



Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Ivana Mihoković Buhin

**EKSPRESIJA RAS-GAP I NECTIN-4
PROTEINA U KARCINOMIMA MLIJEČNE
ŽLIJEZDE KUJA S NAGLASKOM NA
TROSTRUKO NEGATIVNE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

Ivana Mihoković Buhin

**EXPRESSION OF RAS-GAP AND NECTIN-4
PROTEINS IN CANINE MAMMARY GLAND
CARCINOMAS, WITH EMPHASIS ON
TRIPLE-NEGATIVE CARCINOMAS**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Ivana Mihoković Buhin

**EKSPRESIJA RAS-GAP I NECTIN-4
PROTEINA U KARCINOMIMA MLIJEČNE
ŽLIJEZDE KUJA S NAGLASKOM NA
TROSTRUKO NEGATIVNE**

DOKTORSKI RAD

Mentorice:

prof. dr. sc. Andrea Gudan Kurilj

izv. prof. dr. sc. Kristina Starčević

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

Ivana Mihoković Buhin

**EXPRESSION OF RAS-GAP AND NECTIN-4
PROTEINS IN CANINE MAMMARY GLAND
CARCINOMAS, WITH EMPHASIS ON
TRIPLE-NEGATIVE CARCINOMAS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Full Prof. Andrea Gudan Kurilj

Assoc. Prof. Kristina Starčević

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

IZJAVA

Ja, Ivana Mihoković Buhin, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima od onih navedenih u radu.

(potpis studenta)

Zagreb, 2026.

Doktorska disertacija izrađena je u Zavodu za veterinarsku patologiju i Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Andree Gudan Kurilj, PhD, Dipl. ECVP i izv. prof. dr. sc. Kristine Starčević. Istraživanje je provedeno kao dio istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Lipidi hrane, spol i dob u patogenezi metaboličkog sindroma“, voditeljice izv. prof. dr. sc. Kristine Starčević (IP-06-2016-3163).

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	3
2.1. RAZVOJ, ANATOMIJA I HISTOLOGIJA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA.....	3
2.2. TUMORI MLIJEČNE ŽLIJEZDE PASA.....	5
2.2.1. Opća obilježja.....	5
2.2.2. Epidemiologija i čimbenici rizika	6
2.2.3. Patogeneza.....	10
2.3. KLASIFIKACIJA TUMORA MLIJEČNE ŽLIJEZDE U PASA.....	15
2.3.1. Histološka klasifikacija	15
2.3.2. Histopatološko stupnjevanje karcinoma.....	16
2.3.3. Molekularna klasifikacija karcinoma mliječne žlijezde kuja prema klasifikaciji humanog karcinoma dojke	16
2.4. TROSTRUKO NEGATIVNI KARCINOMI.....	18
2.4.1. Razvoj imunohistokemijske klasifikacije trostruko negativnih karcinoma mliječne žlijezde kuja.....	18
2.4.2. Suvremene spoznaje o molekularnim obilježjima	20
2.4.3. Novi molekularni biljezi.....	21
2.5. RAS SIGNALIZACIJA I PROTEIN RASAL2	22
2.5.1. Signalni put RAS.....	22
2.5.2. Regulacija aktivnosti proteina RAS	22
2.5.3. Uloga proteina RASAL2 u nastanku i progresiji malignih tumora.....	23
2.5.4. Protein RASAL2 u trostruko negativnim karcinomima dojke.....	24
2.6. Protein NECTIN-4	25
2.6.1. Građa, fiziološka ekspresija i biološka uloga.....	25
2.6.2. Uloga u nastanku i progresiji malignih tumora	25
2.6.3. Protein NECTIN-4 u karcinomu dojke	25
2.6.4. Protein NECTIN-4 u pasa i njegova ekspresija u tumorima mliječne žlijezde kuja	26
2.7. KARCINOMI MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA KAO SPONTANI TRANSLACIJSKI MODEL ZA ISTRAŽIVANJE KARCINOMA DOJKE U LJUDI	28
3. OBRAZLOŽENJE TEME	30
4. MATERIJALI I METODE	31
4.1. UZORKOVANJE KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA	31

4.2. PRIKUPLJANJE PODATAKA O ŽIVOTINJAMA	32
4.3. HISTOPATOLOŠKA PRETRAGA	33
4.4. IMUNOHISTOKEMIJSKA PRETRAGA UZORAKA IZ PARAFINSKIH BLOKOVA	35
4.4.1. Metode bojenja	38
4.4.2. Stupnjevanje imunohistokemijske reakcije	39
4.5. ODREĐIVANJE EKSPRESIJE GENA U UZORCIMA KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA	41
4.5.1. Izdvajanje ukupne RNA	41
4.5.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR)	41
4.6. STATISTIČKA ANALIZA	45
5. REZULTATI	47
5.1. DOBNA I PASMINSKA RASPODJELA TE KASTRACIJSKI STATUS KUJA	47
5.2. HISTOPATOLOŠKA OBILJEŽJA KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA ..	50
5.2.1. Zastupljenost histoloških tipova karcinoma	50
5.2.2. Zastupljenost histoloških stupnjeva malignosti karcinoma	56
5.2.3. Povezanost histološkog stupnja malignosti s biološkim ponašanjem karcinoma ..	58
5.3. IMUNOHISTOKEMIJSKA OBILJEŽJA KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA	60
5.3.1. Imunohistokemijska ekspresija ER, PR i HER2	60
5.3.2. Zastupljenost trostruko negativnih i ostalih karcinoma mliječne žlijezde	63
5.3.3. Udio trostruko negativnih u odnosu na ostale karcinome unutar histoloških stupnjeva malignosti	66
5.3.4. Biološko ponašanje trostruko negativnih i ostalih karcinoma mliječne žlijezde ...	66
5.4. IMUNOHISTOKEMIJSKA EKSPRESIJA PROTEINA RASAL2 U KARCINOMIMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA	67
5.4.1. Raspodjela ekspresije RASAL2 unutar kategorija	67
5.4.2. Ekspresija proteina RASAL2 prema histološkom tipu karcinoma	70
5.4.3. Ekspresija proteina RASAL2 prema histološkom stupnju malignosti	71
5.4.4. Ekspresija proteina RASAL2 u trostruko negativnim i ostalim karcinomima mliječne žlijezde	72
5.4.5. Povezanost ekspresije proteina RASAL2 s biološkim ponašanjem karcinoma	73
5.5. IMUNOHISTOKEMIJSKA EKSPRESIJA PROTEINA NECTIN-4 U KARCINOMIMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA	75
5.5.1. Raspodjela ekspresije unutar kategorija	75

5.5.2. Ekspresija proteina NECTIN-4 prema histološkom tipu karcinoma.....	78
5.5.3. Ekspresija proteina NECTIN-4 prema histološkom stupnju malignosti	79
5.5.4. Ekspresija proteina NECTIN-4 u trostruko negativnim i ostalim karcinomima mliječne žlijezde.....	79
5.5.5. Povezanost ekspresije proteina NECTIN-4 s biološkim ponašanjem karcinoma ..	80
5.6. REZULTATI RT-qPCR EKSPRESIJE GENA <i>RASAL2</i> I <i>NECTIN4</i> U UZORCIMA KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA.....	82
5.6.1. Relativna ekspresija gena <i>RASAL2</i>	82
5.6.2. Relativna ekspresija gena <i>NECTIN4</i>	83
6. RASPRAVA.....	86
6.1. DOB, PASMINA I KASTRACIJSKI STATUS KUJA.....	86
6.2. HISTOPATOLOŠKA OBILJEŽJA KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA ..	88
6.3. IMUNOHISTOKEMIJSKA OBILJEŽJA KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA.....	90
6.4. EKSPRESIJA PROTEINA RASAL2 I GENA <i>RASAL2</i> U KARCINOMIMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA	93
6.5. EKSPRESIJA PROTEINA NECTIN-4 I GENA <i>NECTIN4</i> U KARCINOMIMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA	96
6.6. KARCINOMI MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA – MODEL ZA TRANSLACIJSKA ISTRAŽIVANJA	99
7. ZAKLJUČCI	100
8. POPIS LITERATURE	101
9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNASTVENIH RADOVA	119

POPIS SLIKA

Slika 1. Grafički prikaz dobne raspodjele u istraživanih kuja.....	47
Slika 2. Grafički prikaz pasminske raspodjele unutar istraživane skupine.....	48
Slika 3. Grafički prikaz kastracijskog statusa u istraživanoj skupini	49
Slika 4. Grafički prikaz zastupljenosti histoloških tipova karcinoma mliječne žlijezde kuja ..	50
Slika 5. Složeni karcinom mliječne žlijezde, HE 20x	51
Slika 6. Tubularni karcinom mliječne žlijezde, HE 20x	51
Slika 7. Tubulopapilarni karcinom mliječne žlijezde, HE 20x	52
Slika 8. Solidni karcinom mliječne žlijezde, HE 20x	52
Slika 9. Mješoviti karcinom mliječne žlijezde, HE 20x.....	53
Slika 10. Komedokarcinom mliječne žlijezde, HE 20x	54
Slika 11. Karcinom stanica bogatih lipidima mliječne žlijezde, HE, 20x.....	54
Slika 12. Karcinom <i>in situ</i> mliječne žlijezde, HE 20x	55
Slika 13. Duktalni karcinom mliječne žlijezde, HE 20x	55
Slika 14. Grafički prikaz zastupljenosti histoloških stupnjeva malignosti karcinoma mliječne žlijezde kuja	56
Slika 15. Tubularni karcinom mliječne žlijezde (stupanj malignosti I), HE 40x.....	57
Slika 16. Složeni karcinom mliječne žlijezde (stupanj malignosti II), HE 40x	57
Slika 17. Složeni karcinom mliječne žlijezde (stupanj malignosti III), HE 40x	58
Slika 18. Složeni karcinom mliječne žlijezde pozitivna reakcija na ER α , IHC 40x	61
Slika 19. Složeni karcinom mliječne žlijezde pozitivna reakcija na PR, IHC 40x	61
Slika 20. Složeni karcinom mliječne žlijezde pozitivna reakcija na HER2, IHC 40x	62
Slika 21. Udio trostruko negativnih i ostalih karcinoma mliječne žlijezde kuja.....	63
Slika 22. Složeni karcinom mliječne žlijezde, HE 40x	64
Slika 23. Složeni karcinom mliječne žlijezde, negativna reakcija, ER α , IHC 40x.	64
Slika 24. Složeni karcinom mliječne žlijezde, kuja, negativna reakcija, PR, IHC 40x.....	65

Slika 25. Složeni karcinom mliječne žlijezde, kuja, negativna reakcija, HER2, IHC 40x.	65
Slika 26. Raspodjela imunohistokemijske ekspresije RASAL2 u karcinomima mliječne žlijezde kuja.....	68
Slika 27. Složeni karcinom mliječne žlijezde, negativna reakcija, RASAL2, IHC 40x.	68
Slika 28. Složeni karcinom mliječne žlijezde, slabo pozitivna reakcija, RASAL2, IHC 40x .	69
Slika 29. Složeni karcinom mliječne žlijezde, umjereno pozitivna reakcija, RASAL2, IHC 40x.....	69
Slika 30. Tubularni karcinom mliječne žlijezde, jako pozitivna reakcija, RASAL2, IHC 40x.	70
Slika 31. Raspodjela imunohistokemijske ekspresije proteina NECTIN-4 u karcinomima mliječne žlijezde kuja.....	75
Slika 32. Komedokarcinom mliječne žlijezde, negativna reakcija, NECTIN-4, IHC 40x.....	76
Slika 33. Tubularni karcinom mliječne žlijezde, slabo pozitivna reakcija, NECTIN-4, IHC 40x.....	76
Slika 34. Tubularni karcinom mliječne žlijezde, umjereno pozitivna reakcija, NECTIN-4, IHC 40x.....	77
Slika 35. Složeni karcinom mliječne žlijezde, jako pozitivna reakcija, NECTIN-4, IHC 40x.	77
Slika 36. Relativna ekspresija mRNA gena <i>RASAL2</i> u kontrolnoj skupini te u trostruko negativnim i ostalim karcinomima mliječne žlijezde kuja.....	82
Slika 37. Relativna ekspresija mRNA gena <i>RASAL2</i> u kontrolnoj skupini te u karcinomima različitih histoloških stupnjeva malignosti.....	83
Slika 38. Relativna ekspresija mRNA gena <i>NECTIN4</i> u kontrolnoj skupini te u trostruko negativnim i ostalim karcinomima mliječne žlijezde kuja.....	84
Slika 39. Relativna ekspresija mRNA gena <i>NECTIN4</i> u kontrolnoj skupini te u karcinomima histološkog stupnja malignosti I, II i III.....	85

POPIS TABLICA

Tablica 1. Kriteriji za histološko stupnjevanje i određivanje stupnja malignosti karcinoma mliječne žlijezde prema GOLDSCHMIDT i sur. (2011.)	34
Tablica 2. Primarna protutijela upotrijebljena za imunohistokemijsku pretragu karcinoma mliječne žlijezde kuja	36
Tablica 3. Reagensi upotrijebljeni za imunohistokemijsku pretragu karcinoma mliječne žlijezde kuja.....	37
Tablica 4. Razlike u imunohistokemijskim protokolima primijenjenima za pojedina protutijela	39
Tablica 5. Početnice ispitivanih gena od interesa	42
Tablica 6. Uvjeti RT-qPCR reakcija	43
Tablica 7. Parametri biološkog ponašanja karcinoma u odnosu na histološki stupanj malignosti karcinoma mliječne žlijezde kuja	59
Tablica 8. Imunohistokemijska ekspresija ER, PR i HER2 u karcinomima mliječne žlijezde kuja	60
Tablica 9. Raspodjela trostruko negativnih i ostalih karcinoma prema histološkom stupnju malignosti	66
Tablica 10. Parametri biološkog ponašanja trostruko negativnih i ostalih karcinoma mliječne žlijezde	67
Tablica 11. Raspodjela ekspresije proteina RASAL2 prema histopatološkom tipu karcinoma	71
Tablica 12. Raspodjela ekspresije RASAL2 prema histološkom stupnju malignosti karcinoma	72
Tablica 13. Raspodjela ekspresije proteina RASAL2 u trostruko negativnim i ostalim karcinomima.....	73
Tablica 14. Povezanost ekspresije proteina RASAL2 s pokazateljima biološkog ponašanja karcinoma	74
Tablica 15. Raspodjela ekspresije proteina NECTIN-4 prema histopatološkom tipu karcinoma	78
Tablica 16. Raspodjela ekspresije proteina NECTIN-4 prema histološkom stupnju malignosti karcinoma mliječne žlijezde kuja	79
Tablica 17. Raspodjela ekspresije proteina NECTIN-4 u trostruko negativnim i ostalim karcinomima.....	80

Tablica 18. Povezanost ekspresije proteina NECTIN-4 s pokazateljima biološkog ponašanja karcinoma	81
--	----

ZAHVALE

Mentoricama prof. dr. sc. Andrei Gudan Kurilj i izv. prof. dr. sc. Kristini Starčević zahvaljujem na mentorstvu i pomoći tijekom izrade ove disertacije.

Prof. dr. sc. Tomislavu Mašekcu zahvaljujem na statističkoj obradi podataka i stručnim savjetima.

Zahvalna sam Željani Klječanin Franić, spec. philol. croat. na pažljivoj lekturi disertacije, uloženom vremenu i susretljivosti.

Djelatnicama Laboratorija za citologiju i histopatologiju Zavoda za veterinarsku patologiju i kolegici dr. sc. Vidi Eraghi zahvaljujem na pomoći pri izvođenju imunohistokemijskih pretraga uzoraka.

Zahvaljujem svim suradnicima istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Lipidi hrane, spol i dob u patogenezi metaboličkog sindroma“ te djelatnicima klinika Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i privatnih veterinarskih ambulanti uključenih u projekt, u okviru kojega su prikupljeni uzorci korišteni u ovom istraživanju.

Kolegama Zavoda za veterinarsku patologiju te drugim djelatnicima Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zahvaljujem na savjetima, susretljivosti i razumijevanju tijekom izrade disertacije.

Na kraju, posebno zahvaljujem suprugu Denisu na podršci i strpljenju, a našoj kćeri Bruni na vedrini i osmijehu kojima je svaki dan činila ljepšim. Našim obiteljima i prijateljima zahvaljujem na riječima ohrabrenja.

Ivana

O MENTORICAMA

prof. dr. sc. Andrea Gudan Kurilj

Rođena je 22. listopada 1974. u Zaboku. Osnovnu školu pohađala je u Velikom Trgovišću, a srednju školu za medicinske sestre u Zagrebu, gdje je maturirala 1993. godine. Iste godine upisala je Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, gdje je diplomirala 2001. godine. Poslijediplomski doktorski studij veterinarske medicine, smjer patološka anatomija, upisala je 2002. godine, a doktorirala je 2009. godine.

U rujnu 2001. godine zaposlena je kao znanstvena novakinja u Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Stručni, nastavni i znanstveni rad nastavila je na istom Zavodu, gdje je 2003. godine izabrana u suradničko zvanje asistentice. U suradničko zvanje više asistentice izabrana je 2009. godine, u zvanje docentice 2011., izvanredne profesorice 2016. godine te redovite profesorice 2021. godine. Sudjeluje u održavanju svih oblika nastave u okviru Integriranog prijediplomskog i diplomskog studija *Veterinarska medicina* te na nekoliko predmeta specijalističkog i dokorskog studija. Voditeljica je poslijediplomskog specijalističkog studija *Uzgoj i patologija laboratorijskih životinja*. Dosad je u suautorstvu objavila sveučilišni priručnik u elektroničkom izdanju *Bolesti i liječenje pasa i mačaka* (2011.) i sveučilišni udžbenik *Osnove razudbe domaćih životinja* (2016.).

Radi stručnog i znanstvenog usavršavanja boravila je u zimskom semestru ak. god. 2004./2005. na Institutu za veterinarsku patologiju Sveučilišta u Zürichu. Usavršavala se i u ljetnim školama veterinarske patologije u organizaciji European College of Veterinary Pathologists (ECVP) (Helsinki, Finska, 2006.; Zaragoza, Španjolska, 2009.; Zürich, Švicarska, 2010.; Dublin, Irska, 2013.). Od siječnja 2013. do siječnja 2014. godine ponovno odlazi na Institut za veterinarsku patologiju Sveučilišta u Zürichu, gdje prolazi rezidentsku izobrazbu u svrhu pripreme za polaganje ECVP certifikacijskog ispita, koji je uspješno položila 2015. godine i stekla titulu Dipl. ECVP. Nakon položenog ispita prof. A. Gudan Kurilj napisala je rezidentski program edukacije, koji je prihvatilo Vijeće ECVP-a, te je 2016. godine Zavod za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu postao službeni centar za izobrazbu kandidata za pristupanje ECVP certifikacijskom ispitu.

Samostalno ili u suradnji s drugim autorima, objavila je više od 150 radova u znanstvenim i stručnim časopisima te zbornicima s domaćih i međunarodnih skupova. Bila je suradnica na znanstvenim projektima koje je financiralo Ministarstvo znanosti, obrazovanja i

športa pod nazivima: *Komparativna dijagnostika, morfometrija i analiza tumora ljudi i životinja* te *Učestalost i distribucija animalnih tumora u Republici Hrvatskoj* (2007. – 2013.). Također je bila suradnica na FP7 ERA Chair projektu *VetMedZg – Upgrading the research performance in molecular medicine at the Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb* (2014. – 2019.) u sklopu radnog paketa 3: *Jačanje istraživačkih kapaciteta u usporednoj analizi tumora te na projektu Hrvatske zaklade za znanost – Anisakis spp. Genomic Epidemiology* (2014. – 2018.). Prof. dr. sc. Andrea Gudan Kurilj bila je voditeljica projekta *Unapređenje stručne prakse na farmskim životinjama i konjima na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu – VETFARM*, UP.03.1.1.04 (2020. – 2023.). Osim toga, prof. dr. sc. A. Gudan Kurilj sudjeluje i u istraživanjima koja koriste laboratorijske životinje, i to u svrhu procjene histopatoloških lezija. Od 2012. godine suradnica je na provedbi *Tečaja za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka* u organizaciji Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Članica je Europskog koledža veterinarske patologije, Europskog udruženja veterinarskih patologa i Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama. Od 2005. do 2009. godine bila je članica Uredničkog odbora znanstveno-stručnog časopisa *Hrvatski veterinarski vjesnik*, a od 2018. do 2026. godine u svojstvu pomoćne urednice bila je članica Uredničkog odbora znanstvenog časopisa *Veterinarski arhiv*. Do sada je aktivno sudjelovala u radu nekoliko povjerenstava i vijeća Veterinarskog fakulteta, i to Povjerenstva za međunarodnu suradnju, Povjerenstva za odlikovanja, Povjerenstva za integrirani prijediplomski i diplomski studij, Povjerenstva za knjižničnu i izdavačku djelatnost te Vijeća doktorskog studija i Vijeća specijalističkih studija. Od ožujka 2019. do listopada 2022. godine obnašala je dužnost prodekanice za integrirani studij i studente, a trenutačno obnaša dužnost predstojnice Zavoda za veterinarsku patologiju.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA U PROTEKLIH PET GODINA

PUVAČA, N., N. LEMO, F. BANOVIC, **A. GUDAN KURILJ** (2026): Comparative Histopathological Characterisation of Sebaceous Adenitis in Affected Poodle, Poodle-Related Breeds and Japanese Akita Dogs: A Retrospective, Blinded Study. *Vet. Derm.* 37:386–394
DOI: [org/10.1111/vde.70055](https://doi.org/10.1111/vde.70055)

KONJEVIĆ, D.; N. ŠKVORC, M. BUJANIĆ, J. ČURLÍK, A. GAŠPAR, I. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, **A. GUDAN KURILJ** (2026): Red Deer (*Cervus elaphus*) Fascioloidosis: From Liver Pathology to Regeneration. *Life*. 16, 502, 1-9.
DOI: [10.3390/life16030502](https://doi.org/10.3390/life16030502)

ERAGHI, V., I. CIPRIĆ, N. SERDAR, A. JONKER, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, D. VLAHOVIĆ, I. MIHOKOVIĆ BUHIN, I. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, B. ARTUKOVIĆ, D. HUBER, M. MATASOVIĆ, M. HOHŠTETER, **A. GUDAN KURILJ** (2025): Feline Lymphoma in Focus: Examining the Patterns and Types in Croatia's Pathological Records. *Vet. Sci.* 12, 10; 1-12.
DOI: [10.3390/vetsci12100986](https://doi.org/10.3390/vetsci12100986)

LANG BALIJA, M., M. JAGUŠIĆ, E. GAMULIN, R. JUG, I. BUTKOVIĆ, S. LUKAČEVIĆ MATELJAK, T. KURTOVIĆ, D. VNUK, **A. GUDAN KURILJ**, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, B. HALASSY, D. FORČIĆ (2025): Spontaneous Canine Mammary Tumors as a Platform for Human Breast Cancer Virotherapy Development. The Annual Meeting of the Croatian Immunological Society 2025. Njivice: Croatian Immunological Society (Hrvatsko imunološko društvo), 2025. str. 40-40.

LANG BALIJA, M., R. JUG, M. JAGUŠIĆ, E. GAMULIN, D. VNUK, **A. GUDAN KURILJ**, I. BUTKOVIĆ, B. HALASSY, D. FORČIĆ (2025): The Oncolytic Potential of the Human Virus in Canine Tumors. 9th European Congress of Virology. Cavtat, Hrvatska, 27.04.2025-30.04.2025.

ERAGHI, V., L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, M. MATASOVIĆ, D. VLAHOVIĆ, D. HUBER, **A. GUDAN KURILJ**, I. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, B. ARTUKOVIĆ, I. BUHIN MIHOKOVIĆ, I. CIPRIĆ, M. HOHŠTETER (2025): Canine lymphoma in Croatia: a fourteenyear retrospective study. BMC Veterinary Research, 21, 1; 172, 7.

DOI: 10.1186/s12917-025-04634-x

ŠKVORC, N., M. BUJANIĆ, K. SEVERIN, L. ŠERIĆ JELASKA, M. PALIĆ, **A. GUDAN KURILJ**, S. KUŽIR, D. KONJEVIĆ (2024): Red deer (*Cervus elaphus*) antler myiasis caused by *Prochyliza nigrimanus* (Meigen 1826). Parasitol. Res. 123, 400.

DOI: 10.1007/s00436-024-08421-9

ĐURAS, M., M. KOLENC, T. GOMERČIĆ, **A. GUDAN KURILJ**, A. GALOV, A; K. KORPES (2024): Intentional harm in marine mammals stranded dead in the Adriatic Sea, Croatia, 1990-2023. Diseases of aquatic organisms, 160, 75-93.

DOI: 10.3354/dao03826

HUBER, D., K. SEVERIN, D. VLAHOVIĆ, S. KRIŽANAC, S. MOFARDIN, I. MIHOKOVIĆ BUHIN, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, I. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, **A. GUDAN KURILJ**, B. ARTUKOVIĆ, M. HOHŠTETER (2024): Cancer morbidity in Croatian cats: Retrospective study on spontaneously arising tumors (2009–2019). Topics in Companion Animal Medicine, 58, 1-7.

DOI: 10.1016/j.tcam.2023.100841

REIL, I., S. DUVNJAK, S. ŠPIČIĆ, G. KOMPES, A. BAGARIĆ, M. ĐURAS, **A. GUDAN KURILJ**, M. LUKAČ, M. JELIĆ, M. ZDELAR-TUK (2024): Isolation of Multidrug-Resistant *Mycobacterium Avium* Subsp. *Avium* from a Wild Eurasian Otter (*Lutra Lutra*). Antibiotics, 13, 7; 591-601.

DOI: 10.3390/antibiotics13070591

BRNIĆ, D., D. VLAHOVIĆ, **A. GUDAN KURILJ**, N. MALTAR-STRMEČKI, I. LOJKIĆ, V. KUNIĆ, L. JEMERŠIĆ, I. BAČANI, G. KOMPES, R. BECK, T. MIKULETIČ, A. STEYER (2023): The impact and complete genome characterisation of viruses involved in outbreaks of gastroenteritis in a farrow-to-finish holding. Scientific reports, 13, 18780, 14.
DOI: 10.1038/s41598-023-45994-4

LANG BALIJA, M., A. ŠTIMAC, T. KOŠUTIĆ GULIJA, **A. GUDAN KURILJ**, A. BEKAVAC, A. PLEĆAŠ, B. HALASSY, M. JAGUŠIĆ, D. FORČIĆ (2023): Evaluation of the interactions between mumps virus and guinea pig. Journal of virology, 97, 4; e00359-23, 17.
DOI: 10.1128/jvi.00359-23

PETAK, A., I. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, **A. GUDAN KURILJ**, N. LEMO (2022): A case of cutaneous bullous mastocytosis in a Yorkshire terrier puppy. Vet. Derm. 33, 4; 352-356.
DOI: 10.1111/vde.13074

LANG BALIJA, M., **A. GUDAN KURILJ**, M. JAGUŠIĆ, D. FORČIĆ (2022): Mumps virus infection of guinea pigs. Annual meeting of the Croatian Immunological Society Book of Abstracts. 2022. str. 66-66

izv. prof. dr. sc. Kristina Starčević

Kristina Starčević rođena je 6. prosinca 1970. godine u Münchenu. Diplomirala je 1995. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, na kojemu je nastavila poslijediplomski znanstveni studij Inženjerska kemija te je 2001. godine stekla akademski stupanj magistra znanosti. Doktorirala je 2005. godine iz područja prirodnih znanosti, znanstvenog polja kemije, grane organske kemije. Od prosinca 1995. do siječnja 2007. godine bila je zaposlena u Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije kao znanstvena novakinja na projektu prof. dr. sc. Grace Karminski-Zamola. U razdoblju od 2007. do 2010. godine radila je u istraživačkom centru tvrtke GlaxoSmithKline Research Centre Zagreb d.o.o. Na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu zaposlena je od 2010. godine, najprije u Zavodu za stočarstvo, potom u Zavodu za sudsko i upravno veterinarstvo, a od veljače 2019. godine radi u Zavodu za kemiju i biokemiju kao izvanredna profesorica. Aktivno sudjeluje u nastavi na integriranom prijediplomskom i diplomskom te specijalističkim studijima Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Trenutačno je članica Povjerenstva za upravljanje kvalitetom i Vijeća doktorskog studija Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica je nagrade *GSK R&D's Exceptional Science Award Programme* (2008.) te *Nagrade Veterinarskog fakulteta za znanstveni rad* (2018.).

Znanstveni interes Kristine Starčević usmjeren je na metabolizam lipida i masnih kiselina, oksidativni stres, upalne procese, antioksidativne mehanizme te dizajn i biološku evaluaciju bioaktivnih spojeva. Sudjelovala je kao suradnica na dva projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ), bila je voditeljica dvaju HRZZ projekata te voditeljica jednog bilateralnog projekta. U navedenim područjima objavila je više od 80 radova u časopisima s međunarodnom recenzijom, dok njezina ukupna znanstvena bibliografija obuhvaća više od 170 znanstvenih i stručnih radova, uključujući izlaganja na međunarodnim kongresima. Autorica je dvaju međunarodnih patenata iz područja medicinske kemije i bioaktivnih spojeva. Aktivno sudjeluje u mentoriranju mladih istraživača; pod njezinim mentorstvom obranjena su dva doktorska rada, dok ih je pet u tijeku izrade, kao i veći broj diplomskih i završnih radova. Djeluje kao recenzentica u više međunarodnih znanstvenih časopisa te je članica Hrvatskog kemijskog društva i međunarodnog društva ISSFAL (*International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*).

OBJAVLJENI RELEVANTNI RADOVI U POSLJEDNJIH PET GODINA

STARČEVIĆ, K., L. LOZICA, S. SERTIĆ, I. SABOLEK, S. ŽUŽUL, Ž. GOTTSTEIN, E. BUDICIN, D. BROZIĆ, M. BRUS, T. MAŠEK (2025): Chestnut tannin and chestnut tannin-soy protein isolate complex differently influence fecal *Escherichia coli* count, immune system, caecum fermentation and meat oxidative susceptibility in broiler chickens. *J. Cent. Eur. Agric.* 26, 606-617.

DOI: 10.5513/JCEA01/26.3.4695

KRSTULOVIĆ, L., M. LEVENTIĆ, V. RASTIJA, **K. STARČEVIĆ**, M. JIROUŠ, I. JANIĆ, M. KARNAŠ, K. LASIĆ, M. BAJIĆ, LJ. GLAVAŠ-OBROVAC (2023): Novel 7-chloro-4-aminoquinoline-benzimidazole hybrids as inhibitors of cancer cells growth: synthesis, antiproliferative activity, in silico ADME predictions, and docking. *Molecules* 28, 540.

DOI: 10.3390/molecules28020

MAŠEK, T., P. ROŠKARIĆ, S., SERTIĆ, **K. STARČEVIĆ** (2025): Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acid Supplementation Could Attenuate Negative Effects of Maternal Metabolic Syndrome on Liver Lipid Metabolism and Liver Betacellulin Expression in Male and Female Rat Offspring. *Metabolites*, 15, 1; 32-43.

DOI: 10.3390/metabo15010032

PERIN, N., M. CINDRIĆ, P. VERVAEKE, S. LIEKENS, T. MAŠEK, **K. STARČEVIĆ**, M. HRANJEC (2021): Benzazole-substituted iminocoumarins as potential antioxidants with antiproliferative activity. *Med. Chem.* 17, 13–20.

DOI: 10.2174/1573406416666191218101427

ROŠKARIĆ, P., M. ŠPERANDA, T. MAŠEK, D. VERBANAC, **K. STARČEVIĆ** (2021): Low dietary n-6/n-3 ratio attenuates changes in NRF2 gene expression, lipid peroxidation, and inflammatory markers induced by fructose overconsumption in rat abdominal adipose tissue. *Antioxidants* 10, 2005.

DOI: 10.3390/antiox10122005

SAŽETAK

EKSPRESIJA RAS-GAP I NECTIN-4 PROTEINA U KARCINOMIMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA S NAGLASKOM NA TROSTRUKO NEGATIVNE KARCINOME

Karcinomi mliječne žlijezde kuja čine histološki i biološki heterogenu skupinu tumora. Cilj istraživanja bio je ispitati ekspresiju proteina RASAL2 i NECTIN-4 te gena *RASAL2* i *NECTIN4* i njihovu povezanost s histopatološkim obilježjima i biološkim ponašanjem karcinoma, s posebnim naglaskom na trostruko negativni fenotip. Histopatološka pretraga i imunohistokemijska analiza ER, PR, HER2, RASAL2 i NECTIN-4 provedene su na 35 karcinoma, a ekspresija gena *RASAL2* i *NECTIN4* analizirana je metodom RT-qPCR u 31 uzorku. Trostruko negativni karcinomi činili su 37,14 % slučajeva te su pokazali povezanost s kraćim razdobljem bez bolesti, češćim metastazama i kraćim vremenom preživljenja. S porastom histološkog stupnja malignosti povećavao se udio životinja s metastazama, dok se vrijeme preživljenja skraćivalo. Pokazana je povezanost imunohistokemijske ekspresije proteina RASAL2 s razdobljem bez bolesti, pri čemu je najveći udio slučajeva bez ponovne proliferacije tumora zabilježen u objedinjenoj kategoriji umjereno i jako pozitivne ekspresije. Relativna ekspresija mRNA gena *RASAL2* bila je smanjena u trostruko negativnim i ostalim karcinomima te u svim histološkim stupnjevima malignosti u odnosu na kontrolno tkivo. Imunohistokemijska ekspresija proteina NECTIN-4 pokazala je povezanost s razdobljem bez bolesti i vremenom preživljenja, uz nepovoljniji obrazac ishoda u karcinomima s negativnom ekspresijom, dok je relativna ekspresija mRNA gena *NECTIN4* bila povećana u trostruko negativnim i ostalim karcinomima te u svim histološkim stupnjevima malignosti. Rezultati potvrđuju nepovoljnije biološko ponašanje trostruko negativnih karcinoma te upućuju na različite obrasce ekspresije RASAL2 i NECTIN-4 na proteinskoj i transkripcijskoj razini.

Ključne riječi: karcinom mliječne žlijezde kuja; trostruko negativni karcinom; RASAL2; NECTIN-4; imunohistokemija; RT-qPCR

EXTENDED ABSTRACT

EXPRESSION OF RAS-GAP AND NECTIN-4 PROTEINS IN CANINE MAMMARY GLAND CARCINOMAS, WITH EMPHASIS ON TRIPLE-NEGATIVE CARCINOMAS

INTRODUCTION

Mammary gland tumours are the most frequently diagnosed neoplasms in intact female dogs. Approximately half of these tumors are malignant, with carcinomas accounting for the largest proportion. Canine mammary carcinomas represent a highly heterogeneous group of malignant epithelial neoplasms, differing in morphology, histological type, and biological behavior. This heterogeneity highlights the need for additional molecular markers that could improve classification and prognostic assessment.

Triple-negative carcinomas are defined by the absence of oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression and have been associated with increased proliferative activity and more aggressive biological behaviour. Among the molecular markers investigated in breast cancer are RAS protein activator like 2 (RASAL2) and nectin cell adhesion molecule 4 (NECTIN-4). Data on RASAL2 in female dogs are limited, while the biological and prognostic significance of NECTIN-4 in canine mammary tumours remains insufficiently understood. Investigation of these markers at both gene and protein levels could enhance understanding of canine mammary carcinomas, particularly triple-negative subtypes.

AIM OF THE STUDY

Hypothesis

There is a difference in RASAL2 and NECTIN-4 expression based on histological types of canine mammary carcinoma and between triple-negative and other carcinomas.

General Objective

The general objective was to determine the possible association between the expression of the investigated genes and proteins and biological behaviour and histopathological type, with a special focus on triple-negative canine mammary carcinomas. This was assessed through

correlations with histopathological characteristics, histological grade, survival time, disease-free period, and immunohistochemical expression of ER, PR, HER2, RASAL2 and NECTIN-4, alongside gene expression analysis of *RASAL2* and *NECTIN4*.

Specific Objectives

1. To distinguish triple-negative carcinomas from other canine mammary carcinomas using immunohistochemistry based on ER, PR, and HER2 expression.
2. To investigate RASAL2 and NECTIN-4 expression in canine mammary carcinomas using immunohistochemistry and RT-qPCR.

MATERIALS AND METHODS

The study analyzed 35 archived paraffin-embedded canine mammary carcinoma samples and 31 corresponding frozen tumor samples collected between 2017 and 2022. Three frozen mammary gland samples from the same animals, without macroscopic or microscopic pathological changes, served as controls for gene expression analysis. Clinical follow-up data were collected in early 2026, at least four years post-surgery, including assessment of proliferative changes at the site of surgical removal of the primary tumour, metastases and survival time. Metastases were confirmed by ultrasonographic and/or radiographic findings and cytological or histopathological examination.

Histopathological classification and grading were performed, and carcinomas were assigned grades I–III. Immunohistochemical analysis included ER α , PR, HER2, RASAL2 and NECTIN-4. ER α and PR were considered positive if $\geq 10\%$ of tumour cells were positive, HER2 expression was assessed by HercepTest™ criteria, and RASAL2 and NECTIN-4 were evaluated using an immunoreactive score and classified as negative, weakly positive, moderately positive or strongly positive.

