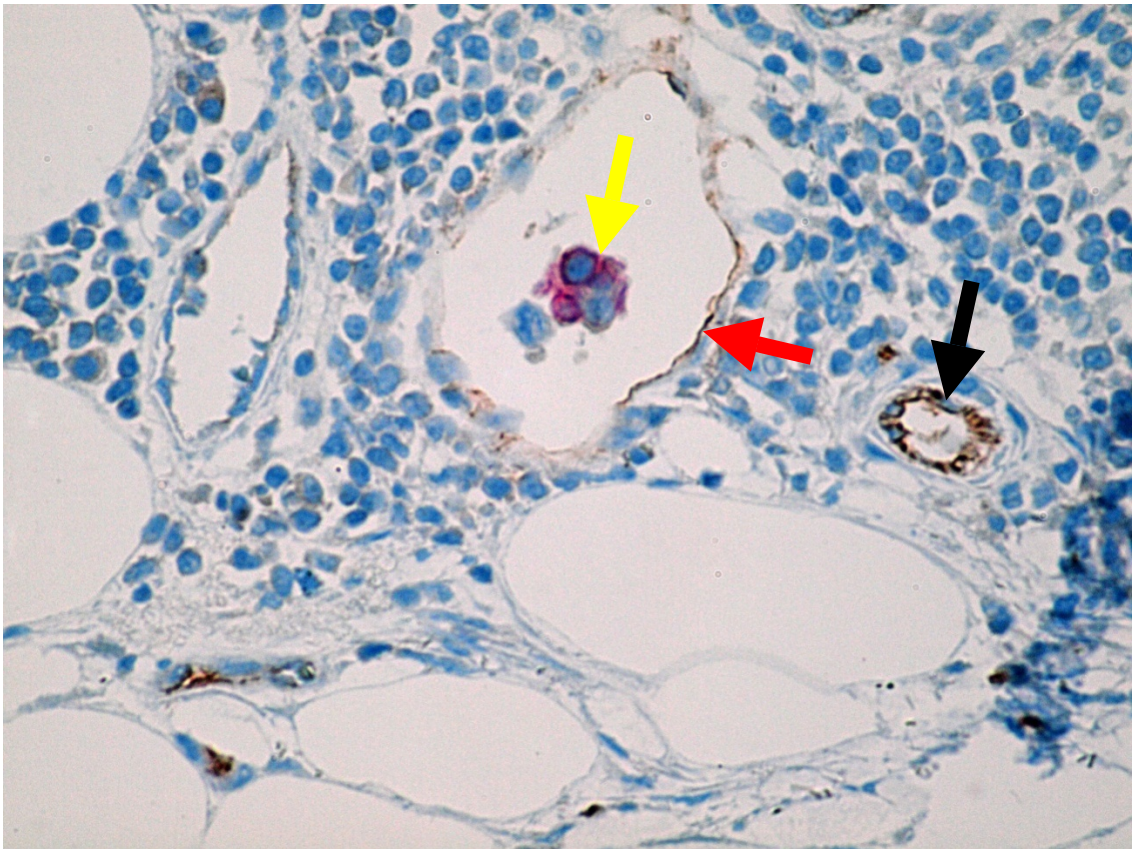
egyértelműen kimutatja az endothelsejtek jelenlétét, ill. kizárja a lymphogen inváziót (JAKAB, et al., 2008).

A korábbi vizsgálatok eredményei szerint, a kutyák benignus, ill. malignus primaer emlőmirigy-daganatainak állományában lévő nyirok-és vérerek endothelsejtjei is claudin-5 reaktivitást mutatnak (JAKAB, et al., 2008).