Relative *RASAL2* and *NECTIN4* gene expression was analysed in frozen carcinoma samples by one-step RT-qPCR using the $\Delta\Delta C_t$ method. The disease-free period was categorised according to the time of appearance of proliferative changes at the surgical site. Associations with the triple-negative phenotype, histopathological type, histological grade and indicators of biological behaviour were analysed using the χ^2 test or Fisher's exact test; with $p < 0.05$ considered significant.

RESULTS

Histological grade was highly significantly associated with metastases and survival time ($p < 0.001$). As histological grade increased, the proportion of animals with metastases increased, whereas the proportion surviving for more than three years decreased. No significant association was found with the reappearance of proliferative recurrences or the disease-free period.

Thirteen of 35 carcinomas (37.14%) were triple-negative. Compared with other carcinomas, triple-negative carcinomas were associated with a shorter disease-free period ($p < 0.05$), higher metastasis frequency, and reduced survival time ($p < 0.01$); however, no significant association was found with the reappearance of proliferative recurrence.

RASAL2 immunohistochemical expression was significantly correlated with the disease-free period ($p < 0.05$), with the highest proportion of cases without reappearance of proliferative changes observed in the combined moderate and strong positive expression category. No significant association was found with the other analysed indicators of biological behaviour, histopathological type, histological grade, or the triple-negative phenotype.

NECTIN-4 immunohistochemical expression significantly correlated with the disease-free period ($p < 0.001$) and survival time ($p < 0.05$). All cases with available data in the weakly positive category showed no reappearance of proliferative recurrences, while the highest proportion of animals with survival shorter than one year was observed in the negative-expression group. No significant association was found with the reappearance of proliferative changes, metastases, histopathological type, histological grade, or the triple-negative phenotype.

Relative *RASAL2* mRNA expression was significantly reduced in triple-negative and other carcinomas, as well as across all histological grades, compared with control mammary gland samples. In contrast, relative *NECTIN4* mRNA expression was significantly increased in triple-negative and other carcinomas and in all histological grades compared with controls, with the highest mean relative expression observed in grade III carcinomas.

DISCUSSION

The strong correlation of histological grade with metastases and survival time confirms its prognostic relevance. The triple-negative phenotype was associated with less favourable

biological behaviour; however, because multivariable analysis was not performed, this should not be interpreted as evidence of independent prognostic value.

The association of RASAL2 immunohistochemical expression with the disease-free period, demonstrated with the highest proportion of cases without reappearance of proliferative changes in the combined moderate and strong positive category, could be consistent with the tumour-suppressive role described in breast cancer. However, the lack of correlation with the reappearance of proliferative changes, metastases, and survival time precludes interpreting stronger RASAL2 expression as an unequivocal indicator of a more favourable prognosis. Decreased *RASAL2* mRNA expression observed in triple-negative carcinomas differs from findings in human triple-negative breast cancer, indicating that the role of RASAL2 in humans cannot be directly extrapolated to canine tumours.

NECTIN-4 immunohistochemical expression showed a less favourable distribution of outcomes in carcinomas with negative expression. Increased *NECTIN4* mRNA expression should not, by itself, be interpreted as an indicator of more aggressive biological behaviour. For both RASAL2 and NECTIN-4, immunohistochemistry and RT-qPCR assess different levels of expression, so differences between protein and mRNA findings should not be interpreted as directly contradictory. Interpretation is limited by the number of analysed carcinomas, unequal representation of histopathological types, and missing follow-up data for some animals. The observed molecular relationships should also be interpreted while considering species-specific differences compared to human breast cancer.

CONCLUSION

Immunohistochemical analysis of ER, PR and HER2 identified 13 triple-negative carcinomas (37.14%). The triple-negative phenotype was significantly associated with a shorter disease-free period, more frequent metastases and shorter survival time. Positive immunohistochemical RASAL2 expression was significantly associated with the disease-free period, with the highest proportion of cases without reappearance of proliferative changes in the combined category of moderate and strong positive expression. This indicates an association between stronger RASAL2 expression and more favourable biological behaviour. Relative *RASAL2* mRNA expression was significantly decreased in triple-negative and other carcinomas and in all histological grades, compared with control mammary gland samples, representing a molecular feature associated with the malignant phenotype. Its coexistence with

immunohistochemical RASAL2 protein expression in most carcinomas indicates that transcriptional and protein expression do not necessarily correspond directly.

Negative immunohistochemical NECTIN-4 expression was significantly associated with both the disease-free period and survival time, indicating a link with less favourable biological behaviour. Relative *NECTIN4* mRNA expression was significantly increased in triple-negative and other carcinomas, as well as across all histological grades compared with controls, representing a molecular feature associated with the malignant phenotype. Its coexistence with heterogeneous NECTIN-4 protein expression suggests differing transcriptional and protein expression patterns, indicating that mRNA levels may not directly reflect protein expression. No significant association was found between immunohistochemical RASAL2 or NECTIN-4 expression and histopathological type, histological grade, or the triple-negative phenotype.

Keywords: canine mammary carcinoma; triple-negative carcinoma; RASAL2; NECTIN-4; immunohistochemistry; RT-qPCR

POPIS KRATICA I ZNAKOVA

AR – androgeni receptor (engl. *androgen receptor*)

ARHGAP24 – aktivacijski protein Rho-GTPaze 24 (engl. *Rho GTPase activating protein 24*)

BRCA1 – protein BRCA1 povezan s popravkom DNA (engl. *BRCA1 DNA repair associated*)

BRCA2 – protein BRCA2 povezan s popravkom DNA (engl. *BRCA2 DNA repair associated*)

CAF – fibroblasti povezani s karcinomom (engl. *cancer-associated fibroblasts*)

cDNA – komplementarna DNA (engl. *complementary DNA*)

c-erbB-2 – protoonkogen c-ErbB-2 (engl. *proto-oncogene c-ErbB-2*)

CK5 – citokeratin 5 (engl. *cytokeratin 5*)

CK5/6 – citokeratin 5/6 (engl. *cytokeratins 5/6*)

CK14 – citokeratin 14 (engl. *cytokeratin 14*)

COX-2 – ciklooksigenaza 2 (engl. *cyclooxygenase-2*)

Ct – prag ciklusa (engl. *threshold cycle*)

DAB – 3,3'-diaminobenzidin (engl. *3,3'-diaminobenzidine*)

DAB2IP – protein koji ulazi u interakciju s DAB2 (engl. *DAB2 interacting protein*)

EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)

EMT – epitelno-mezenhimna tranzicija (engl. *epithelial-mesenchymal transition*)

ER – estrogenski receptor (engl. *estrogen receptor*)

ErbB2 – receptor tirozin-kinaze Erb-B2 (engl. *Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2*)

FFPE – formalin-fiksirano, parafinsko ugrađivanje (engl. *formalin-fixed, paraffin-embedded*)

GAP – GTPaza aktivacijski proteini (engl. *GTPase-activating proteins*)

GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GATA3 – GATA-vezni protein 3 (engl. *GATA binding protein 3*)

GDP – gvanozin-difosfat (engl. *guanosine diphosphate*)

GEF – čimbenici izmjene gvaninskih nukleotida (engl. *guanine nucleotide exchange factors*)

GH – hormon rasta (engl. *growth hormone*)

GHR – receptor hormona rasta (engl. *growth hormone receptor*)

GTP – gvanozin-trifosfat (engl. *guanosine triphosphate*)

HE – haematoksilin-eozin (engl. *haematoxylin and eosin*)

HER1 – receptor 1 humanoga epidermalnog faktora rasta (engl. *human epidermal growth factor receptor 1*)

HER2 – receptor 2 humanoga epidermalnog faktora rasta (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)

HER2/neu – receptor 2/neu humanoga epidermalnog faktora rasta (engl. *human epidermal growth factor receptor 2/neu*)

HPF – vidno polje pri velikom povećanju (engl. *high-power field*)

IGF – inzulinski faktor rasta (engl. *insulin-like growth factor*)

IGF-I – inzulinski faktor rasta I (engl. *insulin-like growth factor I*)

IGF-IR – receptor inzulinskog faktora rasta I (engl. *insulin-like growth factor I receptor*)

IHC – imunohistokemija (engl. *immunohistochemistry*)

IRS – imunoreaktivni rezultat (engl. *immunoreactive score*)

Ki-67 – biljeg proliferacije Ki-67 (engl. *marker of proliferation Ki-67*)

LHRHR – receptor koji oslobađa luteinizacijski hormon (engl. *luteinizing hormone-releasing hormone receptor*)

MAPK/ERK – protein-kinaza aktivirana mitogenome / kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*)

MMP – matriksne metaloproteinaze (engl. *matrix metalloproteinases*)

MMP-2 – matriksna metaloproteinaza 2 (engl. *matrix metalloproteinase-2*)

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

NECTIN-1 – protein NECTIN-1 (engl. *NECTIN-1 protein*)

NECTIN-4 – protein NECTIN-4 (engl. *NECTIN-4 protein*)

NGAP – aktivacijski protein Ras-GTPaze nGAP (engl. *Ras GTPase-activating protein nGAP*)

p53 – tumorski protein p53 (engl. *Tumor protein p53*)

p63 – tumorski protein p63 (engl. *Tumor protein p63*)

PAM50 – analiza predviđanja mikromreža 50 (engl. *prediction analysis of microarrays 50*)

PCNA – proliferacijski nuklearni antigen (engl. *proliferating cell nuclear antigen*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PD-1/PD-L1 – proteinski receptor za programiranu staničnu smrt 1 / programirana smrtni ligand 1 (engl. *programmed cell death protein 1/programmed death-ligand 1*)

PI3K/AKT/mTOR – fosfatidilinozitol 3-kinaza / protein-kinaza B / mehanistički cilj rapamicina (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mechanistic target of rapamycin*)

PR – progesteronski receptor (engl. *progesterone receptor*)

PRLR – prolaktinski receptor (engl. *prolactin receptor*)

PVRL4 – protein 4 srodan poliovirusnom receptoru (engl. *poliovirus receptor-related protein 4*)

RAC1 – porodica Rac male GTPaze 1 (engl. *Rac family small GTPase 1*)

RAS – sarkom štakora (engl. *rat sarcoma*)

RASAL2 – protein/gen 2 sličan aktivatoru proteina RAS (engl. *RAS protein activator like 2 protein/gene*)

RAS-GAP – aktivacijski protein RAS-GTPaze (engl. *RAS GTPase-activating protein*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

RNase – ribonukleaza (engl. *ribonuclease*)

ROX – karboksiks-rodamin (engl. *carboxy-X-rhodamine*)

RT-PCR – lančana reakcija polimerazom s reverznom transkripcijom (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*)

RT-qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom s reverznom transkripcijom (engl. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*)

SAD – Sjedinjene Američke Države (engl. *United States of America – USA*)

TAM – makrofagi povezani s tumorom (engl. *tumor-associated macrophages*)

TBP – protein koji veže slijed TATA (engl. *TATA-box binding protein*)

TGF- β – transformacijski faktor rasta beta (engl. *transforming growth factor beta*)

TNBC – trostruko negativni karcinom dojke (engl. *triple-negative breast cancer*)

TP53 – tumorski protein 53 (engl. *tumor protein 53*)

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

ZO-1 – zonula okludens 1 (engl. *zonula occludens-1*)

$\Delta\Delta Ct$ – razlika između normaliziranih Ct-vrijednosti ispitivane i kontrolne skupine (engl.
Delta delta Ct)

1. UVOD

Tumori mliječne žlijezde najčešće su dijagnosticirane novotvorine u nekastriranih kuja (SORENMO i sur., 2011.; SALAS i sur., 2015.). Približno polovica ih je maligna, a među njima najveći udio čine karcinomi. Karcinomi mliječne žlijezde izrazito su heterogena skupina malignih novotvorina epitelnog podrijetla, različitih morfoloških obilježja, histoloških tipova i biološkog ponašanja (GOLDSCHMIDT i sur., 2011.; SALAS i sur., 2015.). Klinički stadij bolesti, veličina tumora i status regionalnih limfnih čvorova, kao i histološki tip te stupanj malignosti važni su pokazatelji biološkog ponašanja tumora i prognoze oboljelih životinja (GOLDSCHMIDT i sur., 2011.; SORENMO i sur., 2011.). Prethodno navedena izražena heterogenost ovih tumora upućuje na potrebu za istraživanjem njihovih molekularnih obilježja i utvrđivanjem dodatnih pokazatelja koji bi mogli pridonijeti preciznijem razvrstavanju i procjeni prognoze (SORENMO i sur., 2011.; ABDELMEGEED i MOHAMMED, 2018.).

U skladu s time, imunohistokemijska ekspresija odabranih biljega omogućila je razvrstavanje karcinoma mliječne žlijezde kuja u različite fenotipove, usporedive s onima opisanima u karcinomu dojke u žena (GAMA i sur., 2008.; SASSI i sur., 2010.; ABADIE i sur., 2018.). Posebno mjesto među njima zauzimaju trostruko negativni karcinomi, definirani izostankom ekspresije estrogenskih receptora (ER), progesteronskih receptora (PR) te receptora humanog epidermalnog čimbenika rasta 2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2; drugi nazivi: HER2/neu, ErbB2 i c-erbB-2) (ABADIE i sur., 2018.). Trostruko negativni karcinomi mliječne žlijezde kuja povezani su s većom proliferacijskom aktivnošću i agresivnijim biološkim ponašanjem (ABADIE i sur., 2018.). Navedena obilježja usmjerila su istraživanja prema dodatnim biljezima koji bi mogli imati biološki i prognostički značaj.

S obzirom na ograničene podatke o pojedinim molekularnim biljezima u karcinomima mliječne žlijezde kuja, njihovu moguću biološku ulogu korisno je razmotriti i u kontekstu spoznaja proizašlih iz istraživanja karcinoma dojke u žena. Među molekularnim biljezima čija se uloga istražuje u karcinomu dojke, izdvajaju se RASAL2 (engl. *RAS protein activator like 2*; drugi naziv: NGAP) i NECTIN-4 (engl. *nectin cell adhesion molecule 4*; drugi naziv: PVRL4). Uloga proteina RASAL2 u karcinomu dojke ovisi o molekularnom podtipu tumora: kod luminalnog B-podtipa opisana je njegova tumorsupresorska uloga, dok je kod trostruko negativnih karcinoma dojke (engl. *triple-negative breast cancer*, TNBC) povećana ekspresija proteina RASAL2 povezana s nepovoljnijim ishodom bolesti, a njegova aktivnost s poticanjem invazije i metastaziranja (McLAUGHLIN i sur., 2013.; FENG i sur., 2014.). Ekspresija proteina NECTIN-4 utvrđena je u pojedinim staničnim linijama karcinoma i kliničkim uzorcima tumora

mliječne žlijezde pasa, ali ne i u zdravom tkivu mliječne žlijezde (SHOJI i sur., 2016.). Mogući prognostički i terapijski značaj proteina NECTIN-4 dodatno podupiru istraživanja trostruko negativnih karcinoma dojke, kod kojih je njegova povećana ekspresija povezana s nepovoljnijim tijekom bolesti te je prepoznat kao potencijalna terapijska meta (M-RABET i sur., 2017.).

O ulozi proteina RASAL2 u kuja zasad nema dovoljno podataka, dok biološko i prognostičko značenje ekspresije proteina NECTIN-4 u tumorima mliječne žlijezde kuja još nije dovoljno razjašnjeno (SHOJI i sur., 2016.). Stoga bi istraživanja ekspresije navedenih molekularnih biljega na genskoj i proteinskoj razini mogla pridonijeti boljem razumijevanju bioloških obilježja karcinoma mliječne žlijezde u kuja, posebice trostruko negativnih.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. RAZVOJ, ANATOMIJA I HISTOLOGIJA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA

Mliječna žlijezda modificirana je apokrina znojna žlijezda karakteristična isključivo za sisavce. Njezin se razvoj zbiva postupno, od embrionalnog razdoblja do potpune funkcionalne diferencijacije tijekom gravidnosti (SORENMO i sur., 2011.). Tijekom embrionalnog razvoja nastaje iz mliječnog grebena, odnosno zadebljanja ventrolateralnog ektoderma. Na mjestima karakterističnima za pojedinu životinjsku vrstu nastaju mliječni pupovi iz kojih urastaju primarni i sekundarni izdanci, dajući osnovu budućem sustavu mliječnih kanala i žljezdanog parenhima (SCHLAFER i FOSTER, 2016.).

Daljnji razvoj mliječne žlijezde zbiva se pod snažnim utjecajem spolnih hormona. Početkom puberteta estrogen potiče proliferaciju terminalnih pupova na završecima mliječnih kanala, čime započinje intenzivniji razvoj dukalnog sustava. Tijekom gravidnosti progesteron stimulira produljenje i razgranavanje mliječnih kanala te razvoj lobula iz kojih nastaju sekretorni alveoli, osnovne funkcionalne jedinice mliječne žlijezde. Istodobno prolaktin potiče diferencijaciju alveolarnih stanica u sekretorne stanice zadužene za sintezu mlijeka. Posljedično, u vrijeme porođaja mliječna je žlijezda građena od dobro razvijenog sustava mliječnih kanala, lobula i alveola koji omogućuju stvaranje i izlučivanje mlijeka putem bradavice (SORENMO i sur., 2011.; RAVAL i sur., 2024.).

Nakon završetka laktacije mliječna žlijezda prolazi proces involucije tijekom kojega dolazi do postupne regresije sekretornih alveola, dok dukalni sustav ostaje očuvan (SORENMO i sur., 2011.; RAVAL i sur., 2024.). Regresija alveola započinje približno deset dana nakon porođaja, a završava oko četrdesetog dana postpartalno. Slične, iako manje izražene morfološke promjene mogu se uočiti i tijekom pseudogravidnosti (SORENMO i sur., 2011.).

Većina kuja ima pet pari mliječnih žlijezda, iako se povremeno mogu naći četiri ili šest parova. Dva para smještena su u torakalnoj regiji (M1 i M2), dva u abdominalnoj (M3 i M4), a jedan u ingvinalnoj regiji (M5). Svaka bradavica sadržava sedam do šesnaest otvora mliječnih kanala, pri čemu svaki kanal razvija zaseban režanj koji je funkcionalno neovisna jedinica žlijezde. Do puberteta, rast mliječne žlijezde zbiva se proporcionalno rastu organizma, dok razvoj mliječnih kanala ostaje ograničen na područje neposredno uz bradavicu (SORENMO i sur., 2011.).

Histološki, normalna mliječna žlijezda građena je od alveola i mliječnih kanala obloženih luminalnim epitelom, okruženim mioepitelnim stanicama. Žljezdani parenhim podupire stroma sastavljena od vezivnog i masnog tkiva, u kojoj se nalaze krvne i limfne žile te živci (SORENMO i sur., 2011.; RAVAL i sur., 2024.).

Luminalne epitelne i mioepitelne stanice imaju važnu ulogu u histogenezi tumora mliječne žlijezde, a njihova proliferacija i diferencijacija pridonose histološkim i imunofenotipskim obilježjima različitih tipova tumora (SORENMO i sur., 2011.; GOLDSCHMIDT i sur., 2011.).

U kuja s tumorima mliječne žlijezde može doći do promjena limfne drenaže. U kaudalnim mliječnim žlijezdama mogu se uspostaviti limfne veze s aksilarnim limfnim čvorom, a limfna drenaža može uključivati i limfne žile medijalne strane bedra te poplitealni limfni čvor. Poznavanje obrazaca limfne drenaže važno je za razumijevanje mogućih puteva limfogenog širenja tumora (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.).

2.2. TUMORI MLIJEČNE ŽLIJEZDE PASA

2.2.1. Opća obilježja

Uz neoplastične promjene, u mliječnoj žlijezdi pasa mogu se razviti i različite neneoplastične lezije, među kojima su česte cistična dilatacija mliječnih kanala, hipertrofija i hiperplazija mliječne žlijezde. Stoga svaka tvorba u području mliječne žlijezde nije nužno neoplastična promjena, što je potrebno uzeti u obzir pri diferencijalnoj dijagnostici (SCHLAFFER i FOSTER, 2016.).

Tumori mliječne žlijezde u kuja nastaju iz različitih staničnih populacija, uključujući luminalne epitelne, mioepitelne i mezenhimne stanice. Raznolikost njihovih morfoloških obilježja očituje se brojnim histološkim tipovima benignih i malignih tumora. Izražena histološka i molekularna heterogenost povezana je s razlikama u njihovu biološkom ponašanju i prognostičkom ishodu (SORENMO i sur., 2011.; ABDELMEGEED i MOHAMMED, 2018.; NOSALOVA i sur., 2024.).

Temelj konačne dijagnoze i razlikovanja benignih od malignih tumora jest histopatološka pretraga rutinski obojenih preparata hematoksilinom i eozinom (HE), kojom se procjenjuju morfološka obilježja važna za određivanje biološkog potencijala tumora (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.).

Inicijalni događaji u nastanku tumora mliječne žlijezde nisu u potpunosti razjašnjeni. Klinički i histopatološki nalazi podupiru mogućnost neoplastične progresije od benignih prema malignim tumorima, pri čemu maligni tumori mogu biti završni stadij postupnog razvoja tumora mliječne žlijezde kuja (SORENMO i sur., 2009.). Atipična duktalna hiperplazija također se smatra mogućom prekursorskom promjenom, pri čemu su u tim lezijama utvrđene morfološke i molekularne promjene koje upućuju na njihovu moguću ulogu u malignoj neoplastičnoj transformaciji (FERREIRA i sur., 2012.).

Klinička slika

Pri prvom kliničkom pregledu u kuja je često istodobno prisutno više tumora mliječne žlijezde. Tumori mogu znatno varirati veličinom, od malih čvorova slučajno otkrivenih palpacijom, do velikih tvorbi, a mogu biti pomični ili fiksirani za kožu i dublja tkiva te ulcerirani (SORENMO i sur., 2011.). Tumori se najčešće razvijaju u kaudalnim abdominalnim (MG4) i ingvinalnim (MG5) mliječnim kompleksima, dok su kranijalni torakalni (MG1), kaudalni torakalni (MG2) i kranijalni abdominalni (MG3) kompleksi zahvaćeni rjeđe. Unatoč prisutnosti

jedne ili više tumorskih tvorbi, većina kuja u trenutku postavljanja dijagnoze ne pokazuje znakove sistemske bolesti te je dobrog općeg stanja. Ulceracija kože češće se pojavljuje kod većih tumora, dok se u uznapredovaloj metastatskoj bolesti mogu razviti kaheksija i dispneja. Poseban je klinički oblik upalni karcinom mliječne žlijezde, izrazito agresivan oblik bolesti koji zbog izraženih upalnih promjena može nalikovati na akutni erozivni ili ulcerativni dermatitis (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.).

Većina kuja pri postavljanju dijagnoze ne pokazuje znakove sistemske bolesti te je, unatoč prisutnosti jedne ili više palpabilnih tvorbi, dobrog općeg stanja. Ulceracija kože najčešće se pojavljuje kod većih tumora, dok se u uznapredovaloj metastatskoj bolesti mogu razviti kaheksija i dispneja. Iznimka je upalni karcinom mliječne žlijezde, izrazito agresivan oblik tumora koji zbog izraženih upalnih promjena može nalikovati na akutni erozivni ili ulcerativni dermatitis (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.).

2.2.2. Epidemiologija i čimbenici rizika

Tumori mliječne žlijezde ubrajaju se među najčešće neoplastične bolesti pasa, osobito nekastriranih kuja, dok se u mužjaka pojavljuju sporadično (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.). Njihova se učestalost razlikuje među pojedinim populacijama i geografskim područjima, a na razvoj tumora utječu brojni čimbenici, uključujući dob, reproduktivni status, hormonsku izloženost, pasminsku predispoziciju, genetske osobitosti te okolišne i prehrambene čimbenike (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.; VAZQUEZ i sur., 2023.).

Tumori mliječne žlijezde čine približno 50 – 70 % svih neoplazija dijagnosticiranih u nekastriranih kuja (SORENMO i sur., 2011.). Ukupna prevalencija ovih tumora u oba spola iznosi 2 – 4 % (SCHLAFFER i FOSTER, 2016.). Jedno od prvih velikih epidemioloških istraživanja, provedeno u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), pokazalo je incidenciju od 198 tumora mliječne žlijezde na 100 000 pasa godišnje, pri čemu su tumori mliječne žlijezde činili 41,7 % svih neoplazija u nekastriranih kuja (DORN i sur., 1968.). Visoka učestalost tumora mliječne žlijezde zabilježena je i u longitudinalnom istraživanju provedenom na populaciji biglova u SAD-u, u kojemu je tijekom životnog vijeka najmanje jedan tumor mliječne žlijezde razvilo 70,8 % kuja, dok su višestruki tumori utvrđeni u 60,7 % životinja (BENJAMIN i sur., 1999.). Dosadašnja istraživanja pokazuju da je učestalost tumora mliječne

žlijezde kuja u Republici Hrvatskoj u skladu s podacima objavljenima u međunarodnoj literaturi (GUDAN KURILJ, 2009.).

Omjer benignih i malignih neoplazija mliječne žlijezde u pasa teško je precizno odrediti. U zemljama u kojima se kuje uobičajeno kastriraju, ukupna je incidencija tumora mliječne žlijezde niža, ali je među dijagnosticiranim tumorima relativni udio malignih promjena viši. U većini istraživanja između 20 i 80 % kirurški uklonjenih i histopatološki pregledanih tumora mliječne žlijezde pasa klasificirano je kao maligno, dok se u novijim preglednim radovima navodi da približno polovica svih tumora pripada malignim histopatološkim oblicima (VAZQUEZ i sur., 2023.).

Etiologija tumora mliječne žlijezde kuja složena je i nije u potpunosti razjašnjena. Dosadašnja istraživanja pokazuju da su s njihovim nastankom i razvojem povezani brojni čimbenici rizika, uključujući reproduktivni status, hormonsku izloženost, životnu dob, genetske čimbenike, pasminsku predispoziciju te okolišne i prehrambene čimbenike (SLEECKX i sur., 2011.; GOLDSCHMIDT i sur., 2017.; KASZAK i sur., 2018.).

Dob

Životna dob važan je čimbenik povezan s pojavom tumora mliječne žlijezde u kuja. Tumori mliječne žlijezde najčešće se dijagnosticiraju u kuja srednje i starije životne dobi. U usporedbi s malignim tumorima, benigni tumori češće se dijagnosticiraju u mlađih kuja. (PASTOR i sur., 2018.; VAZQUEZ i sur., 2023.). Prosječna životna dob kuja s benignim tumorima mliječne žlijezde iznosila je osam i pol godina, a kuja s malignim tumorima devet i pol godina, pri čemu je razlika između skupina bila statistički značajna (SORENMO i sur., 2009.). Noviji radovi navode da se benigni tumori najčešće dijagnosticiraju u dobi od sedam do devet godina, dok se maligni pretežito utvrđuju u kuja starijih od osam godina, uz medijan dobi pri postavljanju dijagnoze između osam i deset godina (PASTOR i sur., 2018.; VAZQUEZ i sur., 2023.).

Reproduktivni status

Dob u kojoj je provedena kastracija povezana je s rizikom od razvoja tumora mliječne žlijezde. Relativni rizik od razvoja tumora mliječne žlijezde iznosio je približno 0,5 % u kuja kastriranih prije prvog estrusa, 8 % nakon prvog te 26 % nakon drugog estrusa (SCHNEIDER i sur., 1969.). Povezanost reproduktivnog statusa s pojavom tumora mliječne žlijezde prikazana

je i u novijem istraživanju, u kojemu su nekastrirane kuje bile zastupljenije među životinjama s tumorima mliječne žlijezde te su češće imale višestruke tumore (GEDON i sur., 2022.).

Pasminska predispozicija

Iako je u većini istraživanja utvrđena veća učestalost tumora u čistokrvnih nego u križanih pasa i mješanaca, ne postoji jedinstveno mišljenje o pasminama s najvećim rizikom (VAZQUEZ i sur., 2023.). Dobiveni rezultati razlikuju se ovisno o geografskom području, načinu provođenja istraživanja i analiziranoj populaciji. U različitim je zemljama povećana učestalost tumora opisana u retrivera, španijela, vodenih pasa, samojeda, dobermana, šnaucera, jorkširskih terijera, njemačkih ovčara i boksera (VAZQUEZ i sur., 2023.).

Veća zastupljenost tumora mliječne žlijezde utvrđena je u malih pasmina, osobito malteških psića, jorkširskih terijera, ši-cua i pudla, pri čemu među navedenim pasminama nije utvrđena značajna razlika u omjeru benignih i malignih neoplazija. Razlike u riziku opisane su i između pojedinih uzgojnih linija unutar iste pasmine, što upućuje na moguću nasljednu komponentu razvoja (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.). Razlike u sklonosti razvoju tumora mliječne žlijezde utvrđene su i između dviju maternalnih linija biglova, pri čemu je jedna pokazivala povećanu osjetljivost, a druga relativnu otpornost na razvoj tumora (SCHAFER i sur., 1998.).

Hormonalni čimbenici rizika

U kuja i žena steroidni hormoni jajnika imaju ključnu ulogu u regulaciji rasta, razvoja i fiziološke funkcije mliječne žlijezde. Međutim, njihov proliferativni učinak na epitelne stanice može stvoriti pogodne uvjete za nastanak i razvoj neoplastičnih promjena. Estrogeni i progesteron stoga se smatraju jednim od najvažnijih hormonskih čimbenika uključenih u etiologiju tumora mliječne žlijezde (BENAVENTE i sur., 2016.).

Tijekom lutealne faze reproduktivnog ciklusa mliječna je žlijezda izložena visokim koncentracijama progesterona, koji potiče lokalnu sintezu hormona rasta (engl. *growth hormone*, GH). Smatra se da lokalno sintetiziran GH potiče aktivaciju matičnih stanica mliječne žlijezde te je jedan od ranih događaja u procesu karcinogeneze (QUEIROGA i sur., 2008.).

Estrogeni mogu pridonijeti karcinogenezi inhibicijom apoptoze te induciranjem genetskih i epigenetskih promjena koje reguliraju ekspresiju gena uključenih u proliferaciju i diferencijaciju stanica (KUMARAGURUPARAN i sur., 2006.). Osim toga, estrogenom

inducirana proliferacija povećava vjerojatnost nastanka genetskih promjena, dok metaboliti nastali oksidacijskim metabolizmom estradiola mogu imati izravan genotoksični učinak (TORRES i sur., 2021.). U kuja s malignim tumorima mliječne žlijezde utvrđene su veće koncentracije steroidnih hormona u serumu i homogenatima tumorskoga tkiva nego u kuja s benignim tumorima, što upućuje na mogućnost da steroidni hormoni djeluju kao lokalni čimbenici rasta i potiču proliferaciju tumorskih stanica (BENAVENTE i sur., 2016.).

GH povećava koncentraciju čimbenika rasta I sličnog inzulinu (engl. *insulin-like growth factor I*, IGF-I), koji zatim potiče proliferaciju stanica mliječne žlijezde i djeluje kao lokalni čimbenik rasta, pridonoseći razvoju i održavanju tumora (QUEIROGA i sur., 2008.; BENAVENTE i sur., 2016.). Za razliku od toga, pseudogavidnost nije povezana s povećanim rizikom od razvoja tumora mliječne žlijezde (VERONESI i sur., 2003.). Primjena progesterona u svrhu kontracepcije može potaknuti razvoj benignih tumora mliječne žlijezde u kuja. Sintetski progestageni, poput medroksiprogesteron-acetata, u tkivu mliječne žlijezde izazivaju učinke slične endogenom progesteronu te mogu pridonijeti razvoju benignih proliferativnih promjena i tumora mliječne žlijezde (VAZQUEZ i sur., 2023.).

Prehrambeni, genetski i drugi čimbenici rizika

Pretilost je čimbenik rizika za rani razvoj tumora mliječne žlijezde većeg stupnja malignosti te je povezana s kraćim preživljenjem oboljelih kuja (TESI i sur., 2020.). Mlade kuje s prekomjernom tjelesnom masom, hranjene prehranom bogatom crvenim mesom, imaju povećan rizik od razvoja tumora mliječne žlijezde i displastičnih promjena (PÉREZ-ALENZA i sur., 1998.). Rizik od razvoja karcinoma mliječne žlijezde značajno je manji u kastriranih kuja mršavijega i srednjega gojnog stanja (SONNENSCHNAIN i sur., 1991.). U pasa je nakon kirurškog uklanjanja malignih tumora opisana moguća povezanost prehrane s niskim udjelom masti i visokim udjelom proteina s duljim vremenom preživljenja, no navedena opažanja potrebno je potvrditi dodatnim prospektivnim studijama (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.).

U žena je povećan rizik od razvoja karcinoma dojke povezan s mutacijama gena *BRCA1* i *BRCA2*. U pasa njihova uloga još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, a dostupni rezultati nisu jednoznačni. Ispitivanjem deset gena povezanih s razvojem karcinoma dojke utvrđeno je da su jedino *BRCA1* i *BRCA2* bili značajno povezani s razvojem tumora mliječne žlijezde pasa (RIVERA i sur., 2009.; KASZAK i sur., 2018.). U malignim tumorima mliječne žlijezde utvrđena je smanjena nuklearna ekspresija proteina BRCA1 uz istodobno povećanje njegove

citoplazmatske ekspresije. Gubitak nuklearne ekspresije proteina BRCA1 bio je povezan s višim proliferacijskim indeksom, negativnom ekspresijom ER α i drugim obilježjima malignosti, što upućuje na moguću ulogu ovog proteina u progresiji tumora (NIETO i sur., 2003.). Za *BRCA2* dostupni su oskudniji podaci. Dosadašnja istraživanja upućuju na smanjenu ekspresiju ovoga gena u tumorima mliječne žlijezde u odnosu na normalno tkivo, no njegova uloga u nastanku i progresiji tumora još uvijek nije dovoljno razjašnjena te zahtijeva daljnja istraživanja (KASZAK i sur., 2018.).

Osim gena *BRCA1* i *BRCA2*, u tumorima mliječne žlijezde pasa istraživana je i uloga tumorsupresorskoga gena *TP53* te protoonkogen HER2. Brojna su istraživanja pokazala da su poremećaji njihove ekspresije povezani s nastankom i progresijom tumora mliječne žlijezde pasa, no njihova prognostička i biološka uloga još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (RUNGSIPIAT i sur., 1999.; DUTRA i sur., 2004.; KASZAK i sur., 2018.; VAZQUEZ i sur., 2023.).

2.2.3. Patogeneza

Hormonski receptori i hormonska ovisnost tumora

Učinci hormona i čimbenika rasta u mliječnoj žlijezdi posredovani su njihovim vezanjem za specifične receptore ciljnih stanica. U normalnom i neoplastičnom tkivu mliječne žlijezde opisani su ER, PR, prolaktinski receptori (engl. *prolactin receptor*, PRLR) i androgeni receptori (engl. *androgen receptor*, AR), receptor epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), receptor hormona rasta (engl. *growth hormone receptor*, GHR) i receptor hormona koji oslobađa luteinizacijski hormon (engl. *luteinizing hormone-releasing hormone receptor*, LHRHR). Poremećena regulacija i međusobno djelovanje ovih signalnih puteva imaju važnu ulogu u nastanku i razvoju tumora mliječne žlijezde pasa (SORENMO i sur., 2011.; GOLDSCHMIDT i sur., 2017.).

Estrogen svoje učinke ostvaruje vezanjem za estrogenske receptore ER α i ER β , koji reguliraju ekspresiju gena odgovornih za rast, diferencijaciju i održavanje tkiva mliječne žlijezde (SORENMO i sur., 2011.; VAZQUEZ i sur., 2023.). Imunoreaktivnost ER receptora pretežito je smještena u jezgrama normalnih, benignih i malignih epitelnih stanica mliječne žlijezde, dok je ekspresija PR receptora također pretežito nuklearna te se utvrđuje u normalnim i neoplastičnim epitelnim i mioepitelnim stanicama (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.). U zdravom tkivu, benignim tumorima i bolje diferenciranim karcinomima, ekspresija ER α

uglavnom je očuvana, dok se tijekom progresije bolesti postupno smanjuje te je u karcinomima visokog stupnja malignosti često odsutna (NIETO i sur., 2000.; MOHR i sur., 2016.). Smanjena ekspresija ER-a povezana je s višim histološkim stupnjem malignosti, slabijom diferencijacijom tumora i postupnim gubitkom hormonske ovisnosti tijekom napredovanja bolesti (MOHR i sur., 2016.; VAZQUEZ i sur., 2023.). U većini istraživanja ekspresija ER-a i PR-a niža je u malignim nego u benignim tumorima i normalnom tkivu mliječne žlijezde, iako svi autori ne potvrđuju dosljedno takvu povezanost (NIETO i sur., 2000.; MARTÍN DE LAS MULAS i sur., 2005.; MAINENTI i sur., 2014.; GOLDSCHMIDT i sur., 2017.).

Progesteronom inducirana lokalna sinteza GH-a može djelovati autokrino i parakrino na stanice mliječne žlijezde, a prisutnost GHR-a u normalnom i neoplastičnom tkivu dodatno podupire njegovu lokalnu biološku ulogu (VAN GARDEREN i sur., 1999.). Iako se smatra da ovaj mehanizam pridonosi proliferaciji epitelnih stanica mliječne žlijezde, njegova uloga u patogenezi karcinoma mliječne žlijezde pasa još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (MOL i sur., 1999.; TIMMERMANS-SPRANG i sur., 2017.).

PRLR-ovi su prisutni u normalnom i neoplastičnom tkivu mliječne žlijezde pasa. Njihova se ekspresija značajno smanjuje tijekom maligne transformacije te je najniža u adenokarcinomima, što upućuje na postupan gubitak prolaktinske ovisnosti tijekom razvoja bolesti (RUTTEMAN i sur., 1986.; MICHEL i sur., 2012.; MOHR i sur., 2016.).

U humanoj medicini pojačana ekspresija ili amplifikacija gena *HER2* povezana je s agresivnijim biološkim ponašanjem karcinoma dojke, a receptor HER2 važan je prognostički i prediktivni biljeg te osnova za primjenu ciljane terapije (ABDELMEGEED i MOHAMMED, 2018.). U karcinomima mliječne žlijezde kuja rezultati istraživanja ekspresije receptora HER2 nisu jednoznačni. Povećana ekspresija ovog receptora povezana je s malignim fenotipom i višim histološkim stupnjem tumora (RUNGSIPIPAT i sur., 1999.; DUTRA i sur., 2004.). Međutim, kasnija istraživanja nisu dosljedno potvrdila povezanost ekspresije receptora HER2 s kliničko-patološkim obilježjima tumora ni njezinu prognostičku vrijednost, zbog čega njegova uloga u karcinomima mliječne žlijezde pasa još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (KASZAK i sur., 2018.; VAZQUEZ i sur., 2023.).

Receptori HER2 i EGFR pripadaju obitelji ErbB receptorskih tirozin-kinaza te aktiviraju povezane unutarstanične signalne puteve (ABDELMEGEED i MOHAMMED, 2018.). Povećana ekspresija receptora EGFR opisana je kod karcinoma mliječne žlijezde kuja,

u kojima je povezana s većim promjerom tumora, prisutnošću nekroze, višim mitotskim indeksom i histološkim stupnjem malignosti te metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (CARVALHO i sur., 2013.; GUIMARÃES i sur., 2014.).

Čimbenici rasta i signalni putevi u razvoju tumora

Tijekom razvoja tumora mliječne žlijezde sve veću važnost, uz hormonsku regulaciju, imaju čimbenici rasta i međusobno povezani signalni putevi koji sudjeluju u kontroli proliferacije, preživljenja, angiogeneze i invazivnosti tumorskih stanica (SORENMO i sur., 2011.; VAZQUEZ i sur., 2023.).

Među čimbenicima rasta uključenima u progresiju tumora mliječne žlijezde važnu ulogu ima signalni sustav GH i IGF. Receptor čimbenika rasta tipa I sličan inzulinu (IGF-IR) izražen je u normalnom i neoplastičnom tkivu mliječne žlijezde, što upućuje na moguću ulogu ovoga signalnog sustava u održavanju i progresiji tumora (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.; TIMMERMANS-SPRANG i sur., 2017.).

Osim signalnog sustava GH/IGF, važnu ulogu u progresiji tumora imaju i receptori iz obitelji ErbB, osobito EGFR (HER1) i HER2. Njihovom se aktivacijom pokreću međusobno povezani unutarstanični signalni putevi koji potiču proliferaciju i preživljenje tumorskih stanica te mogu pridonijeti agresivnijem biološkom ponašanju tumora (ABDELMEGEED i MOHAMMED, 2018.; VAZQUEZ i sur., 2023.).

Vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) ključan je regulator tumorske angiogeneze, a njegova se povećana ekspresija povezuje s malignim tumorima i posebno agresivnim oblicima, uključujući upalni karcinom mliječne žlijezde pasa (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.; RAPOSO i sur., 2017.). Istodobno, povećana ekspresija ciklooksigenaze 2 (engl. *cyclooxygenase-2*, COX-2) povezuje se s pojačanom proliferacijom, angiogenezom, invazivnošću i nepovoljnijom prognozom, dok promjene u signalnom putu transformacijskog čimbenika rasta β (engl. *transforming growth factor beta*, TGF- β) mogu pridonijeti progresiji tumora i povećanoj proliferacijskoj aktivnosti tumorskih stanica (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.).

Tumorski mikrookoliš

Tumorski mikrookoliš čine izvanstanični matriks, različite stromalne i imunosne stanice koje međusobnom komunikacijom s tumorskim stanicama reguliraju proliferaciju, angiogenezu,

invaziju i metastaziranje (ABDELMEGEED i MOHAMMED, 2018.; NOSALOVA i sur., 2024.).

Među najvažnijim sastavnicama tumorskog mikrokoliša ističu se fibroblasti povezani s tumorom (engl. *cancer-associated fibroblasts*, CAF), makrofagi povezani s tumorom (engl. *tumor-associated macrophages*, TAM), endotelne stanice i infiltrirajuće imunosne stanice. Lučenjem čimbenika rasta, citokina i proteaza te stanice sudjeluju u preoblikovanju izvanstaničnog matriksa i stvaranju uvjeta koji pogoduju razvoju tumora (ABDELMEGEED i MOHAMMED, 2018.; NOSALOVA i sur., 2024.). Kod karcinoma mliječne žlijezde kuja povećan broj TAM-a značajno je povezan s malignim fenotipom, pojačanom ekspresijom VEGF-a, infiltrativnim rastom i metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (RAPOSO i sur., 2015.). Veća zastupljenost TAM-a utvrđena je i u agresivnijim histološkim tipovima tumora te je povezana s kraćim ukupnim preživljenjem oboljelih pasa (MONTEIRO i sur., 2018.). Promjene u tumorskom mikrokolišu ne potiču samo rast tumora nego i stvaraju uvjete za razvoj invazivnog fenotipa stanica i njihovo metastaziranje, pri čemu je jedan od ključnih mehanizama epitelno-mezenhimna tranzicija (engl. *epithelial–mesenchymal transition*, EMT) (NOSALOVA i sur., 2024.).

Epitelno-mezenhimna tranzicija, invazija i metastaziranje

EMT je biološki proces tijekom kojega epitelne tumorske stanice postupno gube međustaničnu adheziju i druga epitelna obilježja te stječu mezenhimna svojstva. U tumorskom tkivu EMT omogućuje odvajanje tumorskih stanica od primarnog tumora, njihovu lokalnu invaziju i stvaranje metastaza (THIERY i sur., 2009.; DONGRE i WEINBERG, 2019.).

Tijekom EMT-a dolazi do smanjenja ekspresije biljega svojstvenih epitelnim stanicama, osobito E-kadherina, te povećanja ekspresije mezenhimnih biljega, uključujući vimentin i N-kadherin, što dovodi do slabljenja međustanične adhezije i povećanja migracijske sposobnosti tumorskih stanica. Istodobno se povećava ekspresija matriksnih metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinases*, MMP), koje razgradnjom bazalne membrane i izvanstaničnog matriksa omogućuju lokalnu invaziju tumorskih stanica i njihovo metastaziranje (DONGRE i WEINBERG, 2019.). Povećana ekspresija MMP-2 povezana je s metastatskom bolešću i nepovoljnijom prognozom (SANTOS i sur., 2011.).

U karcinomima mliječne žlijezde pasa gubitak ekspresije E-kadherina i proteina ZO-1 (engl. *zonula occludens-1*, ZO-1) te pojačana ekspresija vimentina i N-kadherina češće su

utvrđeni u malignim nego u benignim tumorima. Gubitak ekspresije E-kadherina bio je neovisno povezan s nižim jednogodišnjim preživljenjem, što upućuje na njegovu moguću prognostičku vrijednost (YOSHIDA i sur., 2014.). Istodobna ekspresija E-kadherina i vimentina bila je značajno veća u karcinomima histološkog stupnja malignosti II i III, nego kod stupnja I te u primarnim tumorima u usporedbi s odgovarajućim metastazama (RAPOSO-FERREIRA i sur., 2018.).

2.3. KLASIFIKACIJA TUMORA MLIJEČNE ŽLIJEZDE U PASA

2.3.1. Histološka klasifikacija

Dugi niz godina primjenjivala se histološka klasifikacija tumora mliječne žlijezde pasa odobrena od Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) (MISDORP i sur., 1999.). S razvojem novih spoznaja o histogenezi i biološkom ponašanju tumora pokazala se potreba za detaljnijom i preciznijom klasifikacijom. Klasifikacija predložena 2011. godine obuhvatila je 23 maligna i 7 benignih podtipova tumora mliječne žlijezde pasa (GOLDSCHMIDT i sur., 2011.). Klasifikacija je naknadno revidirana i ažurirana 2019. u okviru klasifikacije tumora domaćih životinja (ZAPPULLI i sur., 2019.).

Tumori mliječne žlijezde pasa mogu biti epitelnog podrijetla (npr. jednostavni adenom i jednostavni karcinom), mezenhimnog podrijetla (npr. fibrosarkom, osteosarkom i drugi sarkomi) ili mogu sadržavati proliferaciju luminalnih i mioepitelnih stanica, svojstvenu složenim adenomima i složenim karcinomima, odnosno epitelnu i mezenhimnu komponentu, svojstvene benignom mješovitom tumoru i karcinosarkomu. Mezenhimne novotvorine i tumori s proliferacijom mioepitelnih stanica znatno su češći u pasa nego u žena, u kojih se pojavljuju iznimno rijetko (GOLDSCHMIDT i sur., 2011.; VAZQUEZ i sur., 2023.).

Najčešći su podtipovi malignih tumora mliječne žlijezde pasa adenokarcinomi, karcinosarkomi, solidni karcinomi, papilarni karcinomi i složeni karcinomi. Najčešći benigni oblici uključuju duktalne papilome, fibroadenome, jednostavne adenome i benigne mješovite tumore (MANJUNATHA REDDY i sur., 2009.; SALAS i sur., 2015.). Karakteristična histološka obilježja malignih tumora uključuju nepravilan uzorak raspodjele kromatina, destruktivan način rasta, diskontinuirane bazalne membrane, invaziju krvnih i limfnih žila, nekrozu, visok mitotski indeks te izražen stanični pleomorfizam. Nasuprot tomu, benigni tumori mliječne žlijezde najčešće su inkapsulirani i ne pokazuju invazivan rast (MISDORP, 2002.; SLEECKX i sur., 2011.).

Za razliku od klasifikacije karcinoma dojke u žena, pojmovi „duktalni” i „lobularni” u klasifikaciji tumora pasa ne označavaju histogenetsko podrijetlo tumora jer većina neoplazija nastaje u terminalnoj duktalno-lobularnoj jedinici. Stoga se klasifikacija temelji ponajprije na morfološkom obrascu rasta i sastavu tumora, odnosno prisutnosti epitelnih, mioepitelnih i mezenhimnih komponenti (GOLDSCHMIDT i sur., 2017.).

2.3.2. Histopatološko stupnjevanje karcinoma

Histopatološko stupnjevanje karcinoma mliječne žlijezde pasa jedan je od ključnih prognostičkih pokazatelja. U veterinarskoj medicini primjenjuje se prilagođeni Nottinghamov (Elston–Ellis) sustav stupnjevanja, koji se temelji na procjeni triju morfoloških obilježja: stupnja formiranja tubula, nuklearnog pleomorfizma i broja mitoza (GOLDSCHMIDT i sur., 2011.; PEÑA i sur., 2013.; GOLDSCHMIDT i sur., 2017.). Zbroj bodova određuje histološki stupanj malignosti, pri čemu viši stupanj odražava slabiju diferencijaciju, veću proliferacijsku aktivnost i agresivnije biološko ponašanje tumora (VAZQUEZ i sur., 2023.). Prilagođeni sustav uzima u obzir izraženu histološku heterogenost tumora mliječne žlijezde pasa, uključujući procjenu kompleksnih i mješovitih tumora, kod kojih se stupnjevanje temelji ponajprije na malignoj epitelnoj komponenti. Stupanj malignosti, zajedno s podtipom, veličinom tumora, obrascem invazije, limfovaskularnom invazijom i statusom regionalnih limfnih čvorova, omogućuje pouzdaniju procjenu biološkog ponašanja i prognoze karcinoma mliječne žlijezde pasa. Viši stupanj povezan je s nepovoljnijom prognozom i kraćim preživljenjem (SORENMO, 2003.; GOLDSCHMIDT i sur., 2011.; RASOTTO i sur., 2017.; NUNES i sur., 2019.). Kriteriji histopatološkog stupnjevanja karcinoma mliječne žlijezde pasa prikazani su u Tablici 1 (Poglavlje Materijali i metode).

2.3.3. Molekularna klasifikacija karcinoma mliječne žlijezde kuja prema klasifikaciji humanog karcinoma dojke

Izvorni model molekularne klasifikacije PAM50 (engl. *prediction analysis of microarray 50*) razlikuje pet intrinzičnih molekularnih podtipova karcinoma dojke: luminalni A, luminalni B, HER2-obogaćeni (engl. *HER2-enriched*), *basal-like* i *normal-like* (PARKER i sur., 2009.). Zbog ograničene biološke i kliničke važnosti podtipa *normal-like*, suvremena literatura i klinička praksa uglavnom izdvajaju četiri klinički relevantna intrinzična molekularna podtipa: luminalni A, luminalni B, HER2-obogaćeni i *basal-like* (RIOS-HOYO i sur., 2025.). Luminalni A-podtip obilježava visoka ekspresija gena povezanih s estrogenskim receptorom te niska proliferacijska aktivnost. Luminalni B-podtip također pokazuje luminalni genski profil, ali uz izraženiju proliferacijsku aktivnost. HER2-obogaćeni podtip obilježen je pojačanom ekspresijom gena uključenih u signalni put HER2, dok *basal-like* podtip obilježava ekspresijski profil gena svojstven bazalnim stanicama normalne dojke (PARKER i sur., 2009.; RIOS-HOYO i sur., 2025.)

Budući da analiza ekspresije gena još uvijek nije rutinski dostupna u svakodnevnoj kliničkoj praksi, za približnu procjenu molekularnih podtipova primjenjuju se imunohistokemijski klasifikacijski modeli temeljeni na ekspresiji ER-a i PR-a, HER2 te proliferacijskog biljega Ki-67 (RIOS-HOYO i sur., 2025.).

S ciljem što pouzdanije procjene molekularnih podtipova primjenom imunohistokemije razvijeni su različiti klasifikacijski modeli. Imunohistokemijski klasifikacijski model koji je, uz ekspresiju estrogenskog receptora i HER2, uključivao citokeratine 5 i 6 (CK5/6) i EGFR omogućio je identifikaciju *basal-like* podtipa karcinoma dojke (NIELSEN i sur., 2004.). Imunohistokemijskim klasifikacijskim modelom temeljenim na ekspresiji hormonskih receptora, HER2 te bazalnih biljega CK5/6 i EGFR definirani su dodatni imunofenotipski podtipovi s prognostičkim značenjem (BLOWS i sur., 2010.). Trostruko negativni imunofenotip i *basal-like* podtip međusobno se znatno preklapaju, ali nisu istovjetne kategorije jer negativna ekspresija ER-a, PR-a i HER2 sama po sebi nije dovoljna za svrstavanje karcinoma u podtip *basal-like* (NIELSEN i sur., 2004.; ABADIE i sur., 2018.).

Zbog brojnih histoloških, bioloških i molekularnih sličnosti između karcinoma dojke u žena i karcinoma mliječne žlijezde kuja, u istraživanjima karcinoma u kuja primjenjivani su imunohistokemijski klasifikacijski modeli razvijeni za karcinom dojke u žena. ABADIE i sur. (2018.) primijenili su imunohistokemijske klasifikacijske modele koje su predložili NIELSEN i sur. (2004.) i BLOWS i sur. (2010.) kako bi procijenili pripadnost invazivnih karcinoma mliječne žlijezde kuja odgovarajućim molekularnim podtipovima. U objema imunofenotipskim klasifikacijama luminalni A i luminalni 1+ podtipovi bili su povezani sa značajno duljim intervalom bez bolesti, ukupnim preživljenjem i specifičnim preživljenjem u usporedbi s trostruko negativnim karcinomima (ABADIE i sur., 2018.).

2.4. TROSTRUKO NEGATIVNI KARCINOMI

Trostruko negativni karcinomi mliječne žlijezde u kuja među najvažnijim su molekularnim podtipovima zbog izražene biološke agresivnosti, nepovoljne prognoze i brojnih sličnosti s odgovarajućim podtipom karcinoma dojke u žena (AMIRKHANI NAMAGERDI i sur., 2020.). Ovaj je podtip definiran odsutnošću ekspresije ER-a i PR-a te izostankom prekomjerne ekspresije HER2. Zbog navedenih obilježja hormonska i anti-HER2 ciljana terapija nisu terapijske opcije u liječenju trostruko negativnih karcinoma (ZEINDLER i sur., 2019.). Istodobno, sve veći broj istraživanja pokazuje da trostruko negativni karcinomi imaju izraženiju imunogenost u usporedbi s ostalim molekularnim podtipovima, što ih čini osobito zanimljivima za razvoj novih imunoterapijskih pristupa (NOYCE i sur., 2011.; LIU i sur., 2018.). Navedene spoznaje naglašavaju potrebu za istraživanjem novih prognostičkih biljega i potencijalnih ciljeva terapijskog djelovanja, osobito molekula koje sudjeluju u regulaciji stanične adhezije i unutarstaničnih signalnih puteva (McLAUGHLIN i sur., 2013.; PAVLOVA i sur., 2013.). Zbog spontanog razvoja tumora u imunokompetentnom organizmu, očuvane tumorske heterogenosti i usporedivog biološkog ponašanja, karcinomi mliječne žlijezde kuja smatraju se vrijednim translacijskim modelom za istraživanje trostruko negativnog karcinoma dojke u ljudi (AMIRKHANI NAMAGERDI i sur., 2020.).

2.4.1. Razvoj imunohistokemijske klasifikacije trostruko negativnih karcinoma mliječne žlijezde kuja

Prvi sustavan pokušaj primjene molekularne klasifikacije razvijene za karcinom dojke u žena na spontane karcinome mliječne žlijezde kuja proveden je uporabom imunohistokemijskog panela koji je uključivao ER, HER2, citokeratin 5 (CK5), p63 i P-kadherin (GAMA i sur., 2008.). Analizom 102 karcinoma identificirana su četiri imunofenotipska podtipa: luminalni A (44,8 %), luminalni B (13,5 %), *basal-like* (29,2 %) i podtip s prekomjernom ekspresijom HER2 (8,3 %), dok je mali udio tumora (4,2 %) svrstan u fenotip *null* (GAMA i sur., 2008.).

Utvrđeno je da se pojedini imunofenotipovi razlikuju ne samo prema obrascu ekspresije biljega nego i prema biološkom ponašanju. Luminalni A-karcinomi bili su povezani s nižim histološkim stupnjem malignosti i manjom proliferacijskom aktivnošću, dok su *basal-like* tumori bili pretežno višega histološkog stupnja, pokazivali izraženiju proliferacijsku aktivnost te su bili značajno češće povezani s limfovaskularnom invazijom (GAMA i sur., 2008.). *Basal-*

like podtip bio je povezan s kraćim razdobljem bez bolesti i kraćim ukupnim preživljenjem, čime je prvi put potvrđena njegova izražena biološka agresivnost u karcinomima mliječne žlijezde kuja (GAMA i sur., 2008.). Na temelju tih rezultata autori su zaključili da su karcinomi mliječne žlijezde u kuja prikladan spontani model za istraživanje agresivnog *basal-like* podtipa karcinoma dojke u žena.

Primjenjivost imunohistokemijske klasifikacije naknadno je procijenjena u istraživanju provedenom na 45 malignih tumora mliječne žlijezde kuja uporabom panela koji je uključivao ER, PR, HER2, CK5/6 i citokeratin 14 (CK14) (SASSI i sur., 2010.). U toj su kohorti identificirani luminalni A (29 %), luminalni B (49 %) i *basal-like* (22 %) podtipovi, dok podtip s prekomjernom ekspresijom HER2 i *normal-like* podtip nisu utvrđeni (SASSI i sur., 2010.). Za razliku od prethodnog istraživanja, molekularni podtip nije pokazao neovisnu prognostičku vrijednost. Iako je luminalni B podtip bio češće zastupljen među tumorima višega histološkog stupnja, multivarijatna analiza pokazala je da su stadij bolesti i histološki stupanj malignosti ostali jedini neovisni prognostički čimbenici, dok molekularna klasifikacija nije značajno pridonijela procjeni ishoda bolesti (SASSI i sur., 2010.).

Prijelomnica u istraživanju molekularne heterogenosti karcinoma mliječne žlijezde u kuja bilo je multicentrično istraživanje provedeno na 350 invazivnih karcinoma, u kojemu su prvi put dosljedno primijenjeni standardizirani kriteriji imunohistokemijske klasifikacije razvijeni za karcinom dojke u žena (ABADIE i sur., 2018.). Primjenom Nielsenove klasifikacije luminalni A-podtip bio je zastupljen u 14,3 % karcinoma, luminalni B-podtip u 9,4 %, trostruko negativni *basal-like* podtip u 58,6 %, a trostruko negativni *non-basal-like* podtip u 17,7 % slučajeva (ABADIE i sur., 2018.). Primjenom Blowsove klasifikacije identificirani su luminalni 1– (11,4 %), luminalni 1+ (12,3 %), *core basal phenotype* (58,6 %) i *five-negative phenotype* (17,7 %), dok podtip s prekomjernom ekspresijom HER2 nije utvrđen ni u jednom slučaju primjenom standardiziranih kriterija ocjenjivanja HER2 (ABADIE i sur., 2018.).

Posebno je značajan nalaz da su trostruko negativni karcinomi činili čak 76,3 % svih invazivnih karcinoma u ispitivanoj populaciji (ABADIE i sur., 2018.). U odnosu na luminalne podtipove bili su povezani s većom veličinom tumora, većim mitotskim indeksom i većim proliferacijskim indeksom Ki-67, što upućuje na agresivnije biološko ponašanje (ABADIE i sur., 2018.).

Analiza preživljenja pokazala je da su luminalni A-karcinomi imali najpovoljniji klinički tijek, uz najdulje razdoblje bez bolesti, ukupno preživljenje i specifično preživljenje povezano s tumorom, dok su trostruko negativni karcinomi bili povezani sa značajno nepovoljnijim ishodom bolesti (ABADIE i sur., 2018.). Nakon prilagodbe za patološki stadij bolesti, luminalni A-imunofenotip zadržao je neovisnu prognostičku vrijednost u odnosu na trostruko negativne podtipove, potvrđujući kliničku važnost imunofenotipske klasifikacije kod karcinoma mliječne žlijezde kuja (ABADIE i sur., 2018.). Uz imunofenotipsku klasifikaciju, neovisnim prognostičkim čimbenicima pokazali su se patološki stadij bolesti, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, veličina tumora, proliferacijska aktivnost određena indeksom Ki-67 te izraženost upalne reakcije u okolini tumora (ABADIE i sur., 2018.).

Na temelju ekspresije ER α , PR i HER2 tumori razvrstani su u četiri imunofenotipska podtipa: luminalni A (48,4 %), luminalni B (21,9 %), HER2-obogaćeni (15,6 %) i trostruko negativni (14,1 %) (RAZAVIRAD i sur., 2024.). Dodatno je potvrđen prognostički značaj imunofenotipske klasifikacije, pri čemu je trostruko negativni podtip bio povezan s najkraćim razdobljem bez bolesti u usporedbi s ostalim imunofenotipskim podtipovima (RAZAVIRAD i sur., 2024.).

2.4.2. Suvremene spoznaje o molekularnim obilježjima

Nakon uspostavljanja imunohistokemijske klasifikacije, novija istraživanja usmjerena su na proučavanje molekularnih mehanizama odgovornih za agresivno biološko ponašanje trostruko negativnih karcinoma. Analizom ključnih signalnih puteva uključenih u nastanak i progresiju trostruko negativnog karcinoma dojke u žena i karcinoma mliječne žlijezde kuja utvrđeni su zajednički poremećaji signalnih puteva EGFR, PI3K/AKT/mTOR (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mechanistic target of rapamycin*), Hippo (engl. *Hippo signaling pathway*), PD-1/PD-L1 (engl. *programmed cell death protein 1/programmed death-ligand 1*) i piroptoze. Poremećena je regulacija ovih signalnih puteva molekularna osnova translacijske vrijednosti psećeg modela, pri čemu međusobno povezane signalne mreže, a ne pojedinačni biljezi, imaju ključnu ulogu u proliferaciji, invaziji, metastaziranju i razvoju terapijske rezistencije (MEI i sur., 2025.).

Mutacije gena *TP53*, jednog od najčešće mutiranih gena kod trostruko negativnih karcinoma dojke u žena, kao i poremećaji njegove ekspresije opisani kod karcinoma mliječne žlijezde kuja, povezani su s obilježjima agresivnijeg biološkog ponašanja, uključujući viši

histološki stupanj i povećanu proliferacijsku aktivnost (WEISMAN i sur., 2016.; DOLKA i sur., 2016.). Povećana ekspresija VEGF-a jedno je od najdosljednijih obilježja progresije ovih tumora u objema vrstama, a u pasa je povezana s većom gustoćom mikrovaskularizacije, višim histološkim stupnjem, metastazama u limfnim čvorovima i upalnim karcinomima (FERREIRA i sur., 2026.). Povećana ekspresija EGFR-a povezana je s veličinom tumora, nekrozom, većim brojem mitozama, višim histološkim stupnjem i metastaziranjem (CARVALHO i sur., 2013.). U ljudi i pasa smanjena ekspresija E-kadherina povezana je s većim promjerom tumora, infiltrativnim rastom, vaskularnom invazijom, metastazama u limfnim čvorovima, višim histološkim stupnjem i kraćim ukupnim preživljenjem, pri čemu je gubitak ekspresije E-kadherina najizraženiji u trostruko negativnim karcinomima (FERREIRA i sur., 2026.).

2.4.3. Novi molekularni biljezi

U posljednjem su desetljeću istraživanja sve više usmjerena na molekule uključene u međustaničnu adheziju, regulaciju signalnih puteva, preoblikovanje tumorskog mikrookoliša i EMT (AMIRKHANI NAMAGERDI i sur., 2020.; MEI i sur., 2025.). Posebnu su pozornost privukli proteini iz porodice nektina i regulatori signalnog puta RAS, čija je poremećena regulacija opisana u brojnim malignim tumorima, uključujući trostruko negativne karcinome dojke u žena (MEI i sur., 2025.; FERREIRA i sur., 2026.).

2.5. RAS SIGNALIZACIJA I PROTEIN RASAL2

2.5.1. Signalni put RAS

Stanice primaju i obrađuju podražaje iz svoje okoline, pri čemu stanični odgovor ovisi o usklađenom djelovanju brojnih signalnih mehanizama. Među najvažnijima je signalni put RAS, koji regulira temeljne procese odgovorne za održavanje stanične i tkivne homeostaze (BOS i sur., 2007.; SIMANSHU i sur., 2017.). Njegova aktivnost treba biti precizno regulirana kako bi se signalni odgovor pravodobno pokrenuo i učinkovito prekinuo nakon prestanka djelovanja podražaja (SIMANSHU i sur., 2017.).

Funkcionalna aktivnost proteina RAS temelji se na njihovoj sposobnosti reverzibilnog prelaska između aktivnog oblika vezanoga za gvanozin-trifosfat (engl. *guanosine triphosphate*, GTP) i neaktivnog oblika vezanoga za gvanozin-difosfat (engl. *guanosine diphosphate*, GDP) (PAI i sur., 1989.; MILBURN i sur., 1990.). Takva izmjena omogućuje brzo uključivanje i isključivanje signalizacije te osigurava da se prijenos signala odvija samo tijekom djelovanja odgovarajućeg podražaja (VETTER i WITTINGHOFER, 2001.; SIMANSHU i sur., 2017.).

Aktivacija i inaktivacija proteina RAS ne zbivaju se spontano, već su pod strogim nadzorom regulacijskih proteina (BOS i sur., 2007.; SIMANSHU i sur., 2017.). Održavanje ravnoteže između aktivnog i neaktivnog oblika proteina RAS nužno je za pravilno funkcioniranje signalnog puta RAS (BERNARDS, 2003.; BOS i sur., 2007.; SIMANSHU i sur., 2017.).

2.5.2. Regulacija aktivnosti proteina RAS

Aktivacija proteina RAS omogućena je djelovanjem gvaninskih nukleotidnih izmjenjivača (engl. *guanine nucleotide exchange factors*, GEF), koji potiču otpuštanje GDP-a i vezanje GTP-a, čime RAS prelazi u aktivni oblik (BOS i sur., 2007.; CHERFILS i ZEGHOUF, 2013.; SIMANSHU i sur., 2017.).

Suprotno tomu, proteini koji aktiviraju GTP-aznu aktivnost (engl. *GTPase-activating proteins*, GAP) ubrzavaju intrinzičnu GTP-aznu aktivnost proteina RAS, potičući hidrolizu GTP-a u GDP i vraćajući RAS u njegovo neaktivno stanje (SCHEFFZEK i sur., 1997.; AHMADIAN i sur., 1997.; BOS i sur., 2007.; SIMANSHU i sur., 2017.).

Na taj način proteini GEF i GAP zajednički određuju intenzitet i trajanje RAS signalizacije (BOS i sur., 2007.; CHERFILS i ZEGHOUF, 2013.). Očuvanje ravnoteže nužno je za pravilno funkcioniranje stanice, dok njezin poremećaj rezultira produljenom aktivacijom signalnog puta RAS, što može pridonijeti nastanku i napredovanju malignih tumora (BERNARDS, 2003.; BOS i sur., 2007.; SIMANSHU i sur., 2017.).

2.5.3. Uloga proteina RASAL2 u nastanku i progresiji malignih tumora

Skupina proteina RAS-GAP obuhvaća 14 članova. Svi dijele zajedničku domenu RAS-GAP odgovornu za inaktivaciju proteina RAS, ali se razlikuju prema građi ostalih domena, načinu regulacije i biološkim funkcijama (BERNARDS, 2003.; McLAUGHLIN i sur., 2013.). Jedan od članova ove skupine jest RASAL2.

RASAL2 sudjeluje u negativnoj regulaciji RAS signalizacije ubrzavanjem hidrolize GTP-a u GDP. Za razliku od većine ostalih članova porodice proteina RAS-GAP, njegova uloga u razvoju tumora ovisi o molekularnim obilježjima tumora. U pojedinim tumorima protein RASAL2 djeluje kao tumorsupresor, dok u drugima ima protumorsku ulogu (McLAUGHLIN i sur., 2013.; FENG i sur., 2014.; LI i sur., 2014.). Jedno je od mogućih objašnjenja takve funkcionalne raznolikosti njegova posttranslacijska modifikacija fosforilacijom. Fosforilacija RASAL2 na serinskom ostatku Ser237 mijenja biološku aktivnost proteina te potiče proliferaciju, migraciju i invaziju tumorskih stanica. Razlika u omjeru fosforiliranog i nefosforiliranog oblika RASAL2 između ER-pozitivnih i ER-negativnih karcinoma dojke može biti jedan od čimbenika odgovornih za različitu biološku ulogu RASAL2 u pojedinim molekularnim podtipovima (WANG i sur., 2019.).

Funkcionalni gubitak proteina RASAL2 povezan je s povećanom aktivacijom RAS-a i njegovih signalnih puteva, uključujući signalni put MAPK/ERK (engl. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*), te s većom migracijom, invazivnošću i metastatskim potencijalom tumorskih stanica. U eksperimentalnim modelima ponovna ekspresija RASAL2 imala je suprotan učinak, dok je u mišjim modelima njegov gubitak bio povezan s izraženijim metastaziranjem luminalnih tumora mliječne žlijezde. U luminalnim B-karcinomima dojke u žena niža razina ekspresije gena RASAL2 povezana je s većim rizikom od recidiva i kraćim ukupnim preživljenjem bolesnika (McLAUGHLIN i sur., 2013.).

2.5.4. Protein RASAL2 u trostruko negativnim karcinomima dojke

Za razliku od luminalnih karcinoma dojke, u trostruko negativnim karcinomima, povećana ekspresija proteina RASAL2 povezana je s agresivnijim, invazivnim fenotipom tumorskih stanica, većim metastatskim potencijalom te nepovoljnijim kliničkim ishodom (FENG i sur., 2014.).

Protumorska aktivnost RASAL2 u trostruko negativnim karcinomima dojke zbiva se neovisno o njegovoj klasičnoj RAS-GAP aktivnosti. RASAL2 aktivira mali protein RAC1 koji veže GTP funkcionalnom inhibicijom proteina ARHGAP24 (engl. *Rho GTPase-activating protein 24*), negativnog regulatora aktivnosti proteina RAC1 (FENG i sur., 2014.).

U eksperimentalnim modelima smanjenje ekspresije RASAL2 ograničilo je migraciju i invaziju stanica trostruko negativnih karcinoma dojke te je smanjilo njihov metastatski potencijal, dok je njegova povećana ekspresija imala suprotan učinak (FENG i sur., 2014.).

U dostupnoj literaturi nisu pronađena objavljena istraživanja ekspresije RASAL2 u karcinomima mliječne žlijezde kuja niti povezanost ekspresije s histološkim obilježjima, molekularnim podtipovima ili kliničkim tijekom bolesti.

2.6. Protein NECTIN-4

2.6.1. Građa, fiziološka ekspresija i biološka uloga

Protein NECTIN-4 pripada porodici nektina, skupini kalcij-neovisnih adhezijskih molekula s domenama sličnima imunoglobulinu (engl. *Ca²⁺-independent immunoglobulin-like cell-cell adhesion molecules*) koje sudjeluju u uspostavi i održavanju međustaničnih spojeva. Građen je od izvanstaničnog dijela s tri domene slične imunoglobulinu, transmembranske domene i citoplazmatskog dijela povezanog s unutarstaničnim signalnim molekulama (REYMOND i sur., 2001.; TAKAI i sur., 2008.).

Nektini posreduju u homofilnim i heterofilnim međustaničnim interakcijama te sudjeluju u regulaciji adhezije, polariteta, migracije, proliferacije i diferencijacije stanica (REYMOND i sur., 2001.; TAKAI i sur., 2008.). Za razliku od ostalih članova porodice, ekspresija proteina NECTIN-4 u većini tkiva odraslog organizma vrlo je ograničena, dok je tijekom embrionalnog razvoja znatno izražena. Takav obrazac ekspresije potaknuo je istraživanja njegove uloge u razvoju malignih tumora te mogućnosti njegove primjene kao terapijske mete (REYMOND i sur., 2001.; TAKAI i sur., 2008.).

2.6.2. Uloga u nastanku i progresiji malignih tumora

Protein NECTIN-4 identificiran je kao jedan od ključnih čimbenika koji omogućuju rast i proliferaciju epitelnih stanica neovisno o kontaktu s izvanstaničnim matriksom, što je jedno od temeljnih obilježja maligne transformacije. Osim u održavanju međustanične adhezije, sudjeluje u stvaranju čvrstih veza između tumorskih stanica interakcijom s proteinom NECTIN-1 (engl. *nectin cell adhesion molecule 1*), čime omogućuje njihov daljnji rast i proliferaciju (PAVLOVA i sur., 2013.). U eksperimentalnim modelima karcinoma dojke smanjenje ekspresije ili blokiranje proteina NECTIN-4 monoklonskim protutijelima inhibiralo je proliferaciju i rast tumora, potvrđujući njegovu važnost kao potencijalne terapijske mete (PAVLOVA i sur., 2013.).

2.6.3. Protein NECTIN-4 u karcinomu dojke

Prvo opsežno istraživanje provedeno na humanom karcinomu dojke pokazalo je da se NECTIN-4 eksprimira u duktalnom karcinomu *in situ* i invazivnom karcinomu, dok je njegova ekspresija u normalnom tkivu mliječne žlijezde odsutna ili vrlo slabo izražena (FABRE-LAFAY i sur., 2007.). Povećana ekspresija bila je povezana s izraženijom ekspresijom EGFR-

a, p53 i P-kadherina te negativno s ekspresijom estrogenskih i progesteronskih receptora i transkripcijskog čimbenika GATA3 (engl. *GATA binding protein 3*). Autori su također opisali prisutnost cirkulirajućeg oblika proteina NECTIN-4 u serumu bolesnika te njegovu potencijalnu vrijednost kao serološkog biljega za praćenje progresije bolesti i odgovora na terapiju (FABRE-LAFAY i sur., 2007.).

Kliničko značenje proteina NECTIN-4 ovisi i o njegovoj unutarstaničnoj lokalizaciji. Membranska ekspresija bila je povezana s nepovoljnijim, a citoplazmatska s povoljnijim tijekom bolesti u pojedinim skupinama bolesnika, što upućuje na različitu biološku ulogu pojedinih obrazaca ekspresije (LATTANZIO i sur., 2014.).