A gyakorló állatorvos számára a legfontosabb prognosztikai információt, a kutyából sebészileg kimetszett emlőmirigy-rák peritumoralis nyirokérinvasiójának megállapítása, ill. kizárása. A patológus diagnosztizálta ezt, a haematoxylin és eosin alapú metszetek mellett, a jóval megbízhatóbb véleményt biztosító immunhisztokémia segítségével detektálhatja. Jelen munkánk során, morfológiai felvételekkel illusztrálva mutattunk rá, hogy az egy komponensű (egy antitesttel dolgozó) indirekt immunhisztokémiai módszer nem 100%-os eredményességű a peritumoralis nyirokér tumorembolusok feltüntetésére. Az egy komponensű claudin-5 immunfestés feltünteti a lymphaticus endothelt, de csak a tumorsejtek által nem destruált endothel felszínen ad pozitív immunreakciót, ill. a benne sodródó tumorembolus (ami lehet oligocellularis, valamint unicellularis) természetéről nem nyújt egyidejűleg felvilágosítást. Az egysejtes embolusok esetén ki kell zárni az intravascularis aktiválódott immunsejtek jelenlétét. Az egy komponensű pancytokeratin immunreakció egyértelműen segít a ráksejt/ráksejtek feltüntetésében, de nem tudjuk az artefactualis szöveti retractio kompenzálására felhasználni. Az α -SMA a kisméretű nyirokereket, nyirokkapillárisokat nem tünteti fel, mivel azok falában nincsenek simaizomsejtek, ezért egy komponensű immunfestése nem megbízható. Jelen munkánkban az előbb leírt, az egy komponensű immunfestések során tapasztalt hiányosságok kiküszöbölése érdekében kettős immunfestési eljárásokat alkalmaztunk.

A kettős immunfestések során azt tapasztaltuk, hogy a ***peroxidáz/DAB alapú claudin-5 és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin kettős immunhisztokémia*** adta a legelfogadhatóbb morfológiai segítséget a peritumoralis nyirokér tumorterheltségének detektálása során. Ennek során a nem destruált lymphaticus endothel intenzív claudin-5 reaktivitása (barna lineáris elszíneződése) és a nyirokérben sodródó ráksejtek intenzív, pancytokeratin cytoplasmaticus pozitivitása (püspöklila elszíneződése) volt egyidejűleg észlelhető (**20. ábra**). A kisméretű peritumoralis ereket és a bennük sodródó unicellularis-, és oligocellularis ráksejtembolusokat is egyértelműen jelezte, amelyek a hétköznapi rutin haematoxylinál és eosinnal megfestett metszetekben elkerülhetik a vizsgáló histopathologus

figyelmét. Az intact felszíni hámréteg megbízható pancytokeratin belső kontrollként volt hasznosítható.



20. ábra. *Peroxidáz/DAB alapú claudin-5 és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin kettős immunhisztokémiai reakció* kutya peritumoralis nyirokerében és a benne sodródó ráksejtembolusban. Fekete nyíl jelzi a claudin-5 belső pozitív kontrollt (intact kis artéria), piros nyíl jelzi a lymphaticus nem destruált endothelt, ill. a sárga nyíl a tumorembolust. IHC., 400x.

A többi kettős festési kombináció során bizonyos esetekben nem volt egyértelműen eldönthető, hogy a tumorsejtek körüli α -SMA-pozitivitás (barna színreakció) a peritumoralis nyirokérfali simaizomsejtektől, vagy az emlőmirigy-carcinoma sejtek közvetlen környezetében indukálódott stromalis myofibroblastoktól eredt-e, ill. a kisméretű nyirokkapillárisok falában, a simaizomsejtek hiánya miatt, nem volt érzékelhető α -SMA pozitivitás. Bizonyos esetekben gyenge jelet tapasztaltunk az immunreaktivitások során [peroxidáz/DAB alapú pancytokeratin és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú claudin-5, valamint a peroxidáz/DAB alapú pancytokeratin és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú α -SMA kettős immunhisztokémiai reakció].