Dosadašnja istraživanja upućuju na neujednačeno prognostičko značenje ekspresije proteina NECTIN-4 u trostruko negativnim karcinomima dojke. Njegova je ekspresija osobito izražena kod ovih karcinoma te je neovisan nepovoljan prognostički čimbenik. Povećana ekspresija povezana je s obilježjima nepovoljne prognoze, a njegova izraženost u tumorskim stanicama upućuje na potencijal proteina NECTIN-4 kao ciljne molekule za razvoj novih terapijskih pristupa (M-RABET i sur., 2017.). Suprotno navedenom, povećana ekspresija proteina NECTIN-4 u trostruko negativnim karcinomima dojke bila je povezana s nižim stadijem bolesti, odsutnošću zahvaćenosti limfnih čvorova i duljim ukupnim preživljenjem (ZEINDLER i sur., 2019.). Povećana ekspresija proteina NECTIN-4 povezana je s nepovoljnijom prognozom i u luminalnom B, HER2-negativnom podtipu karcinoma dojke, gdje je bila udružena s većim tumorima te kraćim ukupnim preživljenjem, razdobljem bez bolesti i razdobljem bez udaljenih metastaza (RAJC i sur., 2017.).

Osim dijagnostičkog i prognostičkog značaja, NECTIN-4 smatra se obećavajućom terapijskom metom, što potvrđuju pretklinička istraživanja usmjerena na razvoj ciljane terapije protiv ovog proteina (CHALLITA-EID i sur., 2016.; M-RABET i sur., 2017.).

2.6.4. Protein NECTIN-4 u pasa i njegova ekspresija u tumorima mliječne žlijezde kuja

Istraživanja proteina NECTIN-4 u veterinarskoj medicini znatno su oskudnija nego u humano. Dosadašnji radovi bili su usmjereni na molekularnu karakterizaciju psećeg proteina, njegovu ulogu receptora za morbiliviruse, ekspresiju u tumorima mliječne žlijezde kuja te mogućnost njegove primjene u onkolitičkoj viroterapiji (NOYCE i sur., 2013.; DOLU i AYDOGAN, 2018.; DELLA SALDA i sur., 2019.; SHOJI i sur., 2016.). Pseći NECTIN-4

pokazuje visok stupanj homologije s humanim proteinom, što potvrđuje očuvanost njegove strukture i važna je osnova za komparativna istraživanja.

Prvo istraživanje ekspresije proteina NECTIN-4 u karcinomima mliječne žlijezde u kuja proveli su SHOJI i sur. (2016.). Analizom staničnih linija i tkivnih uzoraka pokazali su da se NECTIN-4 eksprimira u dijelu karcinoma mliječne žlijezde kuja, dok u normalnom tkivu mliječne žlijezde nije utvrđena njegova ekspresija. Autori su također pokazali da ekspresija NECTIN-4 omogućuje selektivni ulazak rekombinantnog morbilivirusa u tumorske stanice, potvrđujući njegov potencijal kao ciljne molekule u razvoju terapijskih pristupa (SHOJI i sur., 2016.).

Ekspresija proteina NECTIN-4 u formalinom fiksiranim i parafinom uklopljenim (engl. *formalin-fixed, paraffin-embedded*, FFPE) karcinomima mliječne žlijezde kuja ispitana je na 30 tubulopapilarnih i složenih karcinoma. Imunoreaktivnost proteina NECTIN-4 utvrđena je u svim analiziranim tumorima, pri čemu je protein bio smješten u plazmatskoj membrani i citoplazmi tumorskih stanica, dok je u netumorskom tkivu ekspresija bila odsutna ili vrlo ograničena (DOLU i AYDOGAN, 2018.). U istom je istraživanju utvrđena jaka pozitivna povezanost ekspresije NECTIN-4 s proliferacijskim biljezima proliferacijskim staničnim nuklearnim antigenom (engl. *proliferating cell nuclear antigen*, PCNA) i Ki-67, što upućuje na povezanost povećane ekspresije ovog proteina s većom proliferacijskom aktivnošću tumorskih stanica. Autori navode da zbog izostanka podataka o kliničkom tijeku bolesti, metastaziranju i preživljenju nije bilo moguće procijeniti njegovo izravno prognostičko značenje (DOLU i AYDOGAN, 2018.).

2.7. KARCINOMI MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA KAO SPONTANI TRANSLACIJSKI MODEL ZA ISTRAŽIVANJE KARCINOMA DOJKE U LJUDI

Spontani karcinomi mliječne žlijezde kuja vrijedan su translacijski model za istraživanje karcinoma dojke u ljudi zbog brojnih kliničkih, patoloških i molekularnih obilježja zajedničkih objema vrstama (QUEIROGA i sur., 2011.; GRAY i sur., 2020.). Za razliku od eksperimentalnih mišjih modela, nastaju spontano u imunokompetentnom organizmu pod utjecajem prirodnih hormonskih, genetskih i okolišnih čimbenika te zadržavaju prirodnu histološku i molekularnu heterogenost tumora (GRAY i sur., 2020.). Takva obilježja omogućuju vjernije oponašanje bolesti u ljudi.

Na molekularnoj razini osobito su izražene sličnosti karcinoma mliječne žlijezde u kuja s trostruko negativnim karcinomima dojke u žena (AMIRKHANI NAMAGERDI i sur., 2020.). Zajednička obilježja obuhvaćaju prirodni tijek bolesti te poremećaje ključnih signalnih puteva uključenih u proliferaciju, apoptozu, angiogenezu, EMT i tumorski mikrookoliš (MEI i sur., 2025.; FERREIRA i sur., 2026.). Očuvanost navedenih molekularnih mehanizama potvrđuje translacijsku vrijednost spontanih karcinoma mliječne žlijezde kuja u istraživanju biologije trostruko negativnog karcinoma dojke i razvoju novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa (AMIRKHANI NAMAGERDI i sur., 2020.; MEI i sur., 2025.; FERREIRA i sur., 2026.).

Primjena molekularne klasifikacije razvijene za karcinom dojke u žena potvrdila je molekularne sličnosti između tumora u objema vrstama. Takva se klasifikacija može uspješno primijeniti i na karcinome mliječne žlijezde u kuja, pri čemu molekularni podtipovi pokazuju usporedive kliničko-patološke značajke i prognostičko značenje s onima u žena (RAZAVIRAD i sur., 2024.). Slično tomu, imunofenotipski podtipovi u kuja biološki su različite skupine tumora, a trostruko negativni karcinomi mliječne žlijezde pokazuju agresivniji prirodni tijek bolesti, usporediv s trostruko negativnim karcinomima u žena (ABADIE i sur., 2018.). Velika učestalost trostruko negativnih karcinoma mliječne žlijezde i mogućnost njihove pouzdane imunofenotipske klasifikacije dodatno podupiru uporabu spontanih karcinoma mliječne žlijezde kuja za istraživanje trostruko negativnih karcinoma dojke u žena (ABADIE i sur., 2018.; RAZAVIRAD i sur., 2024.).

Podudarnost ključnih prognostičkih čimbenika također podupire primjenu psećeg modela. Veličina tumora, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, histološki stupanj, status

hormonskih receptora i proliferacijska aktivnost imaju usporedivo prognostičko značenje u karcinomima mliječne žlijezde kuja i karcinomu dojke u žena (NGUYEN i sur., 2018.).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Karcinomi mliječne žlijezde kuja biološki su heterogena skupina tumora čije je kliničko ponašanje određeno složenim histološkim i molekularnim obilježjima. Unatoč znatnom napretku u razumijevanju njihove biologije, uloga molekularnih biljega RASAL2 i NECTIN-4 u karcinomima mliječne žlijezde kuja još uvijek nije dovoljno razjašnjena. Posebno nedostaju podaci o povezanosti njihove ekspresije s histološkim obilježjima, molekularnim podtipovima i biološkim ponašanjem tumora. Stoga je ovo istraživanje usmjereno na analizu ekspresije proteina RASAL2 i NECTIN-4 u karcinomima mliječne žlijezde kuja te utvrđivanje njihove povezanosti s histološkim obilježjima, molekularnim podtipovima i biološkim ponašanjem tumora, s posebnim naglaskom na trostruko negativne karcinome. Dobiveni rezultati mogli bi pridonijeti boljem razumijevanju biologije ovih tumora te procjeni vrijednosti RASAL2 i NECTIN-4 kao prognostičkih biljega u karcinomima mliječne žlijezde kuja.

Opći cilj istraživanja

Opći je cilj istraživanja usporedbom histopatoloških karakteristika, stupnja malignosti, vremena preživljenja, vremena bez bolesti i rezultata imunohistokemijske ekspresije biljega (ER, PR, HER2, RASAL2 i NECTIN-4) te gena *RASAL2* i *NECTIN4* utvrditi moguću povezanost ekspresije istraživanih gena i proteina s biološkim ponašanjem i histopatološkim tipom, s naglaskom na trostruko negativne karcinome mliječne žlijezde pasa.

Specifični ciljevi istraživanja

1. Imunohistokemijskom pretragom diferencirati trostruko negativne karcinome od drugih karcinoma mliječne žlijezde pasa na temelju potencijalne razlike u ekspresiji ER-a, PR-a i HER2.
2. Imunohistokemijskom pretragom i RT-qPCR-om istražiti ekspresiju RASAL2 i NECTIN-4 u karcinomima mliječne žlijezde pasa.

Hipoteza istraživanja

Postoji razlika u ekspresiji RASAL2 i NECTIN-4, između histoloških tipova karcinoma mliječne žlijezde te između trostruko negativnih i ostalih karcinoma (karcinomi izvan trostruko negativnog podtipa).

4. MATERIJALI I METODE

4.1. UZORKOVANJE KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA

Istraživanje je provedeno na arhiviranim uzorcima karcinoma mliječne žlijezde u kuja koji su analizirani u Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, za potrebe projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom *Lipidi hrane, spol i dob u patogenezi metaboličkog sindroma*.

Nakon kirurškog uklanjanja tumora, dostavljeni uzorci obrađeni su i uklopljeni u parafin te pohranjeni u parafinske blokove (35 uzoraka). Upotrijebljeni su zamrznuti uzorci istih tumora, koji su uzorkovani i neposredno nakon kirurškog zahvata pohranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (31 uzorak). Kao negativna kontrola za primjenu lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) upotrijebljeni su zamrznuti uzorci mliječne žlijezde istih životinja, koji nisu pokazivali makroskopske ni mikroskopske patološke promjene (3 uzorka). Svi su uzorci prikupljeni u razdoblju od 2017. do 2022. godine.

4.2. PRIKUPLJANJE PODATAKA O ŽIVOTINJAMA

Podaci o životinjama čiji su uzorci uključeni u istraživanje prikupljeni su na temelju potpisane *Izjave o suglasnosti vlasnika za korištenje tkiva, preostale krvi i podataka kliničkog praćenja životinja*. Na izjavama su većinom bili dostupni osnovni podaci o vlasnicima i životinjama, uključujući dob i pasminu. Dodatni podaci prikupljeni su telefonskim kontaktiranjem vlasnika ili, u slučajevima njihove nedostupnosti, putem privatnih veterinarskih organizacija koje su uzorke uputile na pretragu. Prikupljeni su podaci o kastracijskom statusu i dobi životinje u trenutku ovarijektomije ili ovariohisterektomije, pojavi proliferativnih promjena na mjestu kirurškog uklanjanja primarnog tumora, prisutnosti metastaza te vremenu preživljenja nakon operacije.

Prisutnost metastaza određena je na temelju podataka dobivenih ultrazvučnim i/ili radiografskim pregledom te citološkom ili histopatološkom pretragom. Pritom su nedostupni podaci označeni kao nepoznati. Podaci o kliničkom praćenju prikupljeni su početkom 2026. godine, pri čemu je od kirurškog zahvata do završetka praćenja proteklo najmanje četiri godine.

4.3. HISTOPATOLOŠKA PRETRAGA

Histopatološka pretraga provedena je u Laboratoriju za citologiju i histopatologiju Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci tumora izrađeni su postupkom standardne pripreme histopatološkog preparata koji uključuje fiksaciju uzorka u 4 %-tnom puferiranom formalinu, dehidraciju u histokinetu, uklapanje u parafin, rezanje parafinskih blokova mikrotomom, stavljanje rezova na predmetnice i bojenje HE metodom te poklapanje pokrovnim stakalcem. Preparati su pregledani svjetlosnim mikroskopom Nikon Eclipse 2000 pri povećanjima od 40×, 100×, 200× i 400×, a odabrani histopatološki nalazi fotografirani su pri povećanju od 200× digitalnom kamerom RisingCam BigEye10000KPA i pomoću računalnog programa Digicyte ResoluX, verzija 3.4.10.

Histopatološka klasifikacija tumora provedena je prema kriterijima GOLDSCHMIDT i sur. (2011.) i predstavlja suvremenu nadopunu ranije WHO klasifikacije tumora mliječne žlijezde kuja i mačaka (MISDORP i sur., 1999.).

Stupanj malignosti karcinoma mliječne žlijezde određen je prema kriterijima histološkog stupnjevanja, koji se temelje na sljedećim parametrima: stvaranje tubula, nuklearni pleomorfizam (varijabilnost veličine i oblika jezgri), mitotska aktivnost te hiperkromazija (GOLDSCHMIDT i sur., 2011.). Na temelju navedenih morfoloških parametara, svakom je karcinomu dodijeljen odgovarajući histološki stupanj malignosti, u skladu s prikazom u Tablici 1.

Tablica 1. Kriteriji za histološko stupnjevanje i određivanje stupnja malignosti karcinoma mliječne žlijezde prema GOLDSCHMIDT i sur. (2011.)

Parametar	1 bod	2 boda	3 boda
Stvaranje tubula	IZRAŽENO > 75 % uzorka tvori tubule	UMJERENO umjereno stvaranje tubularnih struktura (10–75 % uzorka) pomiješano s područjima solidnog tumorskog rasta	MINIMALNO/BEZ stvaranja tubula (< 10 % uzorka)
		UMJEREN umjeren stupanj varijabilnosti veličine i oblika jezgri, hiperkromatske jezgre, prisutnost jezgrica (od kojih neke mogu biti izražene) te intenzivnije bojenje	IZRAŽEN izražena varijabilnost veličine jezgri, hiperkromatske jezgre, često s jednom ili više izraženih jezgrica i intenzivno bojenje
Nuklearni pleomorfizam	BLAGI uniformne ili pravilne male jezgre s povremeno vidljivim jezgricama i blaga intenzivnost bojenja		
Mitotska aktivnost/10 HPF	0 – 9	10 – 19	> 20
Hiperkromazija	POVREMENO uočljiva	2 – 3 hiperkromatske jezgre ili mitotske figure / HPF	2 – 3 hiperkromatske jezgre ili mitotske figure / HPF
STUPANJ MALIGNOSTI PREMA UKUPNOM ZBROJU BODOVA			
	I (niski)	3 – 5	
	II (srednji)	6 – 7	
	III (visoki)	8 – 9	

4.4. IMUNOHISTOKEMIJSKA PRETRAGA UZORAKA IZ PARAFINSKIH BLOKOVA

Imunohistokemijska pretraga provedena je u Laboratoriju za citologiju i histopatologiju Zavoda za veterinarsku patologiju, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon histopatološke pretrage, od svakog karcinoma odabran je jedan reprezentativni parafinski blok koji je sadržavao najviše tumorskog tkiva. U slučajevima izražene tumorske nekroze i/ili upalne reakcije, odabran je blok s najmanjim udjelom nekrotičnog i/ili upalnog tkiva. Istražena je ekspresija pet tumorskih biljega: ER α , PR, HER2, RASAL2 i NECTIN-4. Primarna protutijela i drugi reagensi upotrijebljeni za imunohistokemijsku pretragu prikazani su u Tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Primarna protutijela upotrijebljena za imunohistokemijsku pretragu karcinoma mliječne žlijezde kuja

Biljeg	Primarno protutijelo	Klonalnost / domaćin	Klon	Kataloški broj	Proizvođač
ERα	protutijelo na estrogenski receptor alfa (engl. <i>Anti-Estrogen Receptor alpha antibody</i>)	monoklonsko / miš	C311	sc-787	Santa Cruz Biotechnology
PR	Protutijelo na progesterinski receptor <i>C terminal</i> (engl. <i>Anti-Progesterone Receptor antibody – C-terminal</i>)	poliklonsko / zec	—	ab191138	Abcam
HER2	imunohistokemijski komplet HercepTest™ (engl. <i>HercepTest™ immunohistochemical kit</i>)	zec	—	SK001	Dako, Agilent Technologies
NECTIN-4	protutijelo na nektin-4 (engl. <i>Anti-Nectin-4 antibody</i>)	monoklonsko / zec	EPR15613-68	ab192033	Abcam
RASAL2	protutijelo na RASAL2 (engl. <i>Anti-RASAL2 antibody</i>)	poliklonsko / zec	—	NBP1-82578	Novus Biologicals

Tablica 3. Reagensi upotrijebljeni za imunohistokemijsku pretragu karcinoma mliječne žlijezde kuja

Reagens	Kataloški broj	Proizvođač
Dako EnVision FLEX Wash Buffer	K8007	Agilent Technologies
Dako Target Retrieval Solution, pH 6	S1699	Agilent Technologies
Dako Target Retrieval Solution, pH 9	S2367	Agilent Technologies
Dako REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (DAB+)	K5007	Agilent Technologies
Dako REAL Antibody Diluent	S2022	Agilent Technologies
Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution	S2023	Agilent Technologies
Protein Block	ab64226	Abcam

4.4.1. Metode bojenja

Imunohistokemijsko bojenje izvedeno je na histološkim rezovima debljine 4 μm postavljenima na pozitivno nabijena mikroskopska stakalca. Rezovi su najprije deparafinizirani u ksilolu, a zatim rehidrirani kroz seriju etanola padajućih koncentracija te uronjeni u destiliranu vodu. Razotkrivanje antigena provedeno je primjenom topline, pri čemu je za ER α , PR i RASAL2 upotrijebljena otopina pH 6, za NECTIN-4 otopina pH 9, dok je za HER2 upotrijebljena otopina za razotkrivanje antigena iz kompleta HercepTest™, prethodno zagrijana na 95 °C. Nakon razotkrivanja antigena granice tkivnih rezova označene su hidrofbnom olovkom. Slijedila je inhibicija endogene peroksidazne aktivnosti, a zatim je za sva protutijela, osim HER2, provedeno blokiranje nespecifičnog vezanja za tkivne proteine.

Nakon toga slijedila je inkubacija s primarnim, a potom sa sekundarnim protutijelom. Za prikaz reakcije upotrijebljen je kromogen, pri čemu se pozitivna reakcija očitovala smeđim obojenjem tkiva. Za imunohistokemijsko bojenje HER2 upotrijebljeni su isključivo reagensi iz kompleta HercepTest™.

Nakon završetka imunohistokemijske reakcije provedeno je kontrastno bojenje hematoksilinom u trajanju od 30 do 60 sekundi, nakon čega su rezovi dehidrirani kroz rastuće koncentracije etanola, izbistreni u ksilolu i prekriveni pokrovnim stakalcima.

Imunohistokemijsko bojenje svih biljega, osim RASAL2, provedeno je na automatiziranom uređaju DAKO Autostainer Plus, dok je postupak za RASAL2 izveden ručno. Imunohistokemijska pretraga pojedinih tumorskih biljega provedena je prema protokolima proizvođača, uz metodološke prilagodbe i optimizaciju za upotrijebljene uzorke i laboratorijske uvjete, pri čemu su razrjeđenja primarnih protutijela, uvjeti razotkrivanja antigena i vrijeme inkubacije s primarnim protutijelom prikazani u Tablici 4.

Kao kontrolna tkiva za imunohistokemijsku reakciju upotrijebljeni su hiperplazija mliječne žlijezde kuje za ER α , karcinom mliječne žlijezde kuje za PR, kontrolna stakalca iz kompleta HercepTest™ i karcinom dojke za HER2 te interno validirani jako pozitivni karcinom mliječne žlijezde kuje za NECTIN-4. Za RASAL2 upotrijebljeni su interno validirano tkivo hiperplazije i jako pozitivan karcinom mliječne žlijezde kuje. Interno

validirana kontrolna tkiva za NECTIN-4 i RASAL2 prethodno su upotrijebljena tijekom optimizacije imunohistokemijskih protokola.

Tablica 4. Razlike u imunohistokemijskim protokolima primijenjenima za pojedina protutijela

Biljeg	Razrjeđenje	Razotkrivanje antigena	Vrijeme inkubacije
ERα	1 : 50	mikrovalna pećnica, 12 min	30 min; sobna temperatura
PR	1 : 500	mikrovalna pećnica, 40 min	45 min; sobna temperatura
HER2	spremno za primjenu	vodena kupelj 98 °C, 40 min	30 min; sobna temperatura
NECTIN-4	1 : 2898	mikrovalna pećnica, 40 min	45 min; sobna temperatura
RASAL2	1 : 35	mikrovalna pećnica, 12 min	1,5 h sobna temperatura, zatim 16 h pri 4 °C

4.4.2. Stupnjevanje imunohistokemijske reakcije

Stupnjevanje imunohistokemijske reakcije provedeno je svjetlosnim mikroskopom Nikon 2000 Eclipse, pri čemu je svaki uzorak pregledan pod povećanjima od 40 $\times$, 100 $\times$, 200 $\times$ i 400 $\times$. Odabrani imunohistokemijski preparati fotografirani su pri povećanju od 400 $\times$ digitalnom kamerom RisingCam BigEye10000KPA I pomoću računalnog programa Digicyte ResoluX, verzija 3.4.10. Ovisno o imunohistokemijskom biljegu, primijenjeni su različiti sustavi ocjenjivanja imunohistokemijske reakcije i interpretacije rezultata, kako slijedi:

Za ER α i PR određivan je udio pozitivnih stanica u ukupno 500 tumorskih stanica, neovisno o broju vidnih polja pri povećanju od 400 $\times$. Rezultati su izraženi kao postotak pozitivnih stanica, pri čemu se karcinom smatrao pozitivnim ako je udio iznosio $\geq 10\%$, dok je u slučaju udjela $< 10\%$ klasificiran kao negativan (NGUYEN i sur., 2018.).

HER2 imunohistokemijska ekspresija interpretirana je prema kriterijima HercepTest™, prema priručniku *HercepTest™ for Automated Link Platforms, 29th edition* (DAKO, 2024.). Procjena je temeljena na intenzitetu i opsegu membranskog bojenja tumorskih stanica, pri čemu

se razlikuju sljedeće kategorije: 0 (odsutno bojenje ili bojenje u $\leq 10\%$ tumorskih stanica), 1+ (slabo, nepotpuno membransko bojenje u $> 10\%$ tumorskih stanica), 2+ (slabo do umjereno potpuno membransko bojenje u $> 10\%$ tumorskih stanica) i 3+ (jako, potpuno membransko membransko bojenje u $> 10\%$ tumorskih stanica). Rezultat 0 i 1+ interpretiran je kao negativan, 2+ kao slabo pozitivan, a 3+ kao jako pozitivan.

Imunohistokemijska ekspresija za NECTIN-4 procijenjena je primjenom sustava bodovanja (engl. *Immunoreactive Score*, IRS). Analiziran je udio tumorskog tkiva s pozitivnom imunohistokemijskom reakcijom pri povećanju 400x. Intenzitet bojenja ocjenjivan je kao 0 (bez bojenja), 1 (slabo bojenje), 2 (umjereno bojenje) i 3 (jako bojenje), dok je udio pozitivnih tumorskih stanica ocjenjivan kao 0 (bez pozitivnih stanica), 1 ($\leq 10\%$ pozitivnih stanica), 2 (11 – 50 % pozitivnih stanica), 3 (51 – 80 % pozitivnih stanica) i 4 ($\geq 81\%$ pozitivnih stanica). Konačna IRS vrijednost dobivena je umnoškom ocjene intenziteta bojenja i udjela pozitivnih stanica. Na temelju dobivene IRS vrijednosti uzorci su svrstani u četiri skupine: negativni (0 – 1), slabo pozitivni (2 – 3), umjereno pozitivni (4 – 8) i jako pozitivni (9 – 12) (RAJC i sur., 2017).

Sustav bodovanja IRS primijenjen je i za procjenu imunohistokemijske ekspresije RASAL2, uz zadržavanje istih kriterija intenziteta bojenja kao i za NECTIN-4, uz modifikaciju kategorija udjela pozitivnih stanica prema WANG i sur. (2019.). Intenzitet bojenja ocjenjivan je kao 0 (bez bojenja), 1 (slabo bojenje), 2 (umjereno bojenje) i 3 (jako bojenje), dok je udio pozitivnih tumorskih stanica bodovan kao 0 ($< 5\%$ pozitivnih stanica), 1 (5 – 25 %), 2 (26 – 50 %), 3 (51 – 75 %) i 4 ($> 75\%$). Konačna IRS vrijednost izračunata je množenjem ocjene intenziteta bojenja i ocjene udjela pozitivnih stanica, a interpretacija IRS vrijednosti provedena je prema kriterijima RAJC i sur. (2017.), pri čemu su uzorci klasificirani također kao negativni (0 – 1), slabo pozitivni (2 – 3), umjereno pozitivni (4 – 8) i jako pozitivni (9 – 12).

4.5. ODREĐIVANJE EKSPRESIJE GENA U UZORCIMA KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA

4.5.1. Izdvajanje ukupne RNA

Za izdvajanje ukupne RNA (engl. *Ribonucleic acid*, RNA) iz tkiva karcinoma mliječne žlijezde upotrijebljen je komercijalno dostupan komplet za izolaciju (SV Total RNA Isolation System, Promega®, SAD) prema uputama proizvođača.

Koncentracija i čistoća ukupne izdvojene RNA određena je analizom na spektrofotometru BioDrop μ L ITE (BioDrop, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo). Čistoća izdvojene RNA određena je pomoću omjera apsorbancija valnih dužina 260/280 nm.

4.5.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Pripremljena razrjeđenja RNA (25 μ g) podvrgnuta su reverznoj transkripciji i kvantitativnom PCR-u (engl. *Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*, PCR) u jednom koraku koristeći se One-Step TB Green PrimeScript RT-PCR setom II (TaKaRa Bio Inc. Shiga, Japan). Reakcijom RT-qPCR analizirana je ekspresija gena od interesa čije su početnice prikazane u Tablici 5.

U svakoj RT-qPCR reakciji, ukupnog volumena 20 μ L, upotrijebljeno je:

1. 2X One Step TB Green RT-PCR pufer 4 ($V = 10,0 \mu\text{L}$)
2. PrimeScript 1 step enzim Mix 2 ($V = 0,8 \mu\text{L}$)
3. početnice za oba ispitivana gena ($V = 0,8 \mu\text{L}$)
4. sterilna destilirana voda (RNase free water) ($V = 5,2 \mu\text{L}$)
5. ROX referentna boja ($V = 0,4 \mu\text{L}$)
6. RNA ($V = 2 \mu\text{L}$)

Tablica 5. Početnice ispitivanih gena od interesa

Gen	Sekvencija 5' – 3'
<i>RASAL2</i>	F: TCA GTC TCC GGA GTC ACG AT R: CTG CCG GCA CCT CTT TAT CA
<i>NECTIN4</i>	F: GTC ACT TCG GAG TTC CAC CT R: TGA GTG TAG CGC CTT CTC TG
<i>GAPDH</i>	F: TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA R: TTG ATG TTG AAG TCG CAG GAG
<i>TBP</i>	F: ATG GTG TGT ACG GGA GCC AAG R: ACT GTT GGT GGG TCA GCA CAA G

GAPDH (engl. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

TBP (engl. *TATA-box binding protein*)

Za izvođenje lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu upotrijebljen je uređaj Stratagene MxPro3005 (Agilent Technologies, SAD i Kanada), a reakcija se zbivala prema uvjetima navedenima u Tablici 6.

Tablica 6. Uvjeti RT-qPCR reakcija

	Temperatura / °C	Trajanje ciklusa / s	Broj ciklusa
Reverzna transkripcija	42	300	1
	95	10	1
PCR reakcija	95	5	40
	60	40	40
	72	60	40
Protokol disocijacije	95	60	1
	55	30	1
	95	30	1

Sve Ct-vrijednosti dobivene u kvantitativnoj PCR reakciji upotrijebljene su za izračunavanje relativne promjene ekspresije cDNA gena od interesa pokusnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu. Metodom $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) analizirana je i kvantificirana ekspresija gena, prema genima za normalizaciju (engl. *housekeeping genes*, *GAPDH* i *TBP*), te je pomoću $\Delta\Delta C_t$ -vrijednosti izračunat faktor promjene ekspresije gena (engl. *fold change*). Ekspresija je izračunata prema formuli:

$$\Delta\Delta C_t = (C_{T \text{ ciljni gen P}} - C_{T \text{ gen za normalizaciju P}}) - (C_{T \text{ ciljni gen K}} - C_{T \text{ gen za normalizaciju K}})$$

K – kontrolna skupina; P – pokusna skupina

Pomoću $\Delta\Delta C_t$ -vrijednosti izračunat je faktor promjene (engl. *fold change*) ekspresije gena od interesa u odnosu na kontrolnu skupinu prema formuli:

$$\text{Relativna promjena} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Dobiveni broj označuje koliko je puta ekspresija mRNA gena od interesa ispitivane skupine veća ili manja u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.6. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza provedena je na ukupno 35 FFPE (engl. *Formalin-fixed, paraffin-embedded*) uzoraka karcinoma mliječne žlijezde u kuja koji su upotrijebljeni za histološku klasifikaciju i imunohistokemijsku pretragu te na 31 odgovarajućem zamrznutom uzorku istih tumora dostupnom za analizu ekspresije gena metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom nakon obrnute transkripcije (RT-qPCR). Broj uzoraka uključenih u pojedine analize razlikovao se ovisno o dostupnosti odgovarajućeg biološkog materijala.

Za opis ispitivanih varijabli primijenjene su metode deskriptivne statistike. Analizirane su dob, pasmina, kastracijski status, razdoblje bez bolesti, prisutnost metastaza, vrijeme preživljenja te ekspresija gena *RASAL2* i *NECTIN4* te proteina *RASAL2* i *NECTIN-4*. Povezanost ekspresije proteina *RASAL2* i *NECTIN-4* analizirana je u odnosu na trostruko negativni fenotip, histološki tip, histološki stupanj malignosti i pokazatelje biološkog ponašanja karcinoma, dok je povezanost ekspresije gena *RASAL2* i *NECTIN4* analizirana u odnosu na trostruko negativni fenotip i histološki stupanj malignosti.

Razdoblje bez bolesti kategorizirano je prema vremenu pojave proliferacije na mjestu kirurškog uklanjanja primarnog tumora kao: bez proliferacije, do 6 mjeseci, od 7 do 12 mjeseci i više od 12 mjeseci nakon operacije. Vrijeme preživljenja nakon operacije podijeljeno je u četiri kategorije: do jedne godine, više od jedne do dvije godine, više od dvije do tri godine te više od tri godine.

Zbog malog broja uzoraka pojedine kategorije imunohistokemijske ekspresije proteina objedinjene su za potrebe pojedinih statističkih analiza, ovisno o zahtjevima primijenjenih statističkih testova. Analize povezanosti s pokazateljima biološkog ponašanja provedene su na temelju dostupnih podataka praćenja, a slučajevi s nedostajućim podatkom za pojedini ishod nisu uključeni u odgovarajuću analizu.

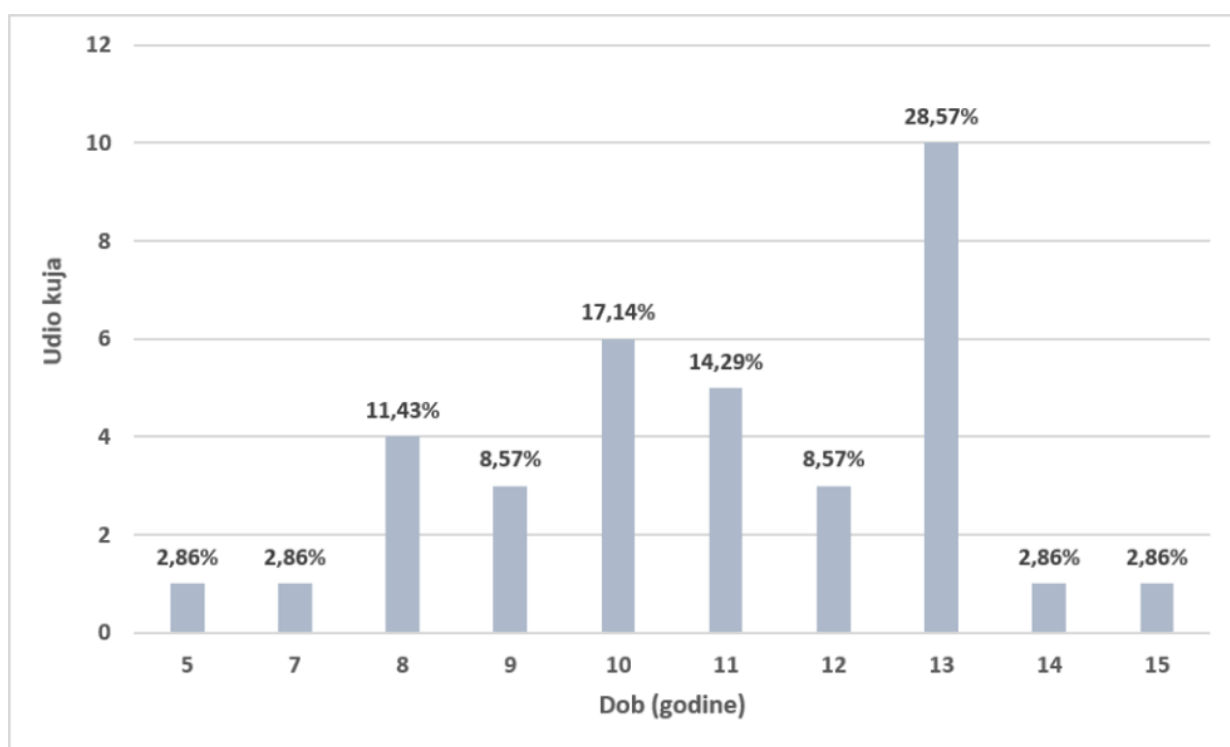
Statistička analiza provedena je u računalnom programu GraphPad Prism 9.3 (GraphPad Software LLC, San Diego, CA, SAD). Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli ispitana je Shapiro-Wilkovim testom. Povezanost kategorijskih varijabli analizirana je primjenom χ^2 testa, odnosno Fisherova egzaktnog testa kada nisu bile zadovoljene pretpostavke za primjenu χ^2 testa. Razlike u ekspresiji gena između ispitivanih skupina analizirane su na temelju relativne ekspresije određene $\Delta\Delta C_t$ metodom ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), uz normalizaciju na referentne gene GAPDH i ACTB (β -aktin). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija ili kao

apsolutni i relativni broj ispitanika, ovisno o vrsti varijable. Statistički značajnima smatrane su razlike pri vrijednosti $p < 0,05$.

5. REZULTATI

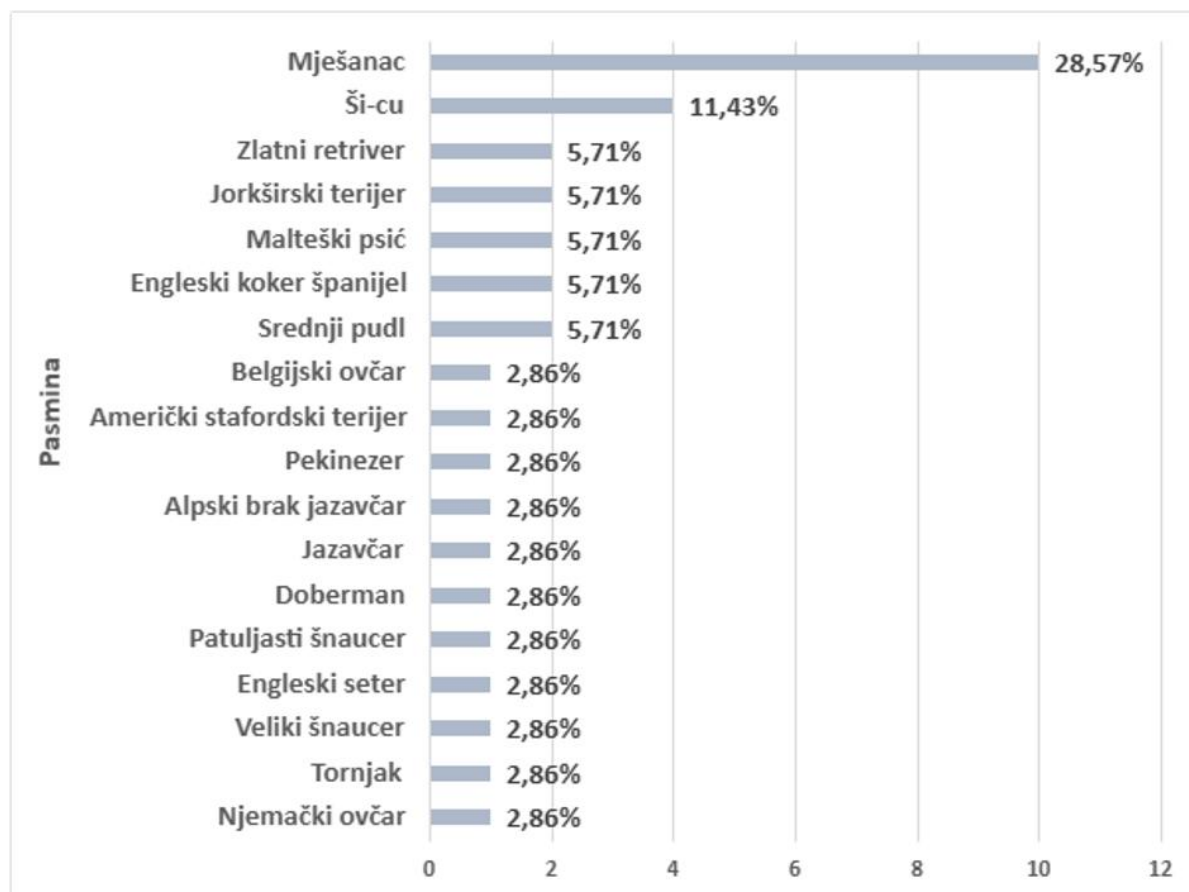
5.1. DOBNA I PASMINSKA RASPODJELA TE KASTRACIJSKI STATUS KUJA

U istraživanje je uključeno 35 kuja s karcinomima mliječne žlijezde. Prosječna dob životinja pri kirurškom uklanjanju tumora iznosila je $10,9 \pm 2,3$ godine. Medijan dobi iznosio je 11 godina, a dob životinja bila je u rasponu od 5 do 15 godina. Najviše je kuja bilo u dobi od 13 godina ($n = 10$), zatim 10 godina ($n = 6$) i 11 godina ($n = 5$). Četiri su kuje bile u dobi od 8 godina, po tri u dobi od 9 i 12 godina, dok je po jedna kuja bila u dobi od 5, 7, 14 i 15 godina (Slika 1).



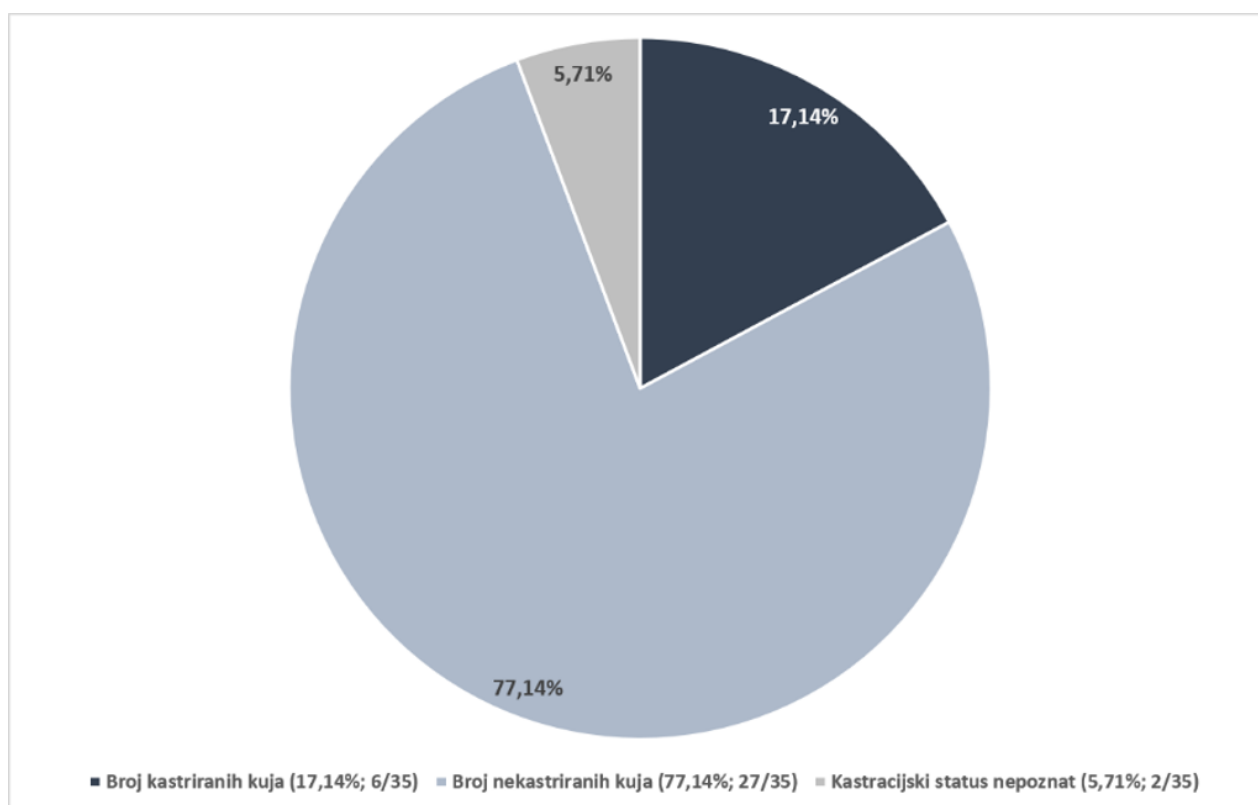
Slika 1. Grafički prikaz dobne raspodjele u istraživanih kuja ($n = 35$).

U istraživanoj populaciji bilo je zastupljeno 18 različitih pasmina. Najbrojniji su bili mješanci (n = 10; 28,57 %) i životinje pasimne ši-cu (n = 4; 11,43 %), dok su srednji pudl, engleski koker španijel, malteški psić, jorkširski terijer i zlatni retriver bili zastupljeni s po dva slučaja (5,71 %). Ostale su pasmine zabilježene pojedinačnim slučajevima (2,86 %) (Slika 2).



Slika 2. Grafički prikaz pasminske raspodjele unutar istraživane skupine (n = 35).

Podatak o kastracijskom statusu bio je dostupan za 33 od ukupno 35 kuja, dok ga za dvije životinje (5,71 %) nije bilo moguće utvrditi. Među životinjama s dostupnim podacima, 27 (77,14 %) nije bilo kastrirano, a 6 (17,14 %) ih je bilo podvrgnuto kastraciji. Za tri kastrirane kuje bilo je potvrđeno da je zahvat uključivao ovariohisterektomiju, dok za preostale tri nije bilo moguće utvrditi je li provedena ovariektomija ili ovariohisterektomija. Sve su kastrirane kuje bile podvrgnute zahvatu nakon navršene treće godine života (Slika 3).

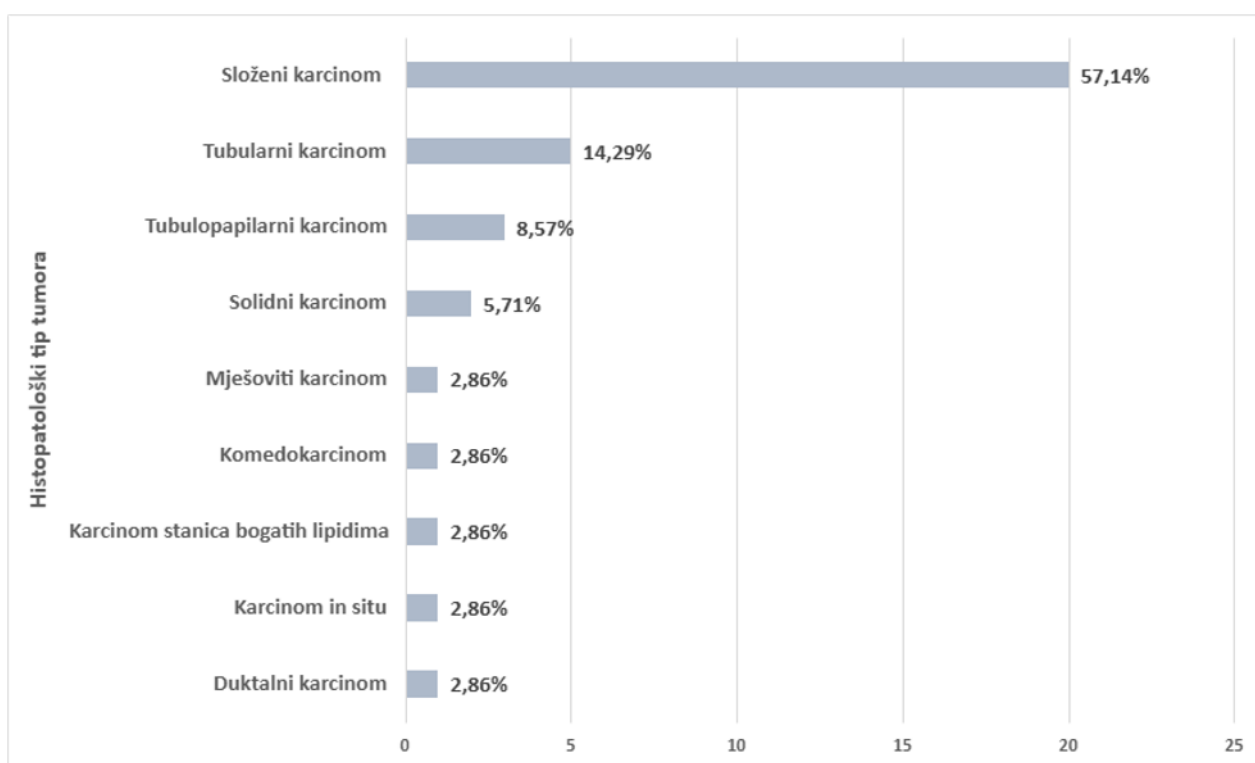


Slika 3. Grafički prikaz kastracijskog statusa u istraživanoj skupini.

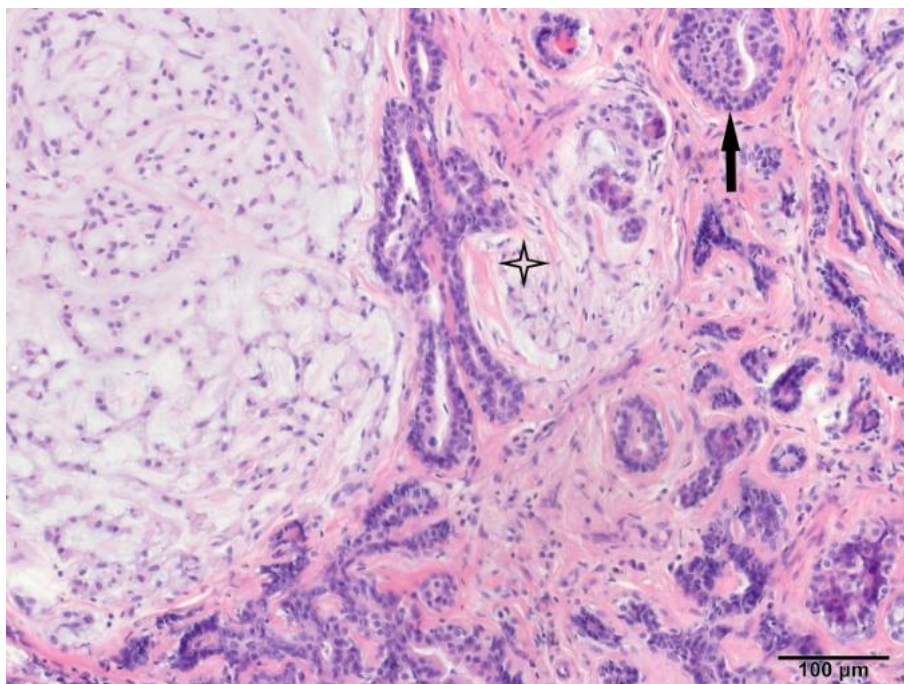
5.2. HISTOPATOLOŠKA OBILJEŽJA KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA

5.2.1. Zastupljenost histoloških tipova karcinoma

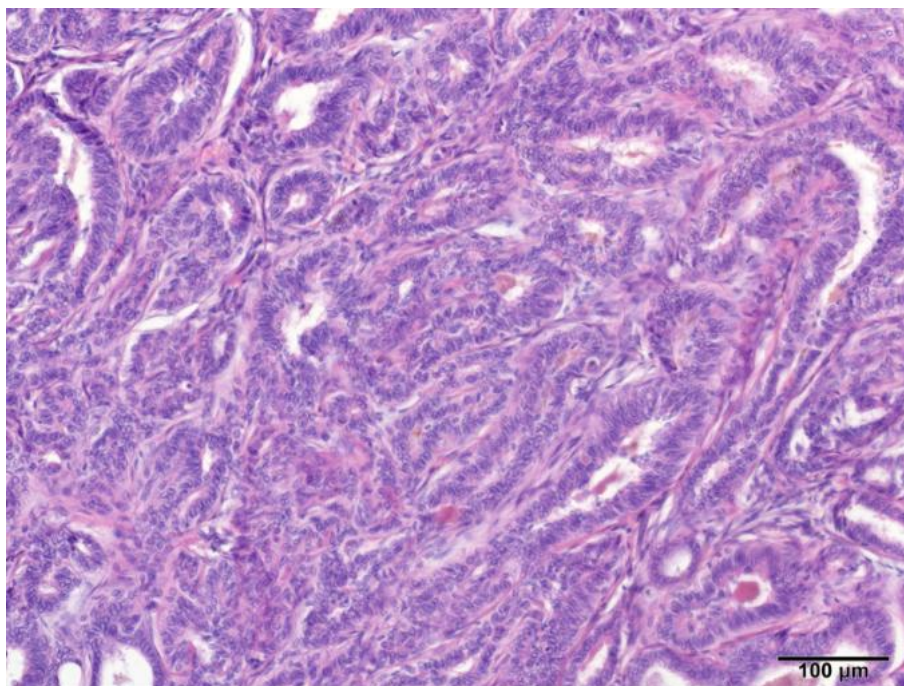
Histopatološkom pretragom utvrđeno je devet različitih histoloških tipova karcinoma mliječne žlijezde. Najveći udio činili su složeni karcinomi ($n = 20$; 57,14 %), zatim tubularni ($n = 5$; 14,29 %) i tubulopapilarni karcinomi ($n = 3$; 8,57 %). Solidni karcinomi utvrđeni su u dva slučaja (5,71 %), dok su mješoviti karcinom, karcinom stanica bogatih lipidima, komedokarcinom, duktalni karcinom i karcinom *in situ* utvrđeni u po jednom slučaju (2,86 %). Zastupljenost pojedinih histoloških tipova karcinoma u istraživanoj skupini prikazana je grafički na Slici 4, dok je njihova histološka građa prikazana histopatološkim Slikama 5–13.



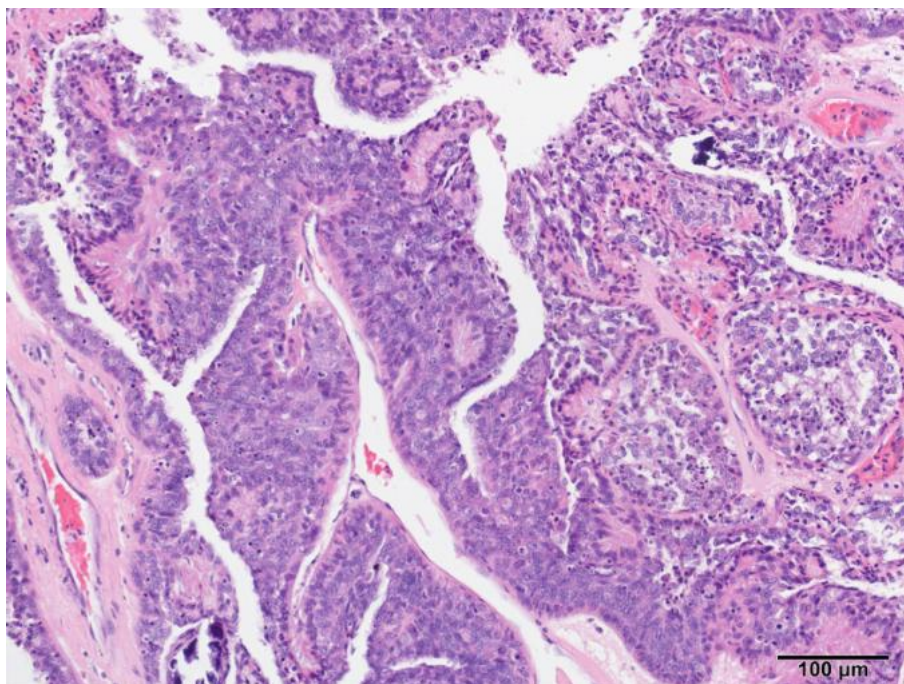
Slika 4. Grafički prikaz zastupljenosti histoloških tipova karcinoma mliječne žlijezde kuja ($n = 35$).



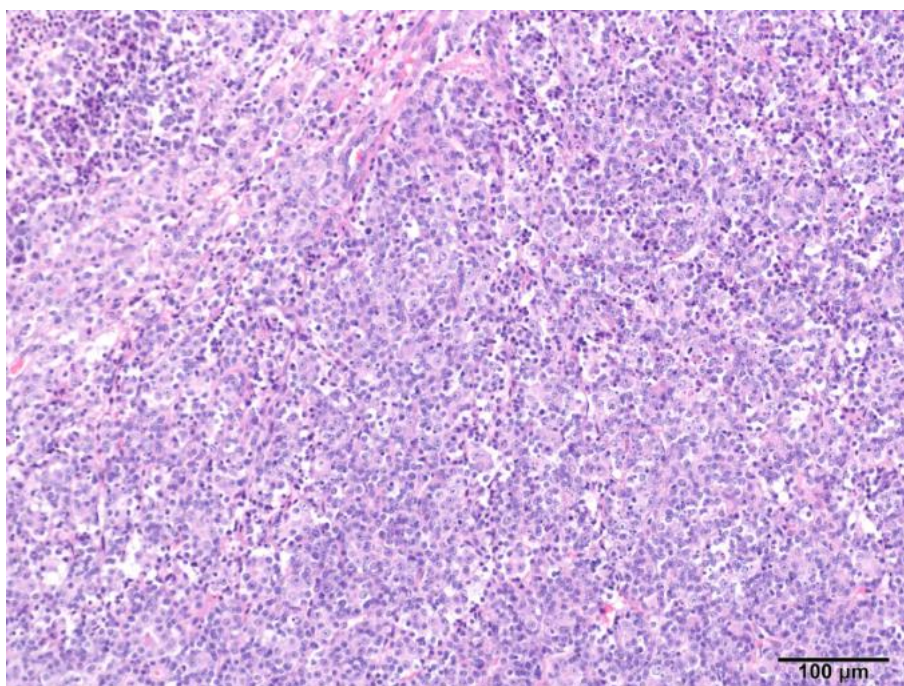
Slika 5. Složeni karcinom mliječne žlijezde (proliferacija luminalnih epitelnih stanica (strelica) i mioepitelnih stanica (zvjezdica), kuja, HE 20x.



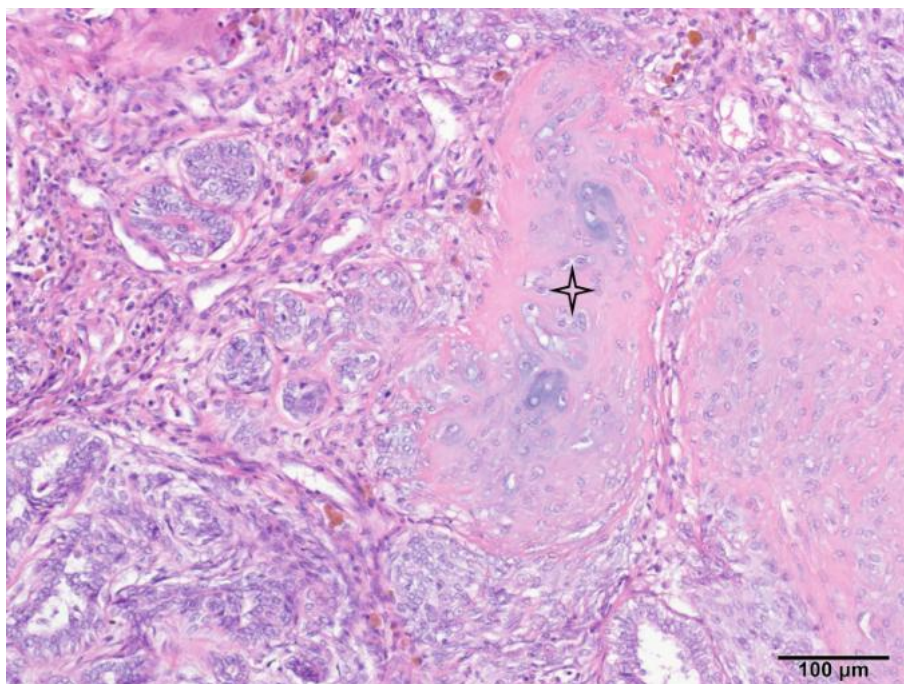
Slika 6. Tubularni karcinom mliječne žlijezde, kuja, HE 20x.



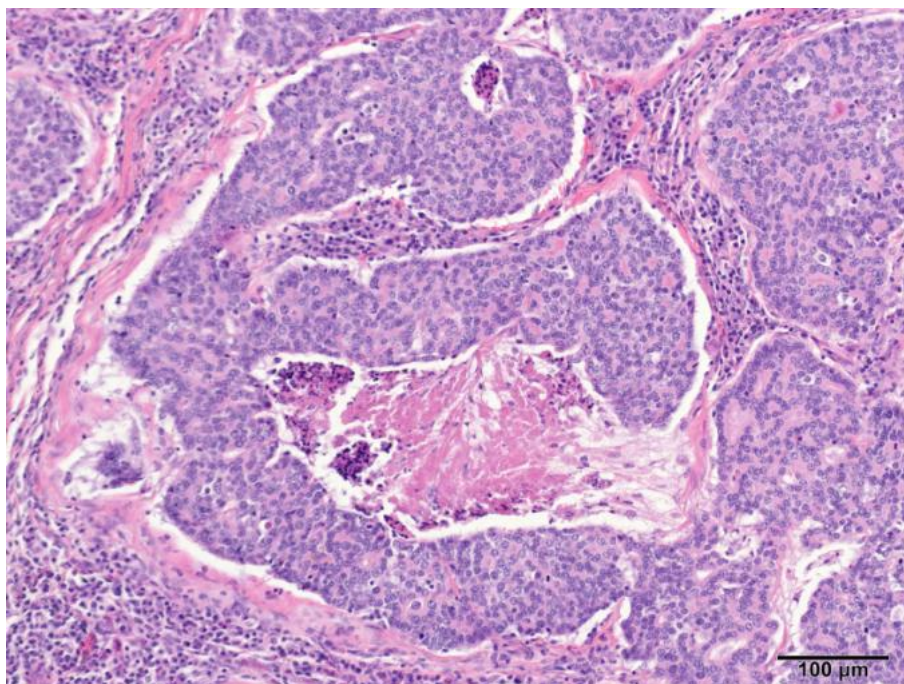
Slika 7. Tubulopapilarni karcinom mliječne žlijezde, kuja, HE, 20x.



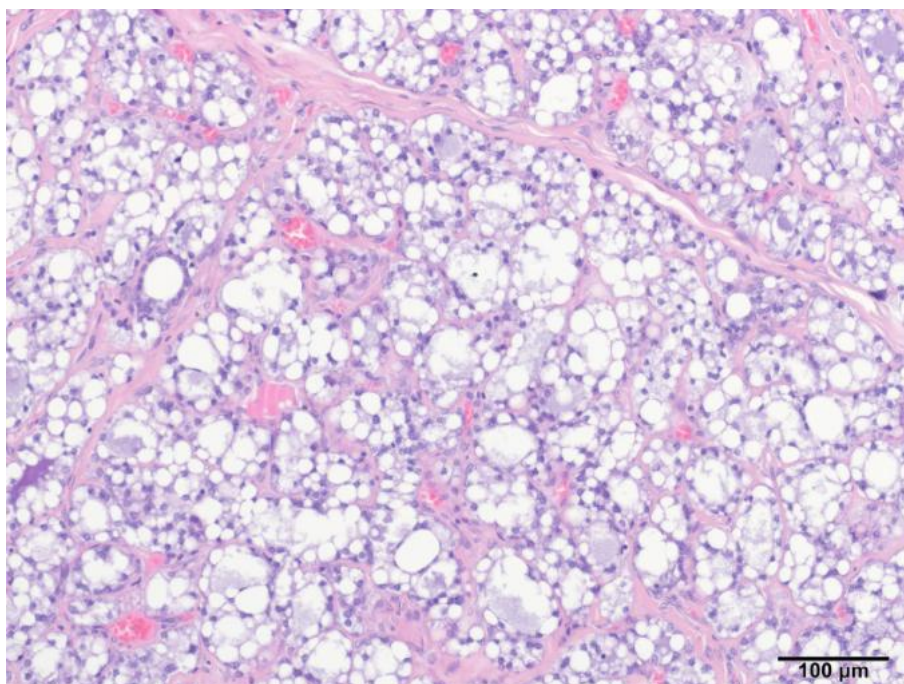
Slika 8. Solidni karcinom mliječne žlijezde, kuja, HE 20x.



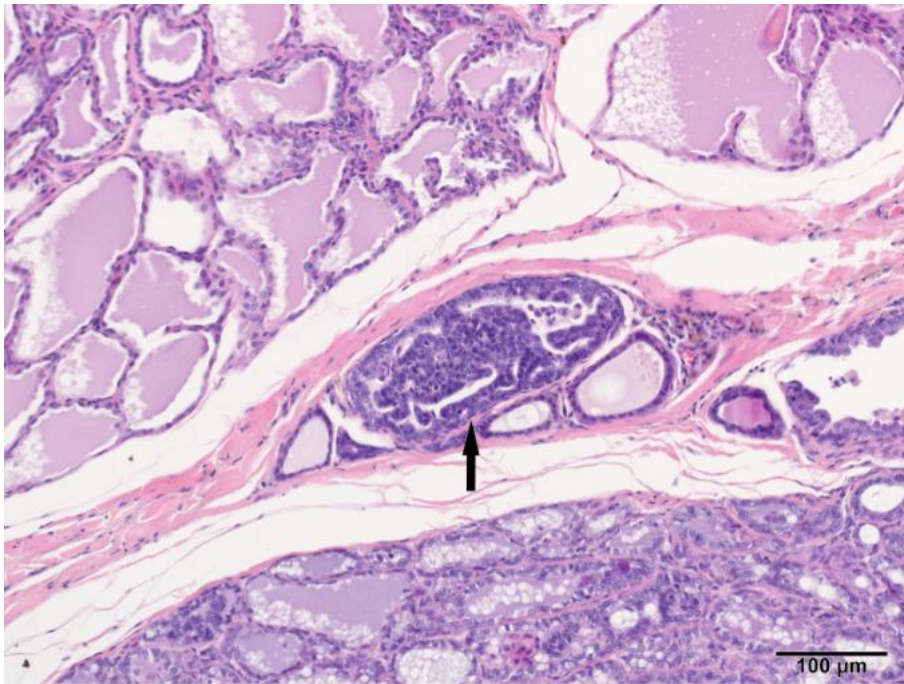
Slika 9. Mješoviti karcinom mliječne žlijezde (proliferacija epitelnih i mioepitelnih stanica sa stvaranjem hrskavice (zvjezdica)), kuja, HE 20x.



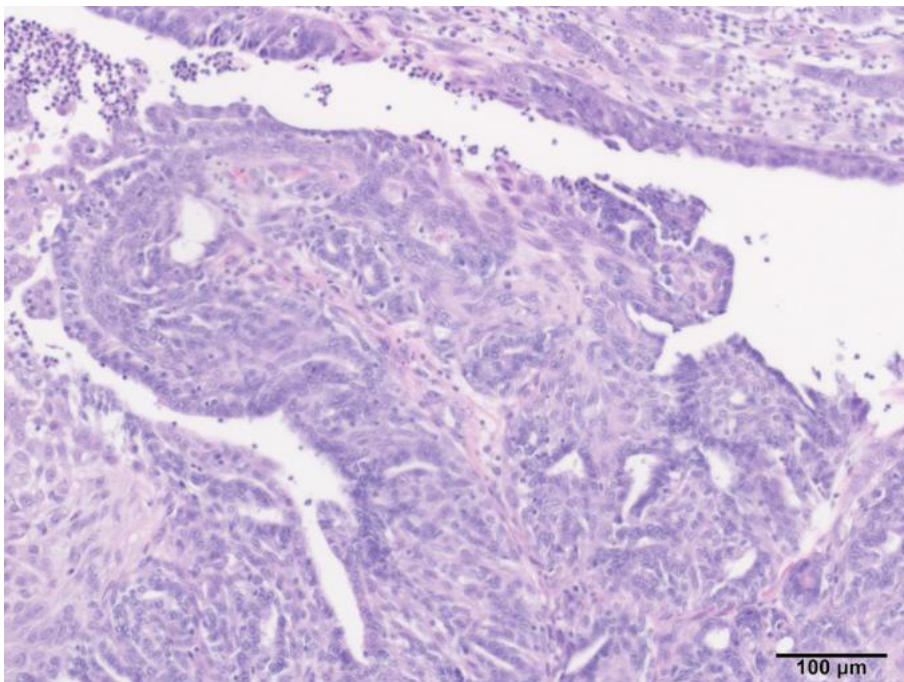
Slika 10. Komedokarcinom mliječne žlijezde, kuja, HE 20x.



Slika 11. Karcinom stanica bogatih lipidima mliječne žlijezde, kuja, HE 20x.



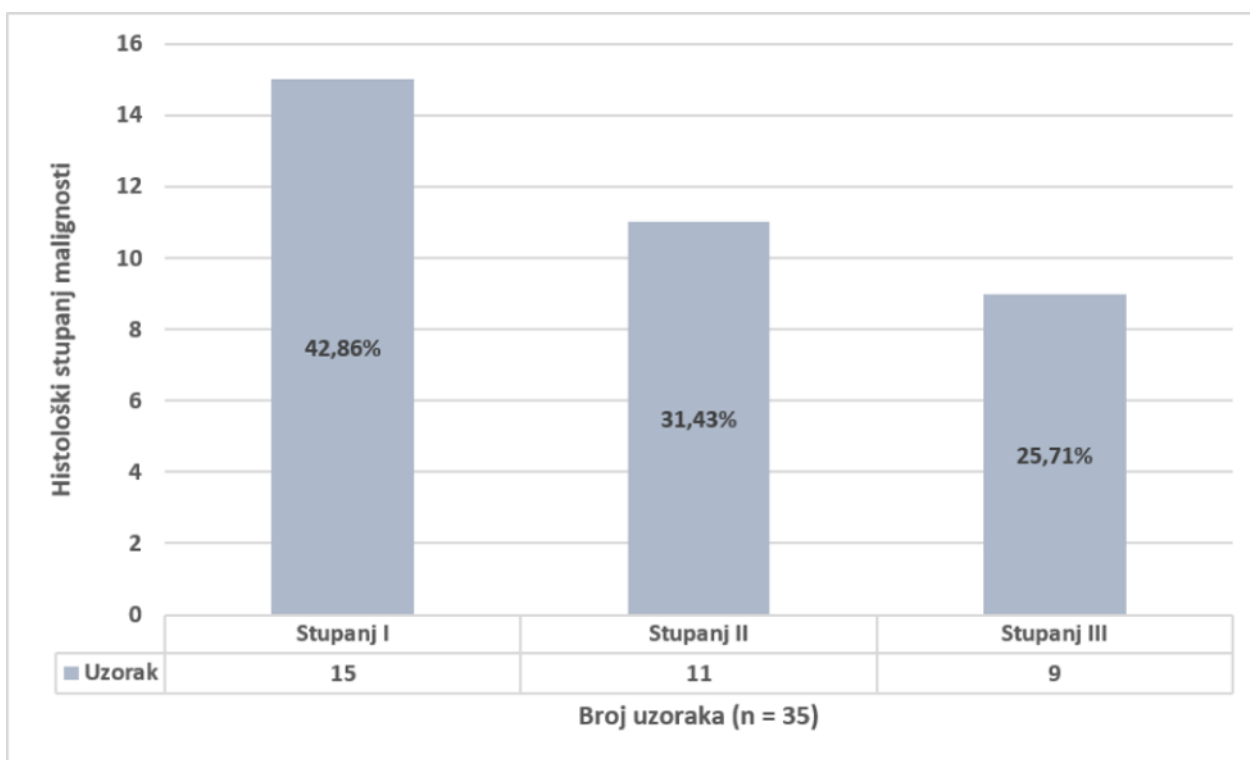
Slika 12. Karcinom *in situ* (strelica) mliječne žlijezde, kuja, HE 20x.



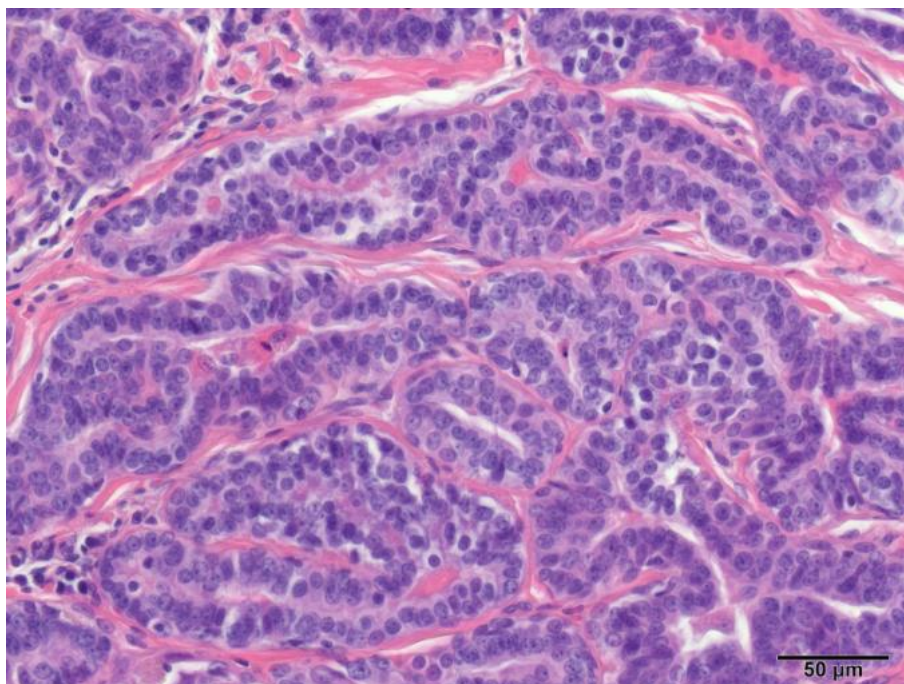
Slika 13. Duktalni karcinom mliječne žlijezde, kuja, HE 20x.

5.2.2. Zastupljenost histoloških stupnjeva malignosti karcinoma

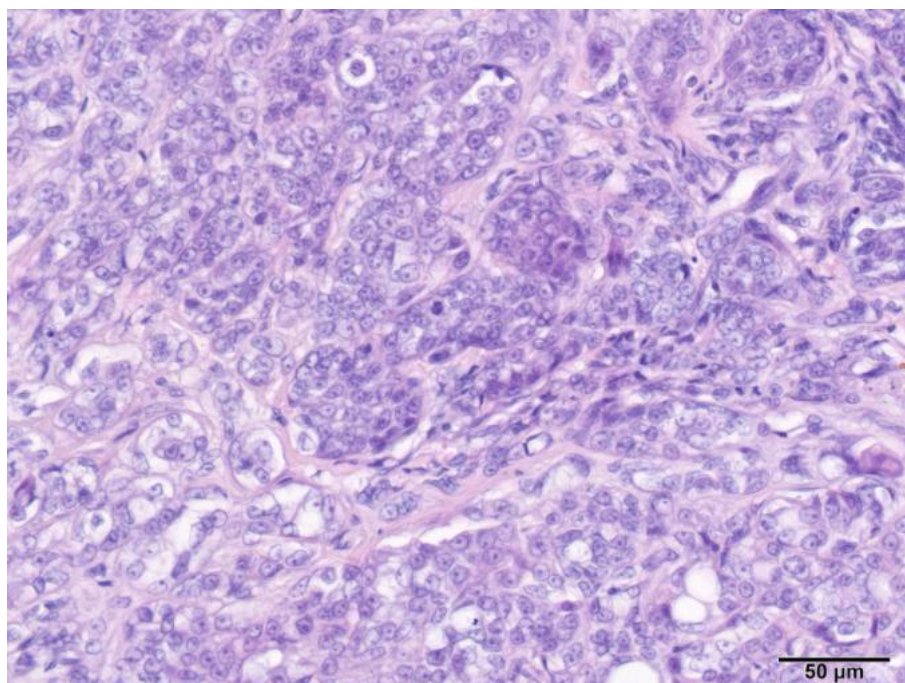
Histološkim stupnjevanjem utvrđeno je da su karcinomi stupnja malignosti I bili najzastupljeniji ($n = 15$; 42,86 %), slijedili su karcinomi stupnja malignosti II ($n = 11$; 31,43 %), dok je stupnju malignosti III pripadalo 9 karcinoma (25,71 %). Zastupljenost histoloških stupnjeva malignosti karcinoma mliječne žlijezde kuja grafički je prikazana na Slici 14, dok su na Slikama 15–17 prikazani histološki obrasci karcinoma stupnja malignosti I, II i III s pripadajućim kriterijima za određivanje stupnja malignosti.