Eredményeink alapján egyértelműen kimondhatjuk, hogy a peroxidáz/DAB alapú claudin-5 és alkalikus foszfátáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin kettős immunhisztokémiai reakció javasolt az igényes, megalapozott állatorvosi sebészi pathológiai munka kivitelezéséhez.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A kutyák emlőmirigy-carcinomáinak peritumoralis területe számos prognosztikai információt rejt magában. Ezek egyik legfontosabb eleme, a pericarcinomatous nyirokerek állapota, tumoros intravasatiója. Molekuláris pathológiai kutatásunkhoz a SZIE-ÁOTK Patológiai Tanszékének tumorbankjából szelektáltunk 16 emlőmirigy-carcinoma mintát, amelyből 12 rendelkezett peritumoralis nyirokér intravasatio jeleivel. Munkánk során kettős immunhisztokémiai festéseket használtunk fel a peritumoralis, tumorembolusokkal terhelt nyirokerek morfológiai leképezése érdekében, a következő kombinációkban: (a) peroxidáz/DAB alapú claudin-5 és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin; (b) peroxidáz/DAB alapú α -SMA és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin; (c) peroxidáz/DAB alapú pancytokeratin és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú claudin-5; és (d) peroxidáz/DAB alapú pancytokeratin és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú α -SMA kettős immunfestés. Ezek közül a kisméretű és nagyobb méretű peritumoralis nyirokerek és a bennük sodródó unicellularis-, és multicellularis rákembolusok detektálására leginkább a peroxidáz/DAB alapú claudin-5 és alkalikus foszfatáz/(NT/BCIP) alapú pancytokeratin kettős immunfestés vált be. Az általa tapasztalt nyirokér endothel claudin-5 pozitivitás (barna színreakció) és a pancytokeratin emlőmirigy-carcinoma embolus pozitivitás (püspöklila színreakció) egyértelműen segített a formaldehid oldat alapú, szöveti retractio okozta műtermékektől való differenciálásban.

7. SUMMARY

The peritumoral area of the mammary gland carcinomas of the dog contains several prognostic signs. The tumorous intravasation of pericarcinomatous lymph vessels is considered to be the most important element. 16 mammary gland carcinoma samples have been selected from the tumor bank of the Pathology Institute of SzIE-ÁOTK, from which 12 have been showing signs of intravasation of peritumoral lymph vessels. During the experiment double immunohistochemic staining has been used for imaging the tumorembolic affected peritumoral lymph vessels in the following combinations: (a) peroxidase/DAB based claudin-5 and alkaline phosphatase/(NT/BCIP) based pancytokeratin; (b) peroxidase/DAB based α -SMA and alkaline phosphatase/(NT/BCIP) based pancytokeratin; (c) peroxidase/DAB based pancytokeratin and alkaline phosphatase/(NT/BCIP) based claudin-5; (d) peroxidase/DAB based pancytokeratin and alkaline phosphatase/(NT/BCIP) based α -SMA double immunostaining. For detection of small and large peritumoral lymph vessels and tumorous embolus the peroxidase/DAB based claudin-5 and alkaline phosphatase/(NT/BCIP) based pancytokeratin double staining has been the most successful. The experienced claudin-5 positivity of the lymph endothel (brown colouring) and the pancytokeratin mammary gland tumor embolus positivity (purple colouring) obviously helped the differentiation of tissue retraction of formaldehyde origin.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt szeretném megköszönni témavezetőmnek **Dr. Jakab Csabának** a felajánlott témát, a sok közös kutatást és munkát, mely során sok, a jövőben is használható tudással gazdagodtam.

Köszönöm **Prof. Dr. Rusvai Miklósnak** a Patológiai Tanszék tanszékvezetőjének, hogy engedélyével hozzájárult a tanszéken készített TDK munkámhoz.