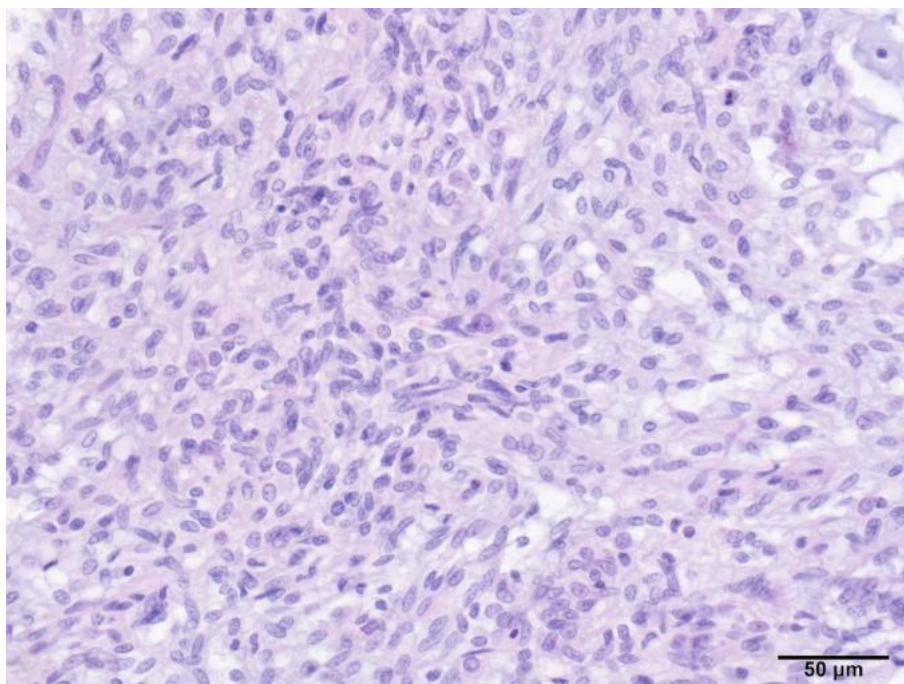
Slika 14. Grafički prikaz zastupljenosti histoloških stupnjeva malignosti karcinoma mliječne žlijezde kuja.



Slika 15. Tubularni karcinom mliječne žlijezde (stupanj malignosti I), dobro uočljivo stvaranje tubula, stanice i jezgre uniformne, kuja, HE 40x.



Slika 16. Složeni karcinom mliječne žlijezde (stupanj malignosti II), tubularna komponenta slabije diferencirana, stvaranje tubula slabije uočljivo, jezgrama izraženi nukleolusi, veći broj mitozna, kuja, HE 40x.



Slika 17. Složeni karcinom mliječne žlijezde (stupanj malignosti III), strukture tubula nisu uočljive, stanice i jezgre su pleomorfne, veći broj mitozu, kuja, HE 40x.

5.2.3. Povezanost histološkog stupnja malignosti s biološkim ponašanjem karcinoma

S porastom histološkog stupnja malignosti karcinoma povećavao se udio životinja s utvrđenim metastazama, dok se udio životinja koje su preživjele dulje od tri godine smanjivao. Najveći udio metastaza i najveći udio životinja s preživljenjem kraćim od jedne godine zabilježeni su u životinja s karcinomima stupnja malignosti III. Utvrđena je statistički visoko značajna povezanost histološkog stupnja malignosti s pojavom metastaza i vremenom preživljenja ($p < 0,001$). Sve zabilježene vrijednosti parametara biološkog ponašanja karcinoma prema histološkom stupnju malignosti prikazane su u Tablici 7.

Tablica 7. Parametri biološkog ponašanja karcinoma u odnosu na histološki stupanj malignosti karcinoma mliječne žlijezde kuja

Parametar	Stupanj I n (%)	Stupanj II n (%)	Stupanj III n (%)	<i>p</i> - vrijednost
Pojava proliferacije				> 0,05
Utvrđena	2 (14,29)	1 (12,50)	3 (42,86)	
Neutvrđena	12 (85,71)	7 (87,50)	4 (57,14)	
Razdoblje bez bolesti				> 0,05
Bez proliferacije	12 (92,31)	7 (87,50)	4 (57,14)	
≤ 6 mjeseci	1 (7,69)	1 (12,50)	2 (28,57)	
7 – 12 mjeseci	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (14,29)	
> 12 mjeseci	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
Metastaze				< 0,001***
Utvrđene	1 (7,69)	3 (42,86)	6 (85,71)	
Neutvrđene	12 (92,31)	4 (57,14)	1 (14,29)	
Vrijeme preživljenja				< 0,001***
< 1 godine	1 (7,69)	6 (75,00)	7 (87,50)	
1 – 2 godine	0 (0,00)	1 (12,50)	1 (12,50)	
> 2 – 3 godine	3 (23,08)	1 (12,50)	0 (0,00)	
> 3 godine	9 (69,23)	0 (0,00)	0 (0,00)	

Postoci su izračunati u odnosu na broj slučajeva s dostupnim podacima za pojedini parametar unutar određenog histološkog stupnja malignosti.

*** $p < 0,001$

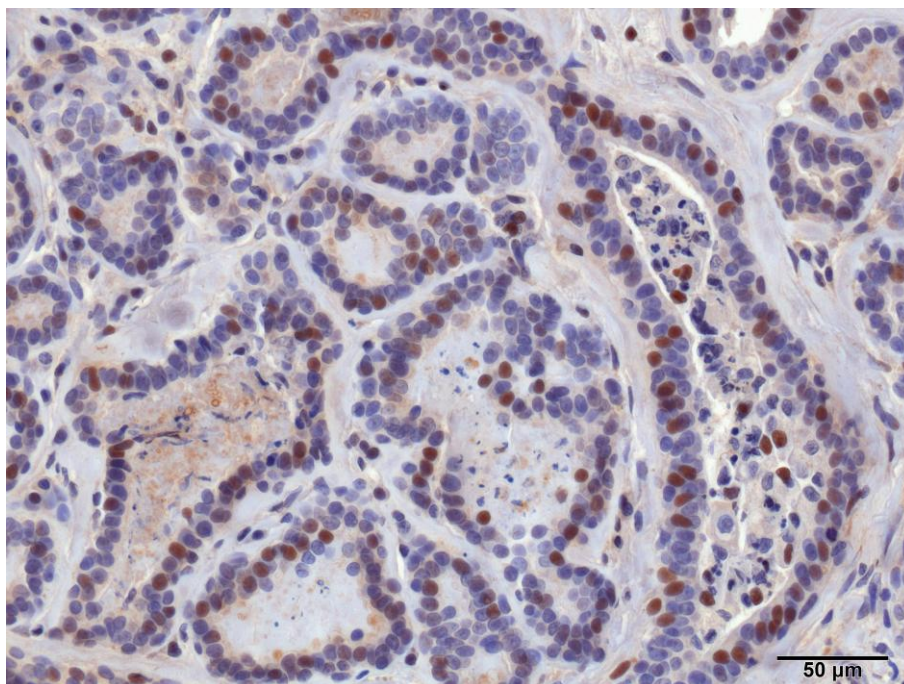
5.3. IMUNOHISTOKEMIJSKA OBILJEŽJA KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA

5.3.1. Imunohistokemijska ekspresija ER, PR i HER2

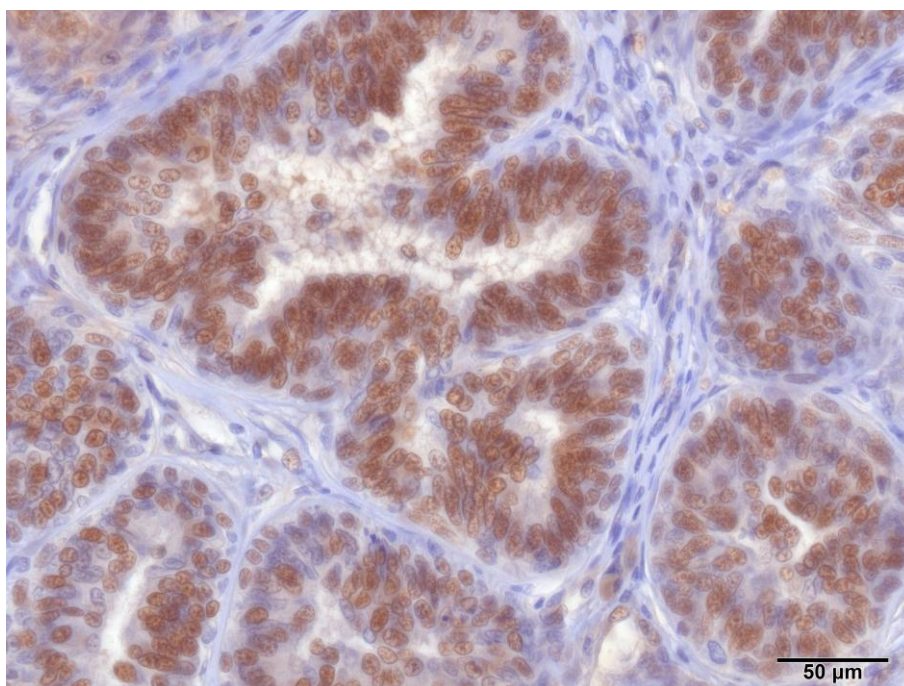
Imunohistokemijskom pretragom proteina ER, PR i HER2 utvrđena je podjednaka zastupljenost ER i PR-pozitivnih i negativnih karcinoma. Ekspresija proteina ER utvrđena je kod 17 karcinoma (48,57 %), dok je 18 karcinoma (51,43 %) bilo negativno. PR-pozitivan status zabilježen je kod 18 karcinoma (51,43 %), a 17 (48,57 %) ih je bilo negativno. Većina karcinoma nije pokazivala ekspresiju proteina HER2 (kategorija 0; 25/35; 71,43 %), dok su tri karcinoma (8,57 %) pripadala kategoriji HER2 1+, četiri (11,43 %) kategoriji HER2 2+ i tri (8,57 %) kategoriji HER2 3+ (Tablica 8). Pozitivna imunohistokemijska (engl. *Immunohistochemistry*, IHC) reakcija na ER α očitovala se bojenjem jezgara normalnih i tumorozno promijenjenih luminalnih epitelnih stanica mliječne žlijezde (Slika 18). Pozitivna IHC reakcija na PR očitovala se također bojenjem jezgara normalnih i tumorozno promijenjenih epitelnih i mioepitelnih stanica (Slika 19). Pozitivna IHC reakcija na HER2 prikazana je na Slici 20, a očitovala se uglavnom potpunim membranskim bojenjem stanica.

Tablica 8. Imunohistokemijska ekspresija ER, PR i HER2 u karcinomima mliječne žlijezde kuja

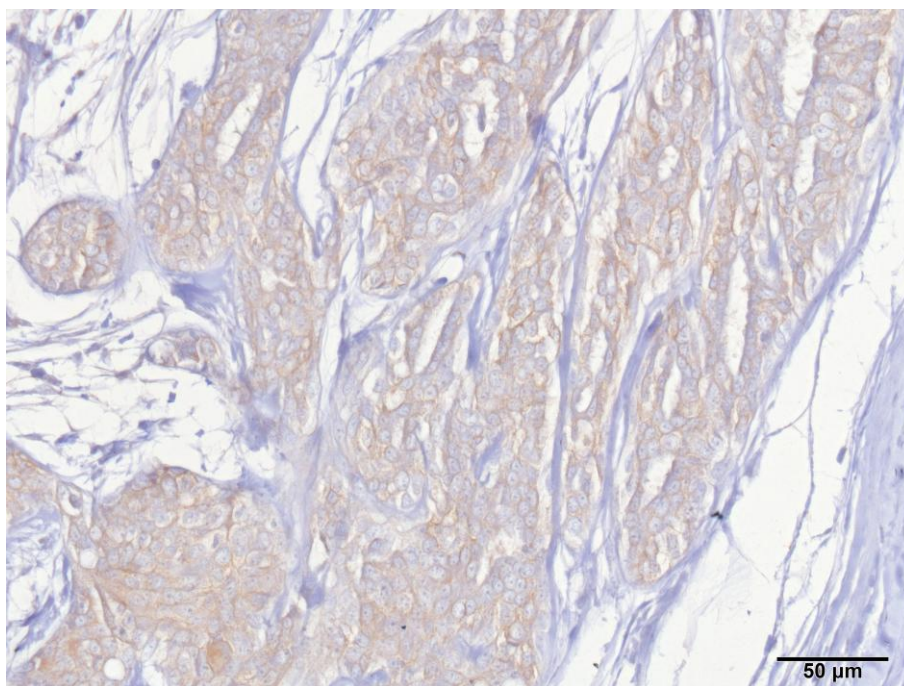
IHC biljeg	Ekspresija	Broj karcinoma (n)	Udio (%)
ER	pozitivna	17	48,57
	negativna	18	51,43
PR	pozitivna	18	51,43
	negativna	17	48,57
HER2	0	25	71,43
	1+	3	8,57
	2+	4	11,43
	3+	3	8,57
Za svaki biljeg ukupno		35	100



Slika 18. Složeni karcinom mliječne žlijezde – tubularna komponenta, kuja, pozitivna reakcija na ER α , kuja, IHC 40x.



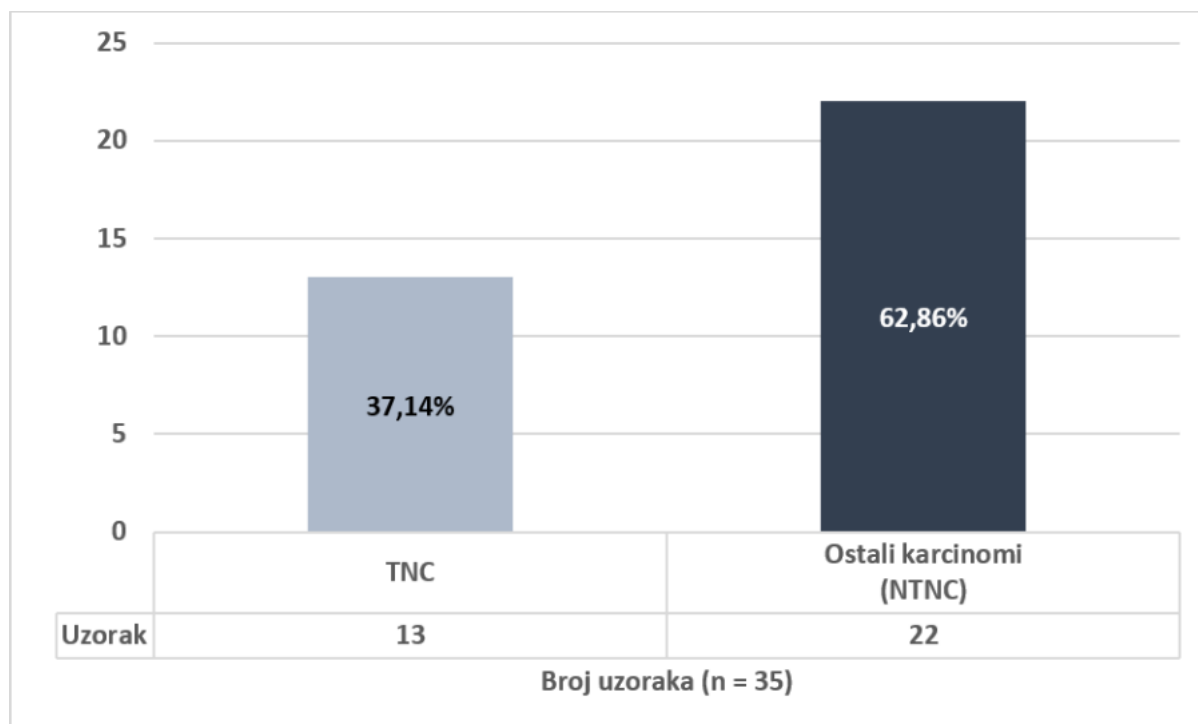
Slika 19. Složeni karcinom mliječne žlijezde – tubularna komponenta, kuja, pozitivna reakcija na PR, kuja, IHC 40x.



Slika 20. Složeni karcinom mliječne žlijezde – tubulopapilarna komponenta, kuja, pozitivna reakcija na HER2, IHC 40x.

5.3.2. Zastupljenost trostruko negativnih i ostalih karcinoma mliječne žlijezde

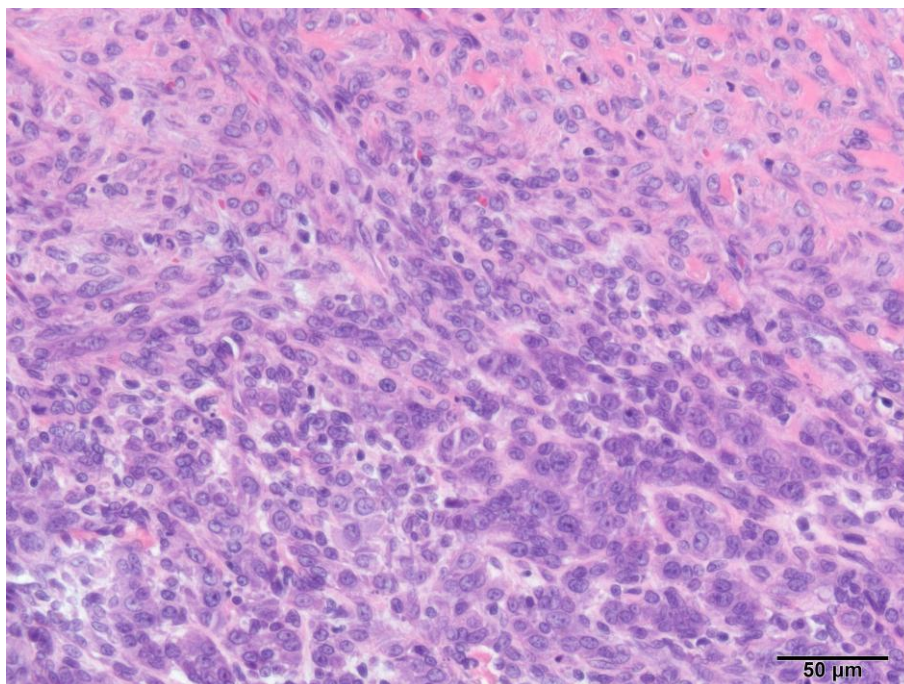
Trostruko negativni karcinomi činili su 13 od ukupno 35 analiziranih karcinoma (37,14 %), dok su preostala 22 (62,86 %) pripadala skupini ostalih karcinoma mliječne žlijezde (Slika 21). Na Slikama 23-25 prikazano je IHC negativno bojenje jednoga od trostruko negativnih uzoraka istraživane skupine karcinoma. Slika 22 prikazuje HE bojenje istog uzorka.



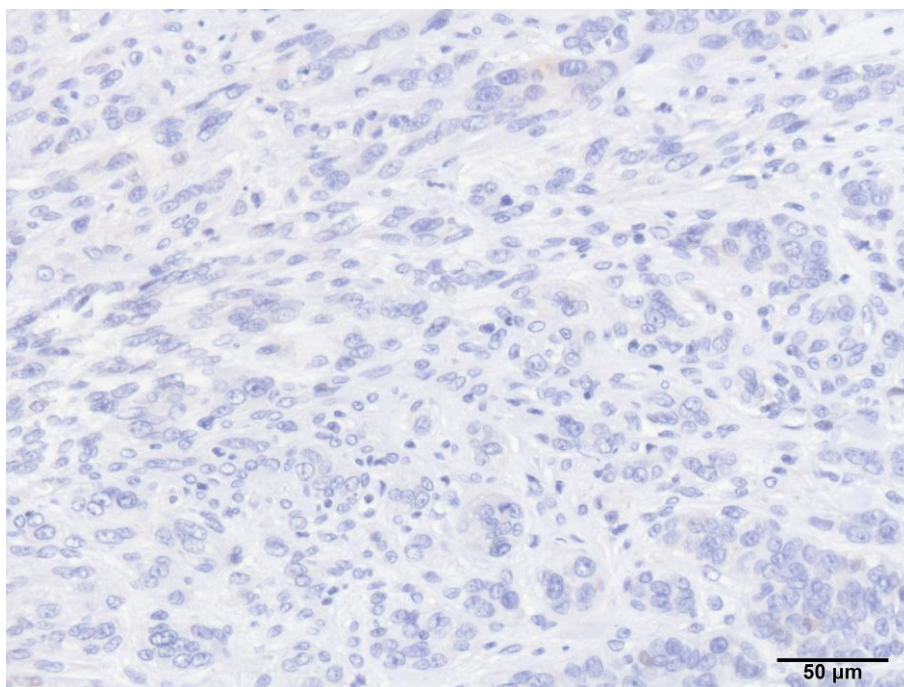
Slika 21. Udio trostruko negativnih i ostalih karcinoma mliječne žlijezde kuja.

TNC – trostruko negativni karcinomi (engl. *triple-negative carcinomas*);

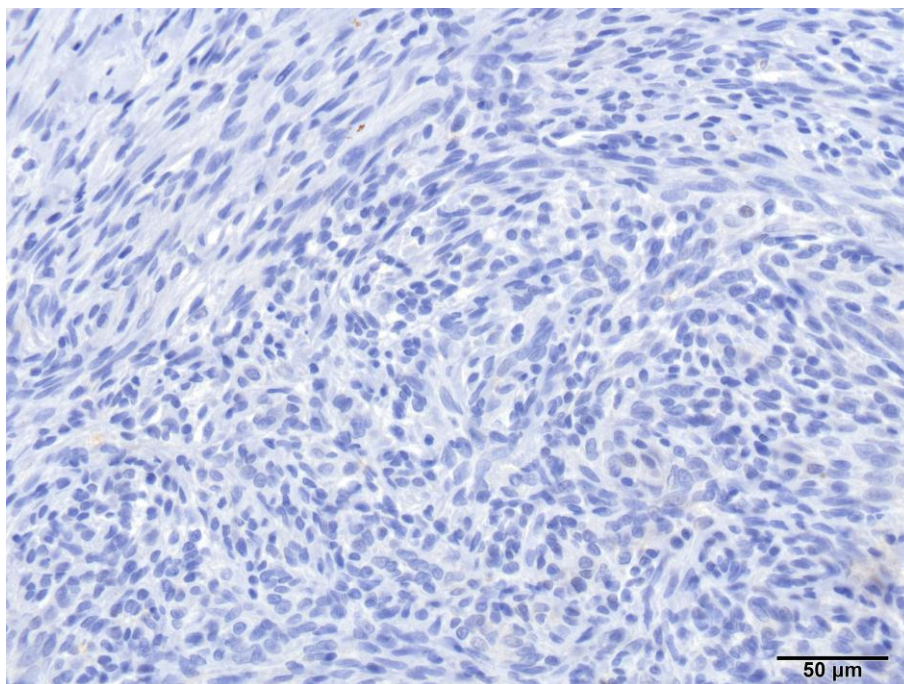
NTNC – netrostruko negativni karcinomi (engl. *non-triple-negative carcinomas*).



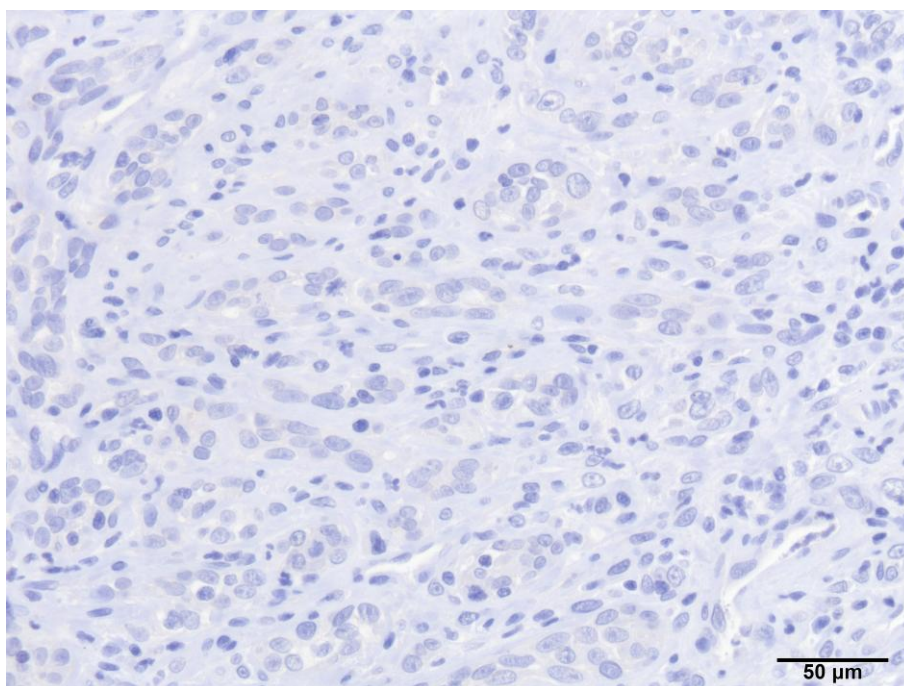
Slika 22. Složeni karcinom mliječne žlijezde, kuja, HE 40x.



Slika 23. Složeni karcinom mliječne žlijezde, kuja, negativna reakcija, ER α , IHC 40x.



Slika 24. Složeni karcinom mliječne žlijezde, kuja, negativna reakcija, PR, IHC 40x.



Slika 25. Složeni karcinom mliječne žlijezde, kuja, negativna reakcija, HER2, IHC 40x.

5.3.3. Udio trostruko negativnih u odnosu na ostale karcinome unutar histoloških stupnjeva malignosti

Trostruko negativni karcinomi bili su zastupljeni u svim histološkim stupnjevima malignosti. Najveći udio trostruko negativnih karcinoma pripadao je stupnju malignosti II (6/13; 46,15 %), dok su tri karcinoma (23,08 %) bila stupanj malignosti I, odnosno njih četiri (30,77 %) pripadalo je stupnju malignosti III. U skupini ostalih karcinoma najveći udio činili su karcinomi unutar stupnja malignosti I (12/22; 54,55 %), dok je po pet karcinoma (22,73 %) pripadalo stupnju malignosti II i III (Tablica 9).

Tablica 9. Raspodjela trostruko negativnih i ostalih karcinoma prema histološkom stupnju malignosti

Histološki stupanj malignosti	Trostruko negativni karcinomi n (%)	Ostali karcinomi n (%)
I	3 (23,08)	12 (54,55)
II	6 (46,15)	5 (22,73)
III	4 (30,77)	5 (22,73)
Ukupno	13 (100,00)	22 (100,00)

5.3.4. Biološko ponašanje trostruko negativnih i ostalih karcinoma mliječne žlijezde

Unutar skupine kuja s trostruko negativnim karcinomima češće su utvrđene metastaze te je zabilježeno kraće vrijeme preživljenja nego u skupini životinja s ostalim karcinomima. Rezultati za prethodno navedene parametre biološkog ponašanja pokazali su statistički vrlo značajnu povezanost ($p < 0,01$). Trostruko negativni fenotip bio je statistički značajno povezan s razdobljem bez bolesti ($p < 0,05$), pri čemu je u ovoj skupini karcinoma zabilježen veći udio životinja s pojavom proliferacije unutar šest mjeseci nakon operacije u odnosu na skupinu ostalih karcinoma. Sve zabilježene vrijednosti parametara biološkog ponašanja trostruko negativnih i ostalih karcinoma prikazane su u Tablici 10.

Tablica 10. Parametri biološkog ponašanja trostruko negativnih i ostalih karcinoma mliječne žlijezde

Parametar	Trostruko negativni karcinomi		Ostali karcinomi		<i>p</i> -vrijednost
	n	%	n	%	
Pojava proliferacije					> 0,05
Utvrđena	4	36,36	2	11,11	
Neutvrđena	7	63,64	16	88,89	
Razdoblje bez bolesti					< 0,05*
Bez proliferacije	7	63,64	16	94,12	
≤ 6 mjeseci	4	36,36	0	0,00	
7 – 12 mjeseci	0	0,00	1	5,88	
> 12 mjeseci	0	0,00	0	0,00	
Metastaze					< 0,01**
Utvrđene	7	77,78	3	17,65	
Neutvrđene	2	22,22	14	82,35	
Vrijeme preživljenja					< 0,01**
< 1 godinu	10	90,91	4	22,22	
1 – 2 godine	0	0,00	2	11,11	
> 2 – 3 godine	0	0,00	4	22,22	
> 3 godine	1	9,09	8	44,44	

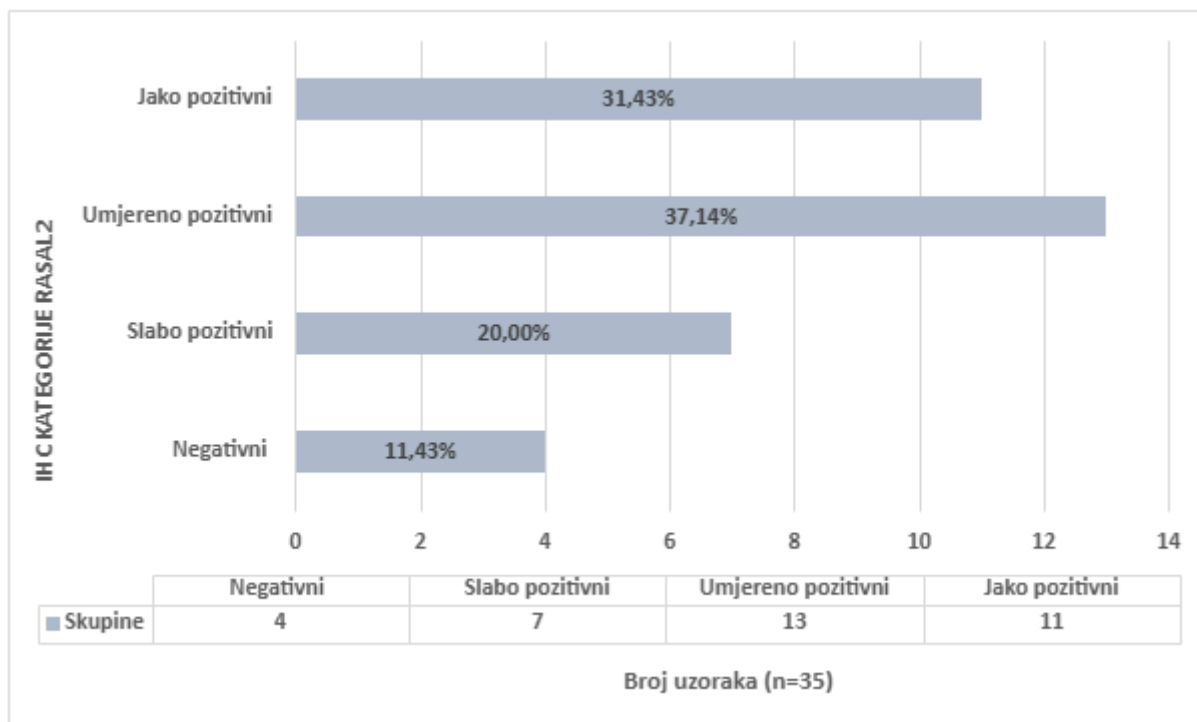
Postoci su izračunati u odnosu na broj slučajeva s dostupnim podacima za pojedini parametar unutar navedenih skupina karcinoma.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

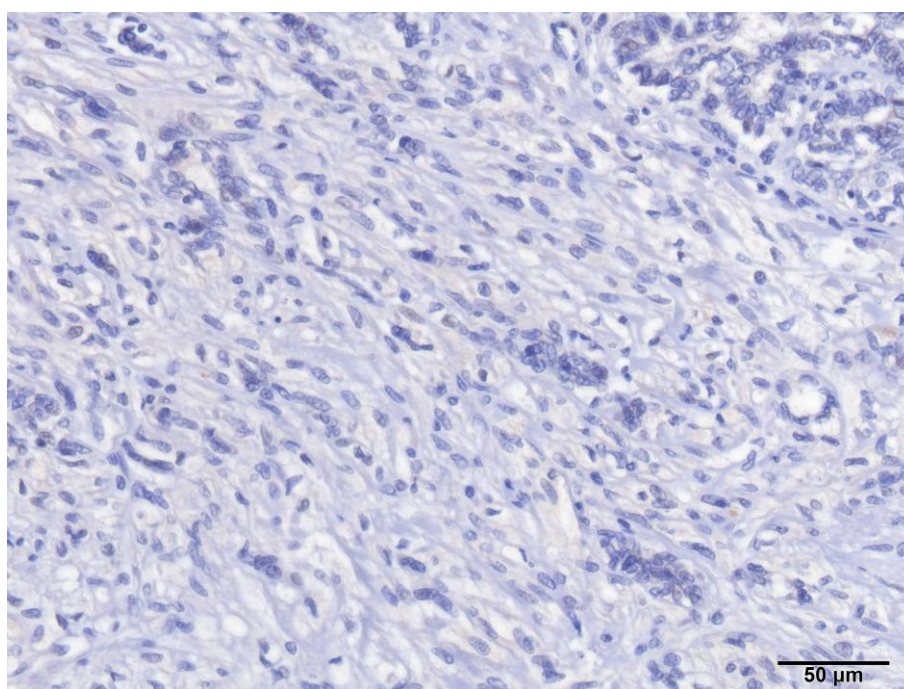
5.4. IMUNOHISTOKEMIJSKA EKSPRESIJA PROTEINA RASAL2 U KARCINOMIMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA

5.4.1. Raspodjela ekspresije RASAL2 unutar kategorija

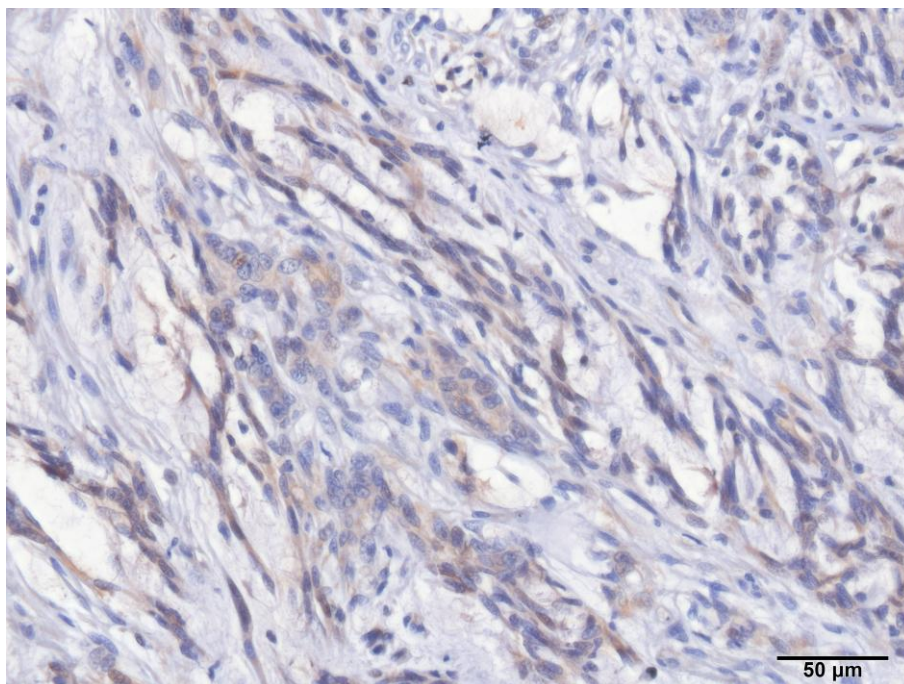
Negativna ekspresija proteina RASAL2 utvrđena je u 4 karcinoma (11,43 %), slabo pozitivna bila je u 7 (20,00 %), umjereno pozitivna u 13 (37,14 %), a jako pozitivna u 11 karcinoma (31,43 %). Pozitivna imunohistokemijska reakcija na RASAL2 očitovala se citoplazmatskim bojenjem tumorskih stanica, a citoplazmatska reakcija bila je prisutna i u morfološki nepromijenjenim epitelnim stanicama mliječne žlijezde. Raspodjela karcinoma prema kategorijama ekspresije RASAL2 grafički je prikazana na Slici 26. Imunohistokemijska ekspresija prema pojedinoj kategoriji prikazana je Slikama 27-30.



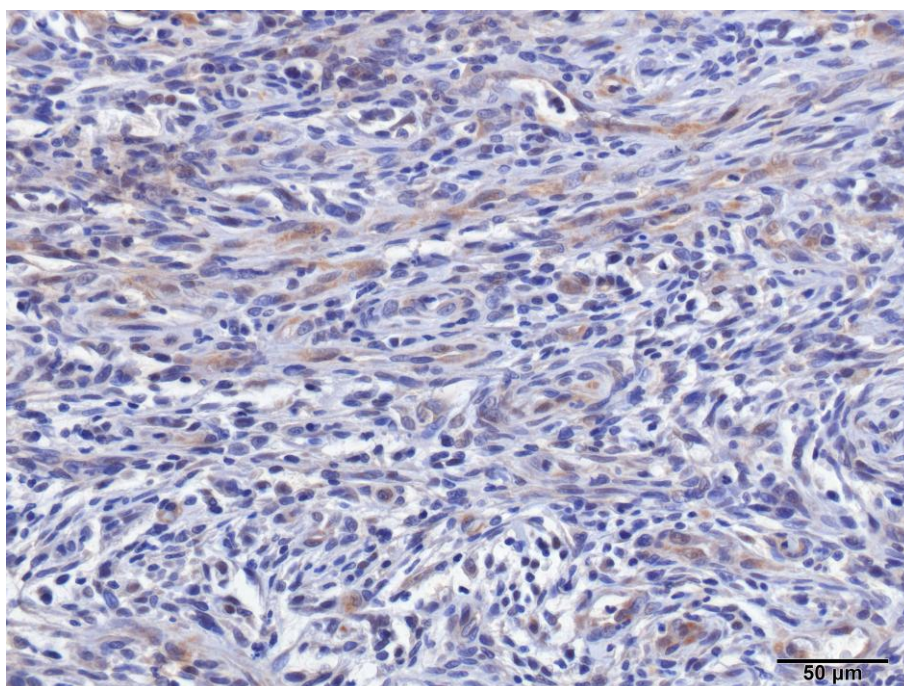
Slika 26. Raspodjela imunohistokemijske ekspresije RASAL2 u karcinomima mliječne žlijezde kuja.