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik munkájukkal és tanácsaikkal segítettek jelen dolgozat elkészítését: **Pekár Magdolnának** és **Gregor Viktóriának**, akik az immunhisztokémiai vizsgálatokban adtak nélkülözhetetlen segítséget, ill. **Pop Renátának** aki a kórszövettani metszetek elkészítésében, festésében segített nekünk.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- A. CHOMETTE, G., AURIOL, M., TRANBALOC, P., BLONDON, J.: Stromal changes in early invasive breast carcinoma. An immunohistochemical, histoenzymological and ultrastructural study. *Pathol. Res. Pract.*, 1990. 186. 70-79.
- B. DELELLIS, R. A., DAYAL, Y.: The role of immunohistochemistry in the diagnosis of poorly differentiated malignant neoplasms. *Semin. Oncol.*, 1987. 14. 173-192.
- C. DORN, C. R., TAYLOR, D. O. N., FRYE, F. L., HIBBARD H. H.: Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California I. Methodology and description of cases. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1968. 40. 295-305.
- D. ELSE, R. W., AND HANNANT, D.: Some epidemiological aspects of mammary neoplasia in the bitch. *Vet Rec* 1979. 194:296-304.
- E. FEHÉR GY.: A háziállatok funkcionális anatómiája III. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1980. pp: 735-741.
- F. GARTNER, F., GERALDES, M., CASSALI, G., REMA, A., SCHMITT, F.: DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells. *Vet J.*, 1999. 158. 39-47.
- G. GNERLICH, J. L., YAO, K. A., FITCHEV, P. S., GOLDSCHMIDT, R. A., BOND, M. C., CORNWELL, M., CRAWFORD, S. E.: Peritumoral Expression of Adipokines and Fatty Acids in Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2013. Sep 20. [Epub ahead of print]
- H. GONZALEZ-MARISCAL, L. - AVILA, F. A. - BETANZOS, A.: The relationship between structure and function of tight junctions. In *Tight Junctions* 2nd edition. Edited by: Cereijido M, Anderson JM. Boca Raton, FL: CRC Press, 2001. pp: 89-119.
- I. GUZSAL E.: Háziállatok szövettana. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1981. pp: 343-351.
- J. HAYES, H.M., MILNE, K.L., AND MANDELL, C.P.: Epidemiological studies of feline mammary carcinoma. *Vet Rec* 1981. 108:476-479.
- K. Hayes, A.A., and Mooney, S.: Feline mammary tumors. *Vet Clin N Amer* 1985. 15:513-520.
- L. JAKAB CS.: BIOPSZIA – Előadás – Kisállatgyógyászati Szakképzés, 2012, Budapest, SZIE-ÁOTK

- M. JAKAB, CS., HALÁSZ, J., SZÁSZ, A. M., BATMUNKH, E., KISS, A., SCHAFF, ZS., RUSVAI, M., GÁLFI, P., KULKA, J.: Expression and localistaion of claudin-1,-2, -3, -4, -5, -7, and -10 proteins in the normal canine mammary gland. *Acta Vet. Hung.*, 2008. 56. 341-352.
- N. JAKAB, CS., HALÁSZ, J., KISS,A., SCHAFF, ZS., SZÁSZ, A. M., RUSVAI, M., TÓTH, ZS. A., KULKA, J.: Evaluation of microvessel density (MVD) in canine mammary tumours by quantitative claudin-5 molecule immunohistochemistry. *Acta Vet. Hung.*, 2008. 56. 495-510.
- O. JAKAB, CS., HALÁSZ, J., SZÁSZ, A. M., KISS, A., SCHAFF, ZS., RUSVAI, M., GÁLFI, P., KULKA, J.: Expression of claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -7 proteins in benign and malignant canine mammary gland epithelial tumours. *J. Comp.Pathol.*, 2008. 139. 238-245.
- P. JAKAB CS., HALÁSZ J., KISS A., SCHAFF ZS., PEKÁR M., SZABÁRA Á., KULKA J.: Claudin-5 fehérje expressziójának vizsgálata kutyák emlőmirigyeinek és emlőcarcinomáinak nyirokér endothelsejtjein immunhisztokémiai módszerrel. *MÁL.*, 2008. 130. 296-303.
- Q. JAKAB, CS., HALÁSZ, J., KISS, A., SCHAFF, ZS., RUSVAI, M., GÁLFI, P., KULKA, J.: Claudin-5 protein is a new differential marker for histopathological differential diagnosis of canine hemangiosarcoma. *Histol. Histopathol.*, 2009. 24. 801-813.
- R. JAKAB, CS., JERZSELE, Á., SZABÁRA, Á.: A kutyák emlőrákjának őrszem (sentinel) nyirokcsomó áttéteinek vizsgálata pancytokeratin segítségével. *MÁL.*, 2010. 132. 163-170.
- S. JAKAB CS., RUSVAI M., GÁLFI P., SZABÓ Z., CSÉBI P., SZABÁRA Á., KULKA J.: Kutya lipidizált emlőrák nyirokérinváziójának vizsgálata claudin-5 és CD31 markerekkel. *MÁL.*, 2009. 131. 610-619.
- T. JITPEAN S, HAGMAN R, STRÖM HOLST B, HÖGLUND OV, PETTERSSON A, EGENVALL A.: Breed variations in the incidence of pyometra and mammary tumours in Swedish dogs. Department of Clinical Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. - *Reprod Domest Anim.* 2012 Dec; 47 Suppl 6:347-50. doi: 10.1111/rda.12103.
- U. KRUTSAY M.: Patológai technika. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 1999. pp: 279-286.
- V. LACROIX-TRIKI, M., MERY, E., VOIGT, J. J., ISTIER, L., ROCHAIX, P.: Value of cytokeratin 5/6 immunostaining using D5/16 B4 antibody in the spectrum of