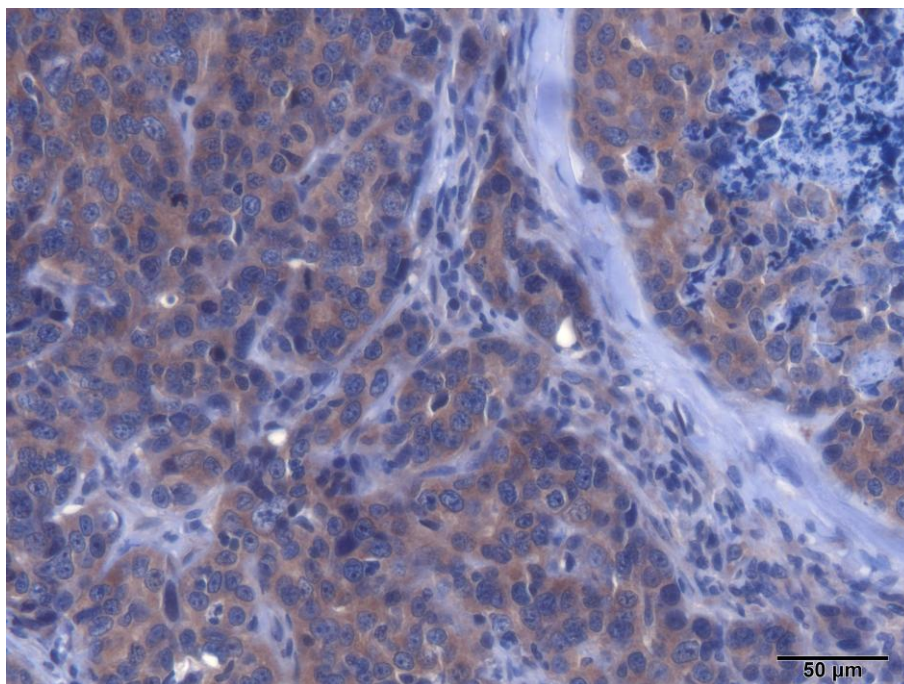
Slika 27. Složeni karcinom mliječne žlijezde, kuja, negativna reakcija, RASAL2, IHC 40x.



Slika 28. Složeni karcinom mliječne žlijezde, kuja, slabo pozitivna reakcija, RASAL2, IHC 40x.



Slika 29. Složeni karcinom mliječne žlijezde, kuja, umjereno pozitivna reakcija, RASAL2, IHC 40x.



Slika 30. Tubularni karcinom mliječne žlijezde, kuja, jako pozitivna reakcija, RASAL2, IHC 40x.

5.4.2. Ekspresija proteina RASAL2 prema histološkom tipu karcinoma

Unutar različitih histopatoloških tipova karcinoma, zabilježene su različite kategorije ekspresije proteina RASAL2. Za statističku su analizu kategorije umjereno pozitivne i jako pozitivne ekspresije objedinjene. Sve su kategorije ekspresije proteina RASAL2 zabilježene u složenim karcinomima. Negativna ekspresija utvrđena je u složenim karcinomima i karcinomu stanica bogatih lipidima, dok je slabo pozitivna ekspresija zabilježena u tubulopapilarnim, tubularnim, složenim i mješovitim karcinomima. Objedinjena kategorija umjereno pozitivne i jako pozitivne ekspresije utvrđena je u sedam od devet histopatoloških tipova karcinoma. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između ekspresije proteina RASAL2 i histopatološkog tipa karcinoma ($p > 0,05$). Raspodjela ekspresije proteina RASAL2 prema histopatološkom tipu karcinoma prikazana je u Tablici 11.

Tablica 11. Raspodjela ekspresije proteina RASAL2 prema histopatološkom tipu karcinoma

Histopatološki tip tumora	Negativna ekspresija n	Slabo pozitivna ekspresija n	Umjereno pozitivna i jako pozitivna ekspresija n	<i>p</i> -vrijednost
Tubulopapilarni karcinom	0	1	2	> 0,05
Tubularni karcinom	0	1	4	
Složeni karcinom	3	4	13	
Mješoviti karcinom	0	1	0	
Solidni karcinom	0	0	2	
Karcinom stanica bogatih lipidima	1	0	0	
Komedokarcinom	0	0	1	
Karcinom <i>in situ</i>	0	0	1	
Duktalni karcinom	0	0	1	
Ukupno	4	7	24	

5.4.3. Ekspresija proteina RASAL2 prema histološkom stupnju malignosti

Pojavnost slabo pozitivne, umjereno i jako pozitivne kategorije ekspresije proteina RASAL2 zabilježene su u karcinomima svih histoloških stupnjeva malignosti, dok negativna ekspresija nije utvrđena u uzorcima stupnja malignosti III. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između ekspresije RASAL2 i histološkog stupnja malignosti. Raspodjela ekspresije proteina RASAL2 prema histološkom stupnju malignosti prikazana je u Tablici 12.

Tablica 12. Raspodjela ekspresije RASAL2 prema histološkom stupnju malignosti karcinoma

Ekspresija RASAL2	Stupanj I n (%)	Stupanj II n (%)	Stupanj III n (%)	<i>p</i>-vrijednost
Negativna	2 (13,33)	2 (18,18)	0 (0,00)	> 0,05
Slabo pozitivna	2 (13,33)	4 (36,36)	1 (11,11)	
Umjereno pozitivna	7 (46,67)	2 (18,18)	4 (44,44)	
Jako pozitivna	4 (26,67)	3 (27,27)	4 (44,44)	
Ukupno	15 (100,00)	11 (100,00)	9 (100,00)	

5.4.4. Ekspresija proteina RASAL2 u trostruko negativnim i ostalim karcinomima mliječne žlijezde

Sve kategorije ekspresije RASAL2 bile su zastupljene u objema skupinama karcinoma. U skupini trostruko negativnih karcinoma najzastupljenija je bila slabo pozitivna ekspresija, dok su u skupini ostalih karcinoma prevladavale umjereno pozitivna i jako pozitivna ekspresija. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između ekspresije proteina RASAL2 i trostruko negativnog fenotipa. Raspodjela pojedinih kategorija ekspresije proteina RASAL2 u trostruko negativnim i ostalim karcinomima prikazana je u Tablici 13.

Tablica 13. Raspodjela ekspresije proteina RASAL2 u trostruko negativnim i ostalim karcinomima

Ekspresija RASAL2	Trostruko negativni karcinomi n (%)	Ostali karcinomi n (%)	<i>p</i>-vrijednost
Negativna	2 (15,38)	2 (9,09)	> 0,05
Slabo pozitivna	5 (38,46)	2 (9,09)	
Umjereno pozitivna	2 (15,38)	11 (50,00)	
Jako pozitivna	4 (30,77)	7 (31,82)	
Ukupno	13 (100,00)	22 (100,00)	

5.4.5. Povezanost ekspresije proteina RASAL2 s biološkim ponašanjem karcinoma

Za statističku su analizu kategorije umjereno pozitivne i jako pozitivne ekspresije proteina RASAL2 objedinjene. Utvrđena je statistički značajna povezanost između ekspresije proteina RASAL2 i razdoblja bez bolesti ($p < 0,05$). Najveći je udio slučajeva bez ponovne proliferacije tumora zabilježen u objedinjenoj kategoriji umjereno i jako pozitivne ekspresije, a najmanji u kategoriji negativne ekspresije. Za ostale pokazatelje biološkog ponašanja karcinoma nije utvrđena statistički značajna povezanost s ekspresijom proteina RASAL2. Sve su zabilježene vrijednosti prikazane u Tablici 14.

Tablica 14. Povezanost ekspresije proteina RASAL2 s pokazateljima biološkog ponašanja karcinoma

Parametar	Negativna ekspresija n (%)	Slabo pozitivna ekspresija n (%)	Umjereno pozitivna i jako pozitivna ekspresija n (%)	<i>p</i> -vrijednost
Pojava proliferacije				> 0,05
Utvrđena	1 (50,00)	2 (33,33)	4 (19,05)	
Neutvrđena	1 (50,00)	4 (66,67)	17 (80,95)	
Razdoblje bez bolesti				< 0,05*
Bez proliferacije	1 (50,00)	4 (66,67)	17 (89,47)	
≤ 6 mjeseci	1 (50,00)	2 (33,33)	1 (5,26)	
7 – 12 mjeseci	0 (00,00)	0 (0,00)	1 (5,26)	
> 12 mjeseci	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
Metastaze				> 0,05
Utvrđene	2 (100,00)	3 (50,00)	5 (31,25)	
Neutvrđene	0 (0,00)	3 (50,00)	11 (68,75)	
Vrijeme preživljenja				> 0,05
< 1 godine	1 (50,00)	5 (71,43)	8 (40,00)	
1 – 2 godine	1 (50,00)	0 (0,00)	1 (5,00)	
> 2 – 3 godine	0 (0,00)	1 (14,29)	3 (15,00)	
> 3 godine	0 (0,00)	1 (14,29)	8 (40,00)	

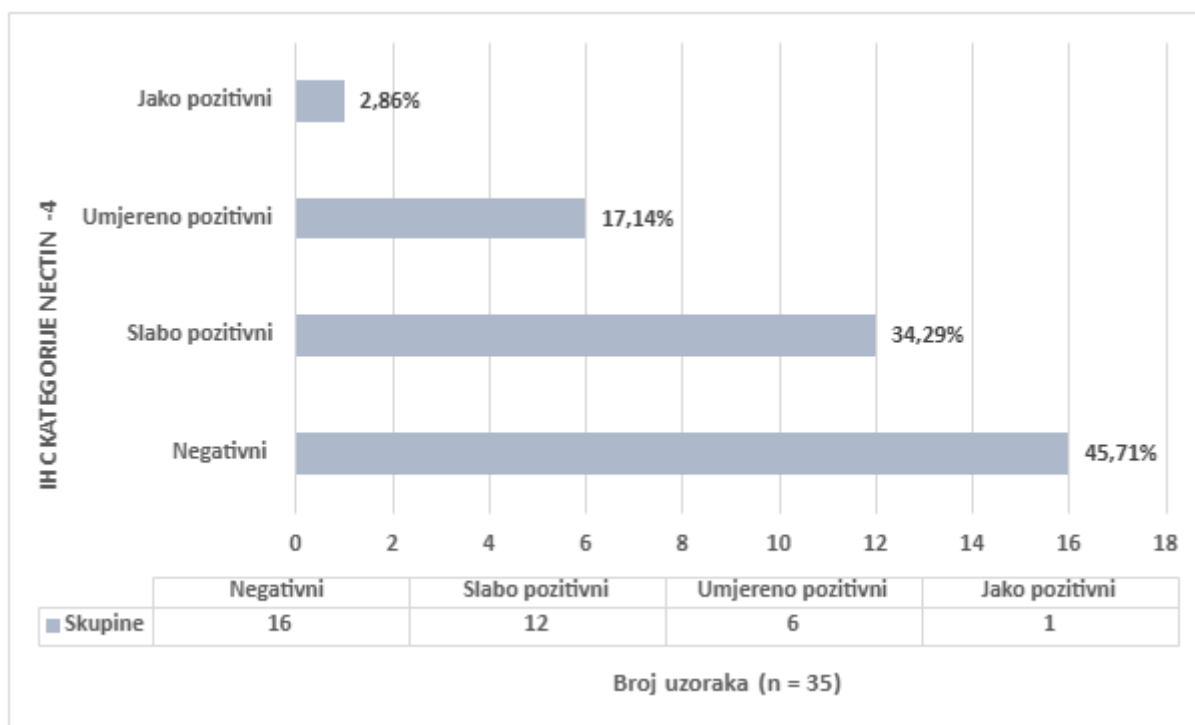
Postoci su izračunati u odnosu na broj slučajeva s dostupnim podacima za pojedini parametar unutar jedne kategorije ekspresije.

* $p < 0,05$

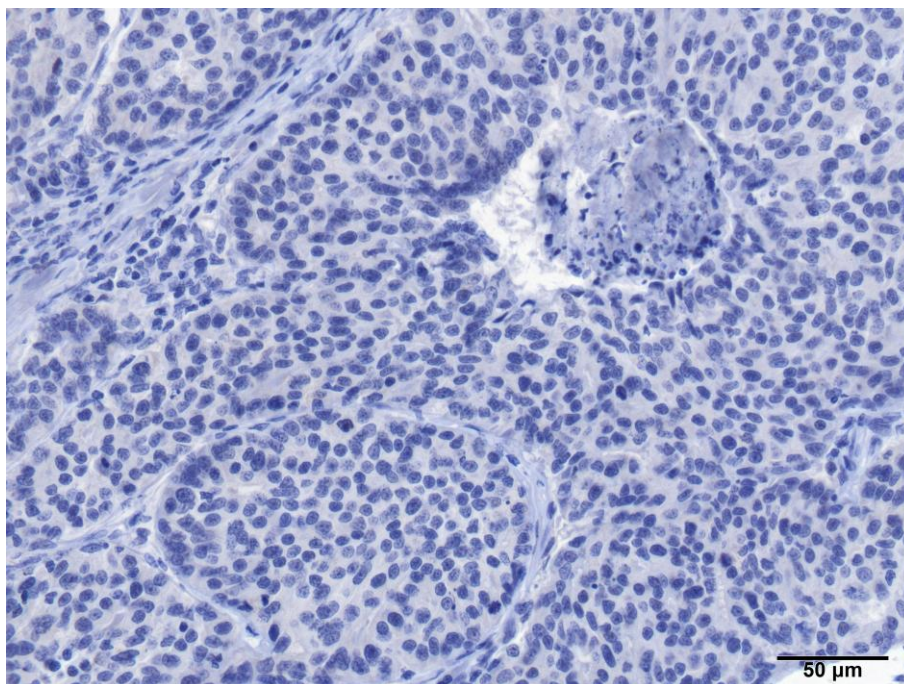
5.5. IMUNOHISTOKEMIJSKA EKSPRESIJA PROTEINA NECTIN-4 U KARCINOMIMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA

5.5.1. Raspodjela ekspresije unutar kategorija

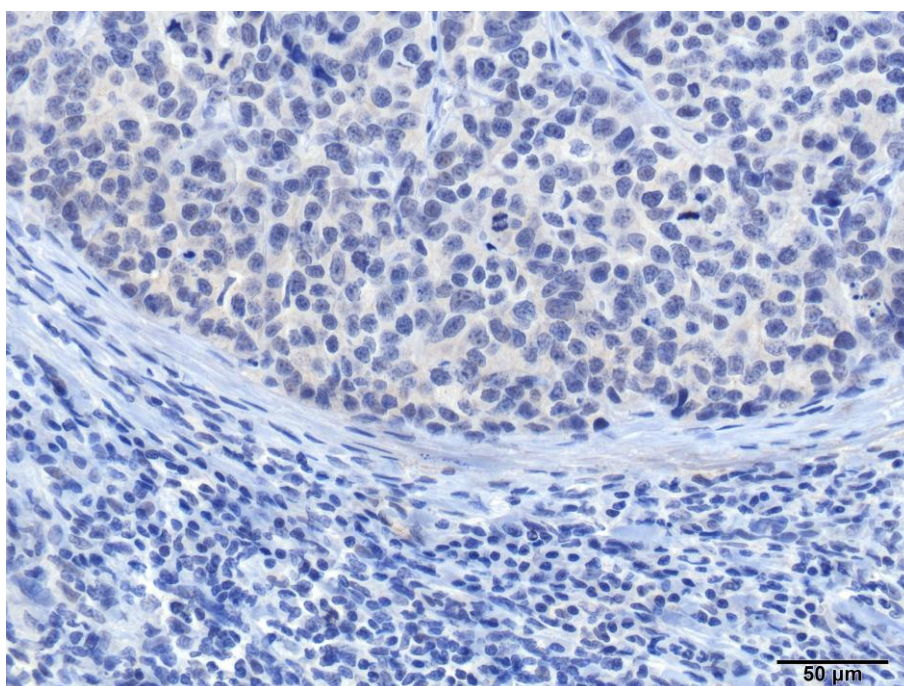
Imunohistokemijskom pretragom kategorija negativne ekspresije proteina NECTIN-4 utvrđena je u 16 karcinoma (45,71 %), slabo pozitivne u 12 (34,29 %), umjereno pozitivne u šest (17,14 %) te jako pozitivne u jednom karcinomu (2,86 %). Pozitivna imunohistokemijska reakcija na NECTIN-4 očitovala se citoplazmatskim bojenjem tumorskih stanica. Raspodjela ekspresije prema kategorijama za NECTIN-4 grafički je prikazana na Slici 31, dok su negativna, slabo pozitivna, umjereno i jako pozitivna imunohistokemijska ekspresija proteina NECTIN-4 prikazane Slikama 32 –35.



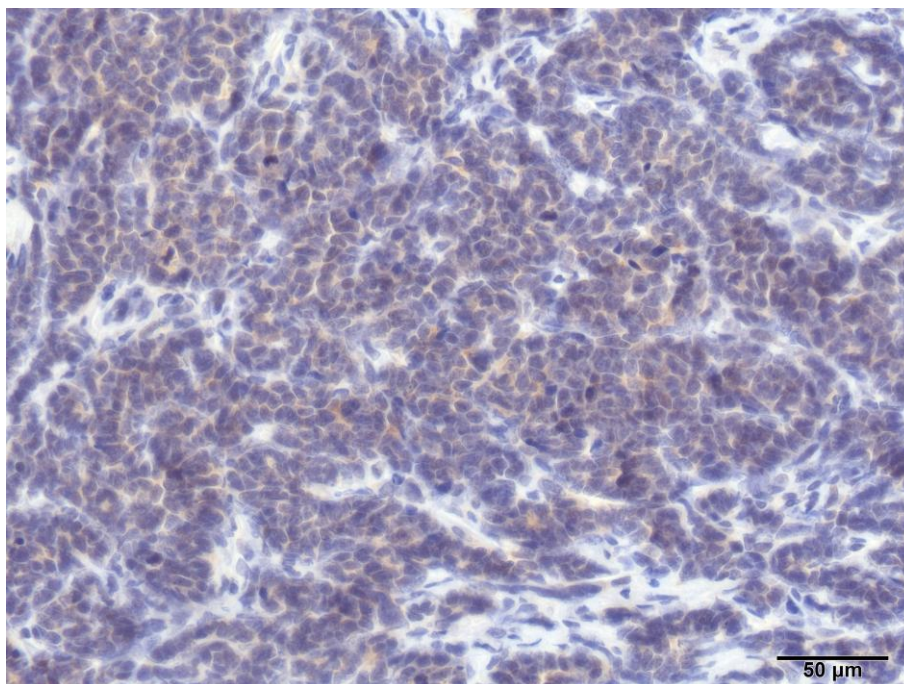
Slika 31. Raspodjela imunohistokemijske ekspresije proteina NECTIN-4 u karcinomima mliječne žlijezde kuja.



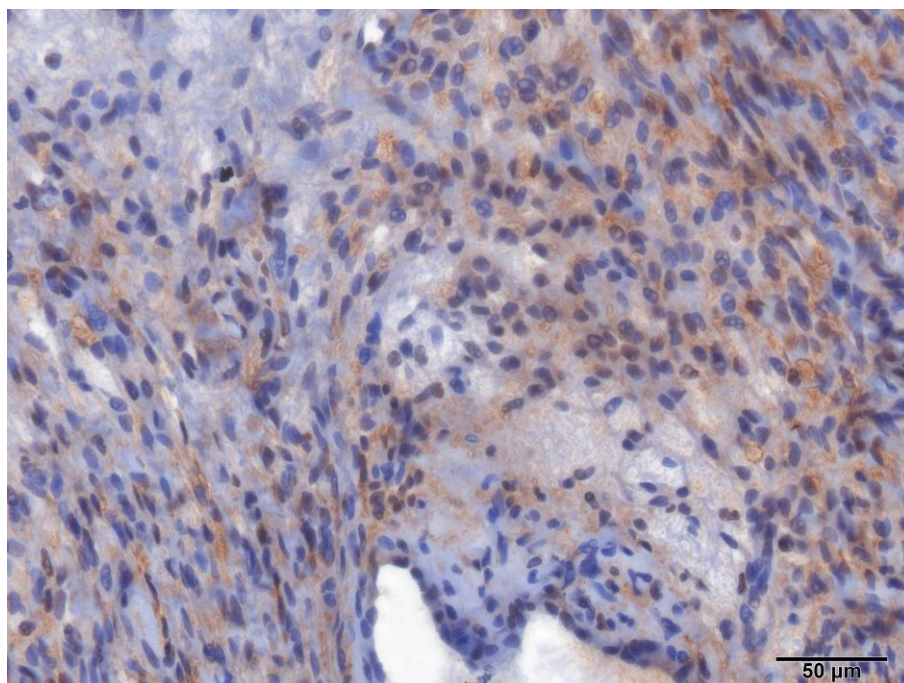
Slika 32. Komedokarcinom mliječne žlijezde, kuja, negativna reakcija, NECTIN-4, IHC 40x.



Slika 33. Tubularni karcinom mliječne žlijezde, kuja, slabo pozitivna reakcija, NECTIN-4, IHC 40x.



Slika 34. Tubularni karcinom mliječne žlijezde, kuja, umjereno pozitivna reakcija, NECTIN-4, IHC 40x.



Slika 35. Složeni karcinom mliječne žlijezde, kuja, jako pozitivna reakcija, NECTIN-4, IHC 40x.

5.5.2. Ekspresija proteina NECTIN-4 prema histološkom tipu karcinoma

Raspodjela ekspresije proteina NECTIN-4 razlikovala se među histopatološkim tipovima karcinoma. Za statističku su analizu kategorije umjereno pozitivne i jako pozitivne ekspresije objedinjene u jednu kategoriju. Sve su kategorije ekspresije proteina NECTIN-4 zabilježene u tubularnim i složenim karcinomima. Negativna je ekspresija utvrđena u sedam od devet histopatoloških tipova, dok je slabo pozitivna ekspresija zabilježena u tubulopapilarnim, tubularnim, složenim i solidnim karcinomima. Objedinjena kategorija umjereno pozitivne i jako pozitivne ekspresije utvrđena je u tubulopapilarnim, tubularnim, složenim i solidnim karcinomima. Nije utvrđena statistički značajna povezanost ekspresije proteina NECTIN-4 prema histopatološkom tipu karcinoma ($p > 0,05$). Raspodjela ekspresije proteina NECTIN-4 u odnosu na histopatološki tip karcinoma prikazana je u Tablici 15.

Tablica 15. Raspodjela ekspresije proteina NECTIN-4 prema histopatološkom tipu karcinoma

Histopatološki tip tumora	Negativna ekspresija n	Slabo pozitivna ekspresija n	Umjereno pozitivna i jako pozitivna ekspresija n	<i>p</i> -vrijednost
Tubulopapilarni karcinom	0	2	1	> 0,05
Tubularni karcinom	2	2	1	
Složeni karcinom	9	7	4	
Mješoviti karcinom	1	0	0	
Solidni karcinom	0	1	1	
Karcinom stanica bogatih lipidima	1	0	0	
Komedokarcinom	1	0	0	
Karcinom <i>in situ</i>	1	0	0	
Duktalni karcinom	1	0	0	
Ukupno	16	12	7	

5.5.3. Ekspresija proteina NECTIN-4 prema histološkom stupnju malignosti

Unutar skupine karcinoma stupnja malignosti III zabilježene su sve kategorije ekspresije, dok jako pozitivna ekspresija nije utvrđena u karcinomima stupnja malignosti I i II. Kategorija negativne ekspresije bila je najzastupljenija u karcinomima stupnja malignosti III, dok je u karcinomima stupnja malignosti II najzastupljenija bila slabo pozitivna ekspresija. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između ekspresije proteina NECTIN-4 i histološkog stupnja malignosti. Raspodjela ekspresije proteina NECTIN-4 prema histološkom stupnju malignosti prikazana je u Tablici 16.

Tablica 16. Raspodjela ekspresije proteina NECTIN-4 prema histološkom stupnju malignosti karcinoma mliječne žlijezde kuja

Ekspresija NECTIN-4	Stupanj I n (%)	Stupanj II n (%)	Stupanj III n (%)	<i>p</i>-vrijednost
Negativna	7 (46,67)	4 (36,36)	5 (55,56)	> 0,05
Slabo pozitivna	5 (33,33)	6 (54,55)	1 (11,11)	
Umjereno pozitivna	3 (20,00)	1 (9,09)	2 (22,22)	
Jako pozitivna	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (11,11)	
Ukupno	15 (100,00)	11 (100,00)	9 (100,00)	

5.5.4. Ekspresija proteina NECTIN-4 u trostruko negativnim i ostalim karcinomima mliječne žlijezde

Kategorije negativne, slabo i umjereno pozitivne ekspresije proteina NECTIN-4 zabilježene su u objema skupinama karcinoma, dok je jako pozitivna ekspresija utvrđena samo u skupini ostalih karcinoma. U trostruko negativnim karcinomima najzastupljenija je bila negativna ekspresija proteina NECTIN-4, dok je u skupini ostalih karcinoma najzastupljenija bila slabo pozitivna ekspresija. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između ekspresije proteina NECTIN-4 i trostruko negativnog fenotipa. Raspodjela pojedinih kategorija ekspresije proteina NECTIN-4 u trostruko negativnim i ostalim karcinomima prikazana je u Tablici 17.

Tablica 17. Raspodjela ekspresije proteina NECTIN-4 u trostruko negativnim i ostalim karcinomima

Ekspresija NECTIN-4	Trostruko negativni karcinomi n (%)	Ostali karcinomi n (%)	<i>p</i>-vrijednost
Negativna	8 (61,54)	8 (36,36)	> 0,05
Slabo pozitivna	3 (23,08)	9 (40,91)	
Umjereno pozitivna	2 (15,38)	4 (18,18)	
Jako pozitivna	0 (0,00)	1 (4,55)	
Ukupno	13 (100,00)	22 (100,00)	

5.5.5. Povezanost ekspresije proteina NECTIN-4 s biološkim ponašanjem karcinoma

Za statističku su analizu kategorije umjereno pozitivne i jako pozitivne ekspresije proteina NECTIN-4 objedinjene. U skupini karcinoma s negativnom ekspresijom proteina NECTIN-4 zabilježen je veći udio slučajeva s ponovnom proliferacijom tumora u odnosu na ostale kategorije ekspresije. Utvrđena je statistički značajna povezanost ekspresije proteina NECTIN-4 s razdobljem bez bolesti ($p < 0,001$), pri čemu su u skupini sa slabo pozitivnom ekspresijom svi slučajevi s dostupnim podacima bili bez ponovne proliferacije tumora. Statistički značajna povezanost utvrđena je i s vremenom preživljenja ($p < 0,05$), pri čemu je najveći udio životinja s vremenom preživljenja kraćim od jedne godine zabilježen u skupini s negativnom ekspresijom, a najmanji u objedinjenoj kategoriji umjereno i jako pozitivne ekspresije. Statistički značajna povezanost ekspresije proteina NECTIN-4 s pojavom proliferacije i metastaza nije utvrđena. Sve su vrijednosti prikazane u Tablici 18.

Tablica 18. Povezanost ekspresije proteina NECTIN-4 s pokazateljima biološkog ponašanja karcinoma

Parametar	Negativna ekspresija n (%)	Slabo pozitivna ekspresija n (%)	Umjereno pozitivna i jako pozitivna ekspresija n (%)	<i>p</i> -vrijednost
Pojava proliferacije				> 0,05
Utvrđena	4 (28,57)	1 (11,11)	1 (16,67)	
Neutvrđena	10 (71,43)	8 (88,89)	5 (83,33)	
Razdoblje bez bolesti				< 0,001***
Bez proliferacije	10 (76,92)	8 (100,00)	5 (83,33)	
≤ 6 mjeseci	3 (23,08)	0 (0,00)	1 (16,67)	
7 – 12 mjeseci	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
> 12 mjeseci	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	
Metastaze				> 0,05
Utvrđene	6 (50,00)	3 (37,50)	1 (16,67)	
Neutvrđene	6 (50,00)	5 (62,50)	5 (83,33)	
Vrijeme preživljenja				< 0,05*
< 1 godine	11 (73,33)	4 (50,00)	1 (16,67)	
1 – 2 godine	2 (13,33)	0 (0,00)	2 (33,33)	
2 – 3 godine	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (16,67)	
> 3 godine	2 (13,33)	4 (50,00)	2 (33,33)	

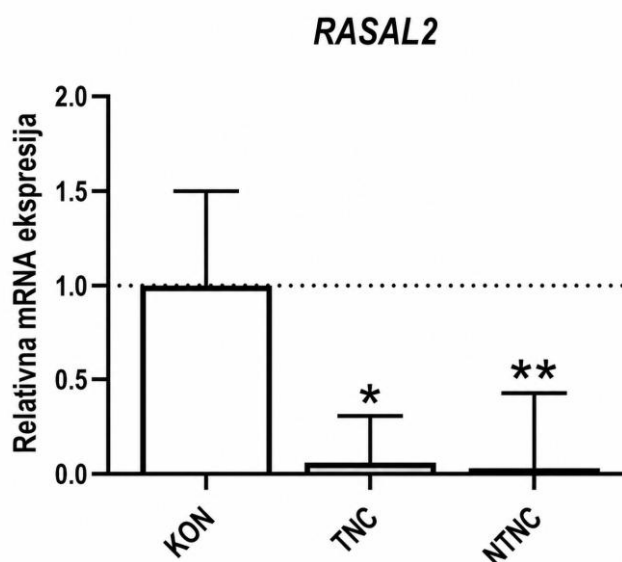
Postoci su izračunati u odnosu na broj slučajeva s dostupnim podacima za pojedini parametar unutar jedne kategorije ekspresije.

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

5.6. REZULTATI RT-qPCR EKSPRESIJE GENA *RASAL2* I *NECTIN4* U UZORCIMA KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA

5.6.1. Relativna ekspresija gena *RASAL2*

Relativna ekspresija mRNA gena *RASAL2* u kontrolnoj skupini te u trostruko negativnim i ostalim karcinomima mliječne žlijezde kuja prikazana je na Slici 36. U objema skupinama karcinoma utvrđena je smanjena relativna ekspresija gena *RASAL2* u odnosu na kontrolnu skupinu. Smanjenje ekspresije bilo je statistički značajno u skupini trostruko negativnih karcinoma ($p < 0,05$) te u skupini ostalih karcinoma ($p < 0,01$).

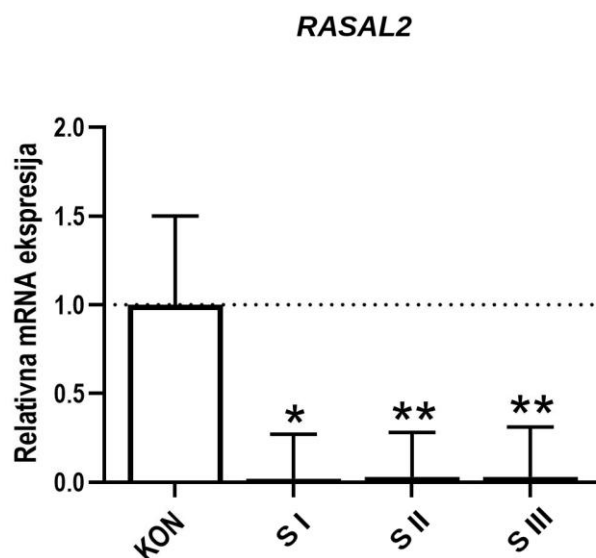


Slika 36. Relativna ekspresija mRNA gena *RASAL2* u kontrolnoj skupini te u trostruko negativnim i ostalim karcinomima mliječne žlijezde kuja.

KON – kontrolna skupina; *TNC* – trostruko negativni karcinomi; *NTNC* – ostali karcinomi mliječne žlijezde (netrostruko negativni). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($n = 5$). Isprekidana crta označuje relativnu ekspresiju u kontrolnoj skupini, postavljenu na vrijednost 1. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu označena je s * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$.

Relativna ekspresija mRNA gena *RASAL2* u kontrolnoj skupini i karcinomima pojedinih histoloških stupnjeva malignosti prikazana je na Slici 37. U karcinomima svih histoloških stupnjeva malignosti (I, II, III), utvrđena je smanjena relativna ekspresija gena

RASAL2 u odnosu na kontrolnu skupinu. Smanjenje ekspresije bilo je statistički značajno u karcinomima stupnja malignosti I ($p < 0,05$) te u karcinomima stupnja malignosti II i III ($p < 0,01$).

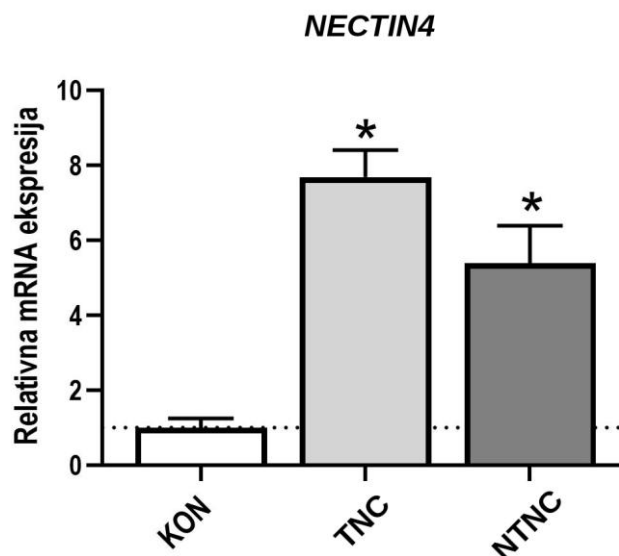


Slika 37. Relativna ekspresija mRNA gena *RASAL2* u kontrolnoj skupini te u karcinomima različitih histoloških stupnjeva malignosti.

KON – kontrolna skupina; *S I* – karcinomi stupnja malignosti I; *S II* – karcinomi stupnja malignosti II; *S III* – karcinomi stupnja malignosti III. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija ($n = 5$). Isprekidana crta označuje relativnu ekspresiju u kontrolnoj skupini, postavljenu na vrijednost 1. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu označena je s * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$.

5.6.2. Relativna ekspresija gena *NECTIN4*

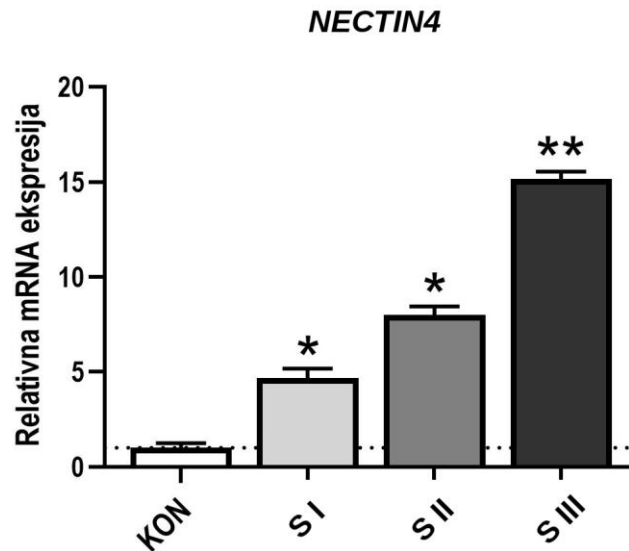
Relativna ekspresija mRNA gena *NECTIN4* u kontrolnoj skupini te u trostruko negativnim i ostalim karcinomima mliječne žlijezde kuja prikazana je na Slici 38. U objema skupinama karcinoma utvrđena je povećana relativna ekspresija gena *NECTIN-4* u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećanje ekspresije bilo je statistički značajno u trostruko negativnim i ostalim karcinomima ($p < 0,05$).



Slika 38. Relativna ekspresija mRNA gena *NECTIN4* u kontrolnoj skupini te u trostruko negativnim i ostalim karcinomima mliječne žlijezde kuja.

KON – kontrolna skupina; *TNC* – trostruko negativni karcinomi; *NTNC* – ostali karcinomi mliječne žlijezde (netrostruko negativni). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija ($n = 5$). Isprekidana crta označuje relativnu ekspresiju u kontrolnoj skupini, postavljenu na vrijednost 1. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu označena je s * $p < 0,05$.

Relativna ekspresija mRNA gena *NECTIN4* u kontrolnoj skupini i karcinomima pojedinih histoloških stupnjeva malignosti prikazana je na Slici 39. U karcinomima svih histoloških stupnjeva malignosti (I, II, III) utvrđena je povećana relativna ekspresija gena *NECTIN-4* u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećanje ekspresije bilo je statistički značajno u karcinomima stupnja malignosti I i II ($p < 0,05$) te u karcinomima stupnja malignosti III ($p < 0,01$). Najviša je aritmetička sredina relativne ekspresije zabilježena u karcinomima stupnja malignosti III.