- proliferative intraepithelial lesions of the breast. A comparative study with 34bE12 antibody. *Virchows Arch.*, 2003. 442. 548–554.
- W. MASON, D.Y. - GATTER, K.C.: The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology. *J. Clin. Pathol.*, 1987. 40. 1042-1054.
- X. MISDROP, W. - ELSE, W. - HELLMEN, E. - LIPSCOMB, T. P. (szerk.: SCHULMAN, F. Y.): Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. In: World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. AFIP, Washington DC, 1999. 2nd series, vol7, pp: 1–59.
- Y. MITCHELL, L., DELA IGLESIA, F. A., WENKOFF, M. S., VAN DREUMEL, A. A., LUMB, G.: Mammary tumors in dogs: survey of clinical and pathological characteristics. *Can. Vet. J.*, 1974. 5. 131-138.
- Z. MEUTON, D. J.: Tumors in Domestic Animals. Iowa State Press. Ames, 2002. pp: 575-589.
- AA. MOULTON, JE.: (szerk.: MOULTON, JE.) Tumors in domestic animals. University of California Press, London, 1990. pp: 518-552.
- BB. PHILIBERT, J. C., SNYDER, P. W., GLICKMAN, N., GLICKMAN, L. T., KNAPP, D. W., WATERS, D. J.: Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J Vet Intern Med.*, 2003. 17. 102-106.
- CC. REJTHAR, A. – VOJTESEK, B. (szerk.: REJTHAR, A., VOJTESEK, B.): Obecná patologie nádorového rustu. Grada Publishing, Prága, 2002. pp:15-104.
- DD. RÖCHLICH, P.: Szövettan, Harmadik, átdolgozott és bővített kiadás, 2006, pp18-21
- EE. RØNNOV-JESSEN, L., PETERSEN, O. W.: Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab. Invest.*, 1993.68. 696-707.
- FF. RØNNOV-JESSEN, L., VAN DEURS, B., NIELSEN, M., PETERSEN, O. W.: Identification, paracrine generation, and possible function of human breast carcinoma myofibroblasts in culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 1992.4. 273-283.
- GG. SCHNEIDER, R., DORN, C. R., TAYLOR, D. O. N.: Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1969. 43. 1249-1261.
- HH. ZATLOUKAL, J., LORENZOVÁ, J., TICHY, F., NECAS, A., KECOVÁ, H., KOHOUT, P.: Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Vet. Brno*, 2005. 74. 103-109.

- II. ZHAO, Y. C., NI, X. J., LI, Y., DAI, M., YUAN, Z. X., ZHU, Y. Y., LUO, C. Y.: Peritumoral lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor C and D promotes lymph node metastasis in breast cancer patients. *World J. Surg. Oncol.*, 2012. 10:165. doi: 10.1186/1477-7819-10-165.