Slika 39. Relativna ekspresija mRNA gena *NECTIN4* u kontrolnoj skupini te u karcinomima histološkog stupnja malignosti I, II i III.

KON – kontrolna skupina; *S I* – karcinomi stupnja malignosti I; *S II* – karcinomi stupnja malignosti II; *S III* – karcinomi stupnja malignosti III. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija ($n = 5$). Isprekidana crta označuje relativnu ekspresiju u kontrolnoj skupini, postavljenu na vrijednost 1. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu označena je s * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$.

6. RASPRAVA

6.1. DOB, PASMINA I KASTRACIJSKI STATUS KUJA

Novotvorine mliječne žlijezde pretežno se pojavljuju u srednje starih i starijih kuja. U prethodno istraženju populaciji kuja s novotvorinama mliječne žlijezde u Hrvatskoj, medijan dobi pri dijagnozi iznosio je 10 godina, uz raspon od 4 do 15 godina (GUDAN KURILJ i sur., 2011.). U ovom je istraživanju prosječna dob kuja s karcinomima mliječne žlijezde iznosila $10,89 \pm 2,26$ godine, uz medijan od 11 godina. Slična je dobna raspodjela opisana i u većem epidemiološkom istraživanju, u kojemu su novotvorine mliječne žlijezde najčešće utvrđene u kuja u dobi od 9 do 12 godina (SALAS i sur., 2015.). U novijem preglednom radu navodi se medijan dobi pri dijagnozi između 8 i 10 godina (VAZQUEZ i sur., 2023.). Nešto viši medijan dobi zabilježen u ovom istraživanju ne odstupa bitno od navedenih podataka.

Zastupljenost pojedinih pasmina razlikuje se među istraživanjima provedenima u različitim zemljama (SALAS i sur., 2015.). Pri tumačenju takvih razlika potrebno je uzeti u obzir strukturu populacije pasa iz koje potječu analizirani slučajevi, kao i način njihova uključivanja u istraživanje. Epidemiološki podaci dobiveni iz veterinarskih ustanova, registara tumora i drugih izdvojenih populacija ne moraju u potpunosti odražavati obilježja ukupne populacije pasa (VAZQUEZ i sur., 2023.). U našem je istraživanju bilo zastupljeno 18 različitih pasmina, pri čemu su najbrojniji bili mješanci, zatim psi pasmine ši-cu, a slijedili su srednji pudl, engleski koker španijel, malteški psić, jorkširski terijer i zlatni retriever. U prethodnom istraživanju novotvorina mliječne žlijezde kuja u Hrvatskoj također su najzastupljeniji bili mješanci, a slijedili su pudli, koker španijeli i njemački ovčari (GUDAN KURILJ i sur., 2011.). Podudarnost u zastupljenosti mješanaca, pudla i koker španijela između dviju istraživanih skupina je zanimljiva, ali se zbog malog broja životinja unutar pojedinih pasmina u našem istraživanju ne može tumačiti kao pokazatelj pasminske predispozicije. Zastupljenost pojedinih pasmina stoga treba promatrati ponajprije kao obilježje istraživane skupine.

Rana kastracija povezana je s manjim rizikom od razvoja novotvorina mliječne žlijezde, dok se odgađanjem zahvata ta povezanost smanjuje (SCHNEIDER i sur., 1969.; SALAS i sur., 2015.; VAZQUEZ i sur., 2023.). Među kujama u ovom istraživanju, za koje je bio dostupan podatak o kastracijskom statusu, prevladavale su nekastrirane životinje, dok su sve kastrirane bile podvrgnute zahvatu nakon navršene treće godine života. U prethodnom istraživanju provedenom u Hrvatskoj kao jedno od mogućih objašnjenja visokog udjela malignih novotvorina razmatrani su velik broj nekastriranih kuja i kastracija u starijoj dobi, uz napomenu

da kasna kastracija ne smanjuje rizik od razvoja ovih novotvorina mliječne žlijezde (GUDAN KURILJ i sur., 2011.). Nijedna kuja iz istraživane skupine u ovom istraživanju nije bila podvrgnuta ranoj kastraciji, zbog čega nije bilo moguće neposredno procijeniti njezin zaštitni učinak. Prevladavanje nekastriranih kuja u skladu je i s novijim istraživanjem u kojemu je među kujama s tumorima mliječne žlijezde utvrđen veći udio nekastriranih životinja (GEDON i sur., 2022.). Povezanost reproduktivnog statusa s razvojem ovih novotvorina ima biološko uporište u ulozi estrogena i progesterona u proliferaciji tkiva mliječne žlijezde, pri čemu dugotrajno hormonsko djelovanje može pridonijeti uvjetima pogodnima za neoplastičnu proliferaciju (VAZQUEZ i sur., 2023.).

6.2. HISTOPATOLOŠKA OBILJEŽJA KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA

Uzorci karcinoma mliječne žlijezde obuhvaćeni ovim istraživanjem pokazali su histološku raznolikost. Najzastupljeniji su bili složeni karcinomi, koji su činili više od polovice analiziranih uzoraka, dok su tubularni i tubulopapilarni karcinomi bili zastupljeni u znatno manjem udjelu. Prevladavanje složenih karcinoma podudara se s rezultatima prethodnog istraživanja provedenog u Hrvatskoj, u kojemu su među malignim novotvorinama također najčešće bili zastupljeni složeni i tubulopapilarni karcinomi (GUDAN KURILJ i sur., 2011.). Izravna usporedba zastupljenosti pojedinih histoloških tipova između istraživanja ipak zahtijeva oprez zbog razlika u primijenjenim klasifikacijskim sustavima. Klasifikacija iz 2011. godine omogućila je detaljniju podjelu pojedinih prethodno šire definiranih skupina karcinoma, osobito složenih, tubulopapilarnih i solidnih karcinoma (CANADAS i sur., 2019.). Stoga razlike u učestalosti pojedinih histoloških tipova među istraživanjima ne moraju nužno odražavati stvarne razlike u njihovoj pojavnosti, već mogu djelomično proizlaziti iz primjene različitih klasifikacijskih kriterija.

Histološki tip pritom nema samo dijagnostičko nego i prognostičko značenje. Prema klasifikaciji iz 2011., složeni i mješoviti karcinomi te karcinomi nastali u benignim novotvorinama povezani su s povoljnijim ishodom, dok su komedokarcinomi i karcinosarkomi povezani s kraćim preživljenjem (CANADAS i sur., 2019.). Prognostička vrijednost histološkog tipa potvrđena je i u većoj prospektivnoj skupini, u kojoj je histološka klasifikacija omogućila razlikovanje tumora s različitim rizikom lokalnog recidiva, udaljenog metastaziranja i uginuća povezanog s tumorom (RASOTTO i sur., 2017.). Zbog malog broja pojedinih histoloških tipova u našem istraživanju, njihovo prognostičko značenje nije moguće pouzdano procijeniti, no zabilježena raznolikost dodatno naglašava važnost precizne histološke klasifikacije. Histološkim stupnjevanjem u ovom su istraživanju najčešće utvrđeni karcinomi stupnja malignosti I, nakon kojih su slijedili karcinomi stupnja malignosti II i III. Usporediva raspodjela zabilježena je u prethodnom istraživanju provedenom u Hrvatskoj, u kojemu su također prevladavali karcinomi stupnja malignosti I (GUDAN KURILJ i sur., 2011.).

Posebno važan nalaz ovog istraživanja odnosi se na povezanost histološkog stupnja malignosti s biološkim ponašanjem karcinoma. S porastom stupnja malignosti povećavao se udio životinja sa zabilježenim metastazama, dok se udio životinja koje su preživjele dulje od tri godine smanjivao. Najveći udio životinja s metastazama i preživljenjem kraćim od jedne godine zabilježeni su u kuja s karcinomima stupnja malignosti III. Pokazana je statistički visoko

značajna povezanost histološkog stupnja malignosti s pojavom metastaza i vremenom preživljenja. Ovakav prelazak od povoljnijeg prema nepovoljnijem kliničkom ishodu, s porastom stupnja malignosti, jasno upućuje na njegovo prognostičko značenje u istraživanoj skupini.

Povezanost višeg histološkog stupnja s metastaziranjem i nepovoljnijim kliničkim ishodom dobro je potkrijepljena prethodnim istraživanjima. U prospektivnom istraživanju karcinomi koji su tijekom praćenja recidivirali i/ili metastazirali, većinom su pripadali stupnju malignosti III. Također, među kujama kojima su regionalni limfni čvorovi histološki pregledani, metastaze su utvrđene samo u onih s karcinomima stupnja malignosti III (PEÑA i sur., 2013.). Histološki stupanj u istom je istraživanju bio povezan s razdobljem bez bolesti i ukupnim preživljenjem te je zadržao neovisnu prognostičku vrijednost za oba pokazatelja.

Povezanost histološkog stupnja i preživljenja potvrđena je i u drugim istraživanim skupinama karcinoma mliječne žlijezde kuja. Primjenom dvaju različitih sustava stupnjevanja utvrđeno je dulje ukupno preživljenje kuja s karcinomima stupnja I, u odnosu na kuje s karcinomima stupnja malignosti II i III (CANADAS i sur., 2019.). Međutim, nakon uvođenja drugih čimbenika u analizu, histološki stupanj u tom istraživanju nije zadržao neovisnu prognostičku vrijednost. Ovakve razlike među objavljenim istraživanjima pokazuju da prognostičko značenje histološkog stupnja treba razmatrati zajedno s drugim kliničko-patološkim pokazateljima.

Premda histološki stupanj malignosti nije bio statistički značajno povezan s ponovnom pojavom proliferacije niti razdobljem bez bolesti, utvrđena povezanost s metastaziranjem i vremenom preživljenja životinja podupire njegovu prognostičku vrijednost kod karcinoma mliječne žlijezde u kuja.

6.3. IMUNOHISTOKEMIJSKA OBILJEŽJA KARCINOMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA

Pri usporedbi rezultata imunohistokemijske procjene ER-a, PR-a i HER2 s prethodnim istraživanjima potrebno je uzeti u obzir razlike u primijenjenim protutijelima, protokolima imunohistokemijskog bojenja, sustavima procjene i pragovima pozitivnosti, koji mogu znatno utjecati na dobivene rezultate (PEŇA i sur., 2014.). Imunohistokemijskom procjenom navedenih biljega u istraživanoj skupini zabilježena je približno podjednaka zastupljenost pozitivne i negativne ekspresije ER i PR, dok su HER2-pozitivni karcinomi kategorije 3+ bili rijetki. S obzirom na navedeno, razlike u zastupljenosti pojedinih fenotipova među istraživanjima ne mogu se nužno pripisati samo biološkim razlikama između analiziranih skupina.

Navedene metodološke razlike osobito su važne pri procjeni receptora HER2. Prema preporukama za standardizaciju imunohistokemijske procjene HER2 kod karcinoma mliječne žlijezde kuja, pozitivnima se smatraju karcinomi s potpunim i intenzivnim membranskim bojenjem kategorije 3+ (PEŇA i sur., 2014.). Prekomjerna ekspresija HER2 u ranijem je istraživanju utvrđena u 17,6 % invazivnih karcinoma, no primjenom kromogene hibridizacije in situ ni u jednom analiziranom slučaju nije dokazana amplifikacija gena HER2 (MARTÍN DE LAS MULAS i sur., 2003.). Nasuprot tome, u skupini od 350 kuja s invazivnim karcinomom mliječne žlijezde nije utvrđen nijedan HER2-pozitivan karcinom kategorije 3+ (ABADIE i sur., 2018.). Navedene razlike potvrđuju potrebu za oprezom pri izravnoj usporedbi zastupljenosti HER2-pozitivnih karcinoma te naglašavaju važnost primjene standardiziranih kriterija procjene.

Ranija istraživanja u kojima su karcinomi mliječne žlijezde kuja razvrstavani u više fenotipskih skupina također su pokazala razlike u njihovoj zastupljenosti. Međutim, zbog primjene dodatnih biljega i različitih kriterija klasifikacije, tako definirane skupine nisu izravno usporedive s trostruko negativnim karcinomima izdvojenima u ovom istraživanju (GAMA i sur., 2008.; SASSI i sur., 2010.). Ove je metodološke razlike također važno uzeti u obzir pri usporedbi rezultata, jer fenotipske skupine određene različitim panelima biljega nisu nužno istovjetne skupine karcinoma.

Zastupljenost trostruko negativnog fenotipa znatno se razlikuje među objavljenim istraživanjima. U velikoj istraživanoj skupini invazivnih karcinoma kuja, trostruko negativni fenotip utvrđen je u 76,3 % slučajeva (ABADIE i sur., 2018.), dok je u novijem istraživanju njegova zastupljenost iznosila 14,1 % (RAZAVIRAD i sur., 2024.). Udio od 37,14 % zabilježen u ovom istraživanju, u kojemu je kombiniranom procjenom navedenih biljega izdvojeno 13 trostruko negativnih karcinoma, nalazi se između navedenih vrijednosti. Tako širok raspon može biti povezan s razlikama u sastavu istraživanih skupina te primijenjenim kriterijima imunohistokemijske procjene i klasifikacije (FERREIRA i sur., 2026.).

Povezanost fenotipske klasifikacije s histološkim stupnjem opisana je u prethodnim istraživanjima, premda rezultati nisu potpuno ujednačeni (GAMA i sur., 2008.; SASSI i sur., 2010.). Trostruko negativni karcinomi u ovom su istraživanju bili zastupljeni u sva tri histološka stupnja malignosti. Najveći udio pripadao je stupnju II, dok je među ostalim karcinomima najveći udio pripadao stupnju malignosti I. Trostruko negativni fenotip u istraživanoj skupini nije bio ograničen na karcinome visokog histološkog stupnja malignosti.

Povezanost trostruko negativnog fenotipa s nepovoljnijim kliničkim ishodom prikazana je u velikoj skupini invazivnih karcinoma, u kojoj su životinje s trostruko negativnim karcinomima u usporedbi s karcinomima luminalnog A-fenotipa imale kraće razdoblje bez bolesti te kraće ukupno i specifično preživljenje (ABADIE i sur., 2018.). Najizraženije razlike između trostruko negativnih i ostalih karcinoma u našem istraživanju odnosile su se na njihovo biološko ponašanje. U skupini trostruko negativnih karcinoma češće su zabilježene metastaze, a vrijeme preživljenja bilo je kraće. Trostruko negativni fenotip bio je statistički značajno povezan s razdobljem bez bolesti te statistički vrlo značajno povezan s pojavom metastaza i vremenom preživljenja, dok s pojavom proliferacije nije utvrđena statistički značajna povezanost. Ovakav obrazac upućuje na povezanost trostruko negativnog fenotipa s nepovoljnijim biološkim ponašanjem karcinoma u istraživanoj skupini. Sukladan nalaz zabilježen je i u novijem istraživanju, u kojemu je kod trostruko negativnih karcinoma zabilježeno kraće preživljenje bez bolesti u usporedbi s ostalim analiziranim fenotipovima (RAZAVIRAD i sur., 2024.).

Prognostičko značenje fenotipske klasifikacije nije potvrđeno u svim istraživanjima. U pojedinim su istraživanjima stadij i histološki stupanj malignosti pokazali neovisnu povezanost s preživljenjem, dok molekularni podtip nije bio povezan s ishodom (SASSI i sur., 2010.). Razlike u veličini i sastavu istraživanih skupina te primijenjenim panelima biljega i kriterijima klasifikacije mogu pridonijeti neujednačenosti objavljenih rezultata. Budući da u ovom istraživanju nije provedena multivarijantna analiza kojom bi se ispitala neovisna prognostička vrijednost trostruko negativnog fenotipa u odnosu na histološki stupanj malignosti i druge prognostičke čimbenike, dobivene rezultate treba tumačiti kao pokazatelj njegove povezanosti s nepovoljnijim biološkim ponašanjem, a ne kao dokaz neovisne prognostičke vrijednosti (SASSI i sur., 2010.; ABADIE i sur., 2018.).

6.4. EKSPRESIJA PROTEINA RASAL2 I GENA *RASAL2* U KARCINOMIMA MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA

Među analiziranim pokazateljima biološkog ponašanja, imunohistokemijska ekspresija proteina RASAL2 bila je statistički značajno povezana s razdobljem bez bolesti. Taj nalaz treba tumačiti u kontekstu složene biološke uloge RASAL2 opisane kod karcinoma dojke u žena. RASAL2 opisan je kao tumorsupresorski RasGAP, a njegova je smanjena ekspresija u primarnim karcinomima dojke povezana s metastatskom bolešću, češćim recidivom i kraćim ukupnim preživljenjem. Eksperimentalno smanjenje ekspresije gena *RASAL2* također je poticalo migraciju, invaziju i progresiju tumora, podupirući njegovo tumorsupresorsko djelovanje u tim tumorima (McLAUGHLIN i sur., 2013.). Najveći udio slučajeva bez ponovne proliferacije tumora u ovom je istraživanju zabilježen u objedinjenoj kategoriji umjereno i jako pozitivne ekspresije, što bi moglo biti u skladu s navedenim tumorsupresorskim djelovanjem. Međutim, budući da sada statistički značajna povezanost nije pokazana s ponovnom pojavom proliferacije, metastazama ni vremenom preživljenja, umjereno i jako pozitivnu imunohistokemijsku ekspresiju proteina RASAL2 nije moguće tumačiti kao jednoznačan pokazatelj povoljnije prognoze.

Takvo tumačenje dodatno podupiru rezultati istraživanja u kojemu je smanjena ekspresija RASAL2 zabilježena samostalno ili zajedno sa smanjenom ekspresijom proteina DAB2IP (engl. *DAB2 interacting protein*), drugoga člana skupine RasGAP. Istodobno su niske razine RASAL2 i DAB2IP bile povezane s višim stadijem bolesti i kraćim razdobljem bez recidiva, dok je njihov zajednički gubitak u eksperimentalnim modelima poticao invaziju, EMT i metastaziranje (OLSEN i sur., 2017.). Pritom se najsnažnija povezanost s nepovoljnijim kliničkim obilježjima odnosila na istodobno smanjenu ekspresiju obaju članova skupine RasGAP, zbog čega se navedeni rezultati ne mogu pripisati isključivo proteinu RASAL2 (OLSEN i sur., 2017.).

Nasuprot navedenom tumorsupresorskom djelovanju, u trostruko negativnim i ER-negativnim karcinomima dojke opisana je uloga proteina RASAL2 u poticanju tumorskog napredovanja. Povećana je ekspresija opisana u dijelu ovih karcinoma i povezana s nepovoljnijim kliničkim ishodom, dok su eksperimentalna istraživanja pokazala da protein RASAL2 može poticati invaziju i metastaziranje aktivacijom RAC1 (FENG i sur., 2014.). Razlike ovisne o fenotipu dodatno podupiru nalaz manje ekspresije proteina RASAL2 u ER-pozitivnim i veće ekspresije u ER-negativnim karcinomima dojke u odnosu na susjedno

normalno tkivo (WANG i sur., 2019.). U istom je istraživanju pokazano da fosforilirani oblik proteina RASAL2 potiče progresiju ER-pozitivnih i ER-negativnih karcinoma, što upućuje na važnost posttranslacijske regulacije za njegovo djelovanje (WANG i sur., 2019.).

U našem istraživanju imunohistokemijska ekspresija proteina RASAL2 nije bila statistički značajno povezana s trostruko negativnim fenotipom. Taj se nalaz razlikuje od rezultata istraživanja karcinoma dojke u žena, u kojima je povećana ekspresija ovog proteina opisana u dijelu trostruko negativnih i ER-negativnih karcinoma dojke (FENG i sur., 2014.). Povećana ekspresija proteina RASAL2 u ER-negativnim karcinomima opisana je i u drugom istraživanju, u kojemu je istodobno pokazano funkcionalno značenje fosforilacije RASAL2 za njegovo djelovanje (WANG i sur., 2019.). Razlike mogu biti povezane s biološkim razlikama između karcinoma mliječne žlijezde kuja i karcinoma dojke u žena, ali i s razlikama u sastavu istraživanih skupina i metodama procjene ekspresije. Budući da u ovom istraživanju nije analiziran fosforilirani oblik proteina RASAL2 niti je ispitana aktivnost signalnih puteva povezanih s njegovim djelovanjem, funkcionalno značenje imunohistokemijske ekspresije nije moguće izravno procijeniti.

Rezultati RT-qPCR analize pružaju dodatne podatke o ekspresiji gena *RASAL2* na razini mRNA. Relativna ekspresija mRNA gena *RASAL2* bila je statistički značajno smanjena u uzorcima karcinoma u odnosu na kontrolne uzorke mliječne žlijezde istih životinja bez makroskopskih i mikroskopskih patoloških promjena, i to u trostruko negativnim i ostalim karcinomima te u karcinomima svih triju histoloških stupnjeva malignosti. Taj se nalaz dijelom slaže s rezultatima istraživanja karcinoma dojke u žena u kojima je smanjena ekspresija gena *RASAL2* opisana u dijelu primarnih karcinoma dojke i povezana s njegovim tumorsupresorskim djelovanjem (McLAUGHLIN i sur., 2013.).

Smanjena ekspresija mRNA gena *RASAL2* u trostruko negativnim karcinomima u ovom istraživanju razlikuje se, međutim, od nalaza u trostruko negativnim karcinomima dojke u žena, u kojima je opisana povećana ekspresija gena *RASAL2* te njegovo proinvazivno i prometastatsko djelovanje (FENG i sur., 2014.). Ova razlika upućuje na to da se spoznaje o ulozi gena *RASAL2* u ljudi ne mogu neposredno prenijeti na trostruko negativne karcinome mliječne žlijezde kuja.

Pri zajedničkom razmatranju imunohistokemijskih i RT-qPCR rezultata važno je uzeti u obzir da se tim metodama procjenjuju različite razine ekspresije. Imunohistokemijskom

analizom procijenjena je ekspresija proteina RASAL2 u tumorskom tkivu, dok je RT-qPCR analizom određena relativna ekspresija mRNA gena *RASAL2* u uzorcima karcinoma u odnosu na kontrolne uzorke. Stoga se imunohistokemijski utvrđena ekspresija proteina RASAL2 i smanjena relativna ekspresija mRNA gena *RASAL2* ne mogu izravno tumačiti kao proturječni nalazi. U staničnim modelima karcinoma dojke pokazana je povezanost razine mRNA gena *RASAL2* s razinom proteina RASAL2 (OLSEN i sur., 2017.), dok njihov odnos kod karcinoma mliječne žlijezde u kuja zahtijeva daljnja istraživanja.

6.5. EKSPRESIJA PROTEINA NECTIN-4 I GENA *NECTIN4* U KARCINOMIMA MLJEČNE ŽLIJEZDE KUJA

Imunohistokemijska ekspresija proteina NECTIN-4 u ovom istraživanju bila je statistički visoko značajno povezana s razdobljem bez bolesti i statistički značajno povezana s vremenom preživljenja. Raspodjela rezultata upućivala je na nepovoljniji obrazac ishoda kod karcinoma s negativnom ekspresijom. Statistički značajna povezanost ekspresije s pojavom proliferacije i metastazama nije pokazana.

Smjer povezanosti zabilježen u ovom istraživanju bliži je nalazima imunohistokemijskog istraživanja trostruko negativnih karcinoma dojke u žena, u kojemu je visoka ekspresija proteina NECTIN-4 bila povezana s nižim tumorskim stadijem, negativnim statusom limfnih čvorova i duljim ukupnim preživljenjem, pri čemu je povezanost s duljim ukupnim preživljenjem zadržana i nakon uključivanja drugih prognostičkih čimbenika (ZEINDLER i sur., 2019.). Za usporedbu prethodno navedenog istraživanja s našim, posebno je zanimljivo da je upotrijebljeno isto protutijelo, Abcam ab192033, te da se procjena ekspresije također temeljila na jačini bojenja i zastupljenosti pozitivnih tumorskih stanica, premda su primijenjeni drugačiji sustav bodovanja i granične vrijednosti.

Prognostičko značenje proteina NECTIN-4 u karcinomu dojke ipak nije jednoznačno. Suprotno prethodno navedenim rezultatima u trostruko negativnim karcinomima dojke, povećana ekspresija NECTIN-4 u drugom je istraživanju bila povezana s višim histološkim stupnjem, većim tumorima i kraćim petogodišnjim preživljenjem, ali nije potvrđena kao neovisan prognostički pokazatelj (ATHANASSIADOU i sur., 2011.). Razlike između tih nalaza i rezultata istraživanja trostruko negativnih karcinoma dojke mogle bi proizlaziti iz različitog sastava istraživanih skupina, bioloških obilježja pojedinih fenotipova te primijenjenih metoda i kriterija procjene ekspresije.

Nalaz ekspresije proteina NECTIN-4 u analiziranim karcinomima mliječne žlijezde kuja nadovezuje se na ranije podatke o njegovoj prisutnosti u neoplastičnom tkivu mliječne žlijezde u kuja. Ekspresija ovog proteina opisana je u staničnim linijama karcinoma mliječne žlijezde te u dijelu spontano nastalih tumora, uključujući i maligne oblike, dok u normalnoj mliječnoj žlijezdi nije bila detektirana u epitelnim ni u mioepitelnim stanicama (SHOJI i sur., 2016.). Zbog malog broja kliničkih uzoraka u tom istraživanju nije bilo moguće pouzdano procijeniti povezanost ekspresije proteina NECTIN-4 s malignošću ili kliničkim ishodom.

U ovom istraživanju imunohistokemijska ekspresija proteina NECTIN-4 nije bila statistički značajno povezana s histopatološkim tipom, histološkim stupnjem malignosti ni trostruko negativnim fenotipom. Izostanak povezanosti s trostruko negativnim fenotipom razlikuje se od rezultata istraživanja karcinoma dojke u žena. Proteinska ekspresija NECTIN-4 u karcinomu dojke u žena bila je povezana s negativnom ekspresijom ER-a i PR-a (FABRE-LAFAY i sur., 2007.), dok je membranska ekspresija proteina zabilježena u približno dvije trećine zasebno analiziranih trostruko negativnih karcinoma (M-RABET i sur., 2017.). Česta ekspresija proteina NECTIN-4 u karcinomima dojke opisana je i u istraživanju u kojemu je umjerena ili jaka ekspresija zabilježena u više od polovice analiziranih uzoraka (CHALLITA-EID i sur., 2016.). Razlike u odnosu na rezultate ovog istraživanja mogu biti povezane s biološkim razlikama između karcinoma mliječne žlijezde u kuja i karcinoma dojke u žena, ali i s razlikama u sastavu istraživanih skupina, upotrijebljenim protutijelima, sustavima bodovanja i analiziranom materijalu. Važnost metodoloških razlika dodatno pokazuju neujednačeni nalazi u normalnom tkivu, u kojemu je u jednom istraživanju izostala mjerljiva proteinska ekspresija, dok je u drugom slaba do umjerena reakcija opisana u normalnom tkivu dojke (FABRE-LAFAY i sur., 2007.; CHALLITA-EID i sur., 2016.).

Rezultati RT-qPCR analize pružaju dodatne podatke o ekspresiji gena *NECTIN4* na razini mRNA. Relativna ekspresija mRNA gena *NECTIN4* bila je povećana u karcinomima mliječne žlijezde kuja u odnosu na kontrolne uzorke mliječne žlijezde istih životinja bez makroskopskih i mikroskopskih patoloških promjena. Povećanje ekspresije bilo je statistički značajno i u trostruko negativnim i u ostalim karcinomima. Povećana relativna ekspresija zabilježena je i u karcinomima svih triju histoloških stupnjeva malignosti, pri čemu je najviša aritmetička sredina relativne ekspresije zabilježena u karcinomima stupnja malignosti III.

Povećana relativna ekspresija mRNA gena *NECTIN4* u trostruko negativnim uzorcima u ovom istraživanju dijelom se slaže s rezultatima istraživanja karcinoma dojke u žena, u kojemu je visoka ekspresija mRNA gena *NECTIN4* češće opisana u trostruko negativnim karcinomima dojke, a unutar te skupine bila je povezana s kraćim preživljenjem bez metastaza te je zadržala neovisnu negativnu prognostičku vrijednost (M-RABET i sur., 2017.). Nasuprot tomu, u ovom istraživanju trostruko negativni fenotip nije bio povezan s određenom kategorijom imunohistokemijske ekspresije proteina NECTIN-4, a pozitivne kategorije proteinske ekspresije nisu bile povezane s nepovoljnijim vremenom preživljenja. Prema tomu, povećanu relativnu ekspresiju mRNA gena *NECTIN4* nije opravdano samu po sebi tumačiti kao pokazatelj agresivnijega biološkog ponašanja karcinoma mliječne žlijezde kuja.

Prethodno navedeno za RASAL2 primjenjivo je i na NECTIN-4, s obzirom na to da se imunohistokemijskom i RT-qPCR analizom procjenjuju različite razine ekspresije. Stoga eventualno nepodudaranje ekspresije proteina NECTIN-4 i relativne ekspresije mRNA gena *NECTIN4* ne treba tumačiti kao izravno proturječan nalaz. U tom kontekstu povećana relativna ekspresija mRNA gena *NECTIN4* u trostruko negativnim karcinomima ne mora nužno biti praćena većom imunohistokemijskom ekspresijom NECTIN-4 niti imati jednako prognostičko značenje. Povezanost ekspresije mRNA i proteina NECTIN-4 pokazana je u staničnim linijama karcinoma dojke te u trostruko negativnim karcinomima analiziranim objema metodama (FABRE-LAFAY i sur., 2007.; M-RABET i sur., 2017.). Ipak, niska razina transkripta opisana je i u normalnom epitelu dojke bez istodobne prisutnosti proteina, što pokazuje da ekspresija na transkripcijskoj i proteinskoj razini ne mora biti potpuno sukladna (FABRE-LAFAY i sur., 2007.). Razlika između transkripcijske i proteinske razine ekspresije razmatrana je i kao moguće objašnjenje različitih prognostičkih nalaza, premda mehanizmi koji bi mogli objasniti takvo nepodudaranje zahtijevaju dodatna istraživanja (ZEINDLER i sur., 2019.).

Ekspresija proteina NECTIN-4 ima i potencijalno terapijsko značenje. U pretkliničkim modelima karcinoma dojke ciljanje NECTIN-4 konjugatima protutijela i citotoksičnog lijeka dovelo je do inhibicije rasta i regresije tumora, uključujući modele primarnog i metastatskog trostruko negativnog karcinoma dojke (CHALLITA-EID i sur., 2016.; M-RABET i sur., 2017.). U pasa je ekspresija ovog proteina omogućila selektivnu infekciju stanica karcinoma mliječne žlijezde rekombinantnim virusom ospica, koji je pokazao citotoksično djelovanje na stanice pozitivne na NECTIN-4 i protutumorsko djelovanje u eksperimentalnom modelu (SHOJI i sur., 2016.), što dodatno podupire potencijal proteina NECTIN-4 kao ciljne molekule u razvoju terapijskih pristupa za karcinome mliječne žlijezde u kuja.

Pri tumačenju dobivenih rezultata potrebno je uzeti u obzir broj analiziranih karcinoma, nejednaku zastupljenost pojedinih histopatoloških tipova te nedostupnost podataka kliničkog praćenja za dio životinja. Navedena ograničenja mogla su smanjiti mogućnost prepoznavanja pojedinih povezanosti, osobito u manjim podskupinama, pa dobivene rezultate treba potvrditi u istraživanjima na većem broju uzoraka.

6.6. KARCINOMI MLIJEČNE ŽLIJEZDE KUJA – MODEL ZA TRANSLACIJSKA ISTRAŽIVANJA

Karcinomi mliječne žlijezde kuja razvijaju se spontano i pokazuju brojne histološke, molekularne i kliničke sličnosti s karcinomom dojke u žena, zbog čega imaju važnu ulogu u komparativnim i translacijskim istraživanjima (KWON i sur., 2023.; NOSALOVA i sur., 2024.). Posebno je važna mogućnost usporedbe molekularnih fenotipova, uključujući trostruko negativne karcinome, za koje su u objema vrstama opisana nepovoljnija biološka obilježja i klinički ishodi (ABADIE i sur., 2018.; KWON i sur., 2023.). U ovom istraživanju trostruko negativni karcinomi bili su povezani s kraćim razdobljem bez bolesti, češćom pojavom metastaza i kraćim vremenom preživljenja u odnosu na ostale karcinome. Podudarnost ovih obilježja s nalazima opisanima u karcinomu dojke u žena dodatno podupire opravdanost primjene spontanih karcinoma mliječne žlijezde kuja u komparativnim istraživanjima (ABADIE i sur., 2018.; KWON i sur., 2023.).

Istodobno, rezultati ekspresije RASAL2 i NECTIN-4 pokazali su da pojedini molekularni odnosi u karcinomima mliječne žlijezde kuja nisu potpuno podudarni s onima opisanima kod karcinoma dojke u žena. Takve razlike ne umanjuju vrijednost spontanih karcinoma u kuja kao modela, već upućuju na potrebu uvažavanja osobitosti pojedine vrste pri njihovu tumačenju. U skladu s time, karcinomi mliječne žlijezde u kuja mogu biti vrijedan komplementarni model za istraživanje biologije tumora i novih biomarkera, uključujući RASAL2 i NECTIN-4, pri čemu njihovo prognostičko i potencijalno terapijsko značenje treba procjenjivati uz uvažavanje međuvrskih razlika (KWON i sur., 2023.).

7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Trostruko negativni karcinomi čine važnu podskupinu karcinoma mliječne žlijezde kuja, koju obilježava nepovoljnije biološko ponašanje u odnosu na ostale karcinome.
2. Proteinska ekspresija RASAL2 i NECTIN-4 povezana je s biološkim ponašanjem karcinoma mliječne žlijezde kuja: izraženija ekspresija RASAL2 obilježava dulje razdoblje bez bolesti, dok izostanak ekspresije NECTIN-4 obilježava nepovoljniji tijek bolesti.
3. Smanjena transkripcijska ekspresija gena *RASAL2* i povećana transkripcijska ekspresija gena *NECTIN4* zajednička su obilježja karcinoma mliječne žlijezde kuja, neovisno o trostruko negativnom fenotipu i histološkom stupnju malignosti.
4. Proteinska ekspresija RASAL2 i NECTIN-4 nije povezana s histopatološkim tipom, histološkim stupnjem malignosti ni trostruko negativnim fenotipom karcinoma mliječne žlijezde kuja.
5. Nepodudarnost transkripcijske i proteinske ekspresije RASAL2 i NECTIN-4 upućuje na složenu regulaciju njihove ekspresije u karcinomima mliječne žlijezde kuja.

8. POPIS LITERATURE

ABADIE, J., F. NGUYEN, D. LOUSSOUARN, L. PEÑA, A. GAMA, N. RIEDER, A. BELOUSOV, I. BEMELMANS, L. JAILLARDON, C. IBISCH, M. CAMPONE (2018): Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: Immunophenotypes and prognostic significance. *Breast Cancer Res. Treat.* 167, 459-468.
DOI: 10.1007/s10549-017-4520-3

ABDELMEGEED, S. M., S. MOHAMMED (2018): Canine mammary tumors as a model for human disease. *Oncol. Lett.* 15, 8195-8205.
DOI: 10.3892/ol.2018.8411

AHMADIAN, M. R., P. STEGE, K. SCHEFFZEK, A. WITTINGHOFFER (1997): Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat. Struct. Biol.* 4, 686-689.
DOI: 10.1038/nsb0997-686

AMIRKHANI NAMAGERDI, A., D. D'ANGELO, F. CIANI, C. A. IANNUZZI, F. NAPOLITANO, L. AVALLONE, M. DE LAURENTIIS, A. GIORDANO (2020): Triple-Negative Breast Cancer Comparison With Canine Mammary Tumors From Light Microscopy to Molecular Pathology. *Front. Oncol.* 10, 563779.
DOI: 10.3389/fonc.2020.563779

ATHANASSIADOU, A. M., E. PATSOURIS, A. TSIPIS, M. GONIDI, P. ATHANASSIADOU (2011): The significance of Survivin and Nectin-4 expression in the prognosis of breast carcinoma. *Folia Histochem. Cytobiol.* 49, 26-33.
DOI: 10.5603/FHC.2011.0005

BENAVENTE, M. A., C. P. BIANCHI, M. A. ABA (2016): Canine Mammary Tumors: Risk Factors, Prognosis and Treatments. *J. Vet. Adv.* 6, 1291-1300.
DOI: 10.5455/jva.20160916045115

BENJAMIN, S. A., A. C. LEE, W. J. SAUNDERS (1999): Classification and Behavior of Canine Mammary Epithelial Neoplasms Based on Life-span Observations in Beagles. *Vet. Pathol.* 36, 423-436.

DOI: 10.1354/vp.36-5-423

BERNARDS, A. (2003): GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta* 1603, 47-82.

DOI: 10.1016/S0304-419X(02)00082-3

BLOWS, F. M., K. E. DRIVER, M. K. SCHMIDT, A. BROEKS, F. E. VAN LEEUWEN, J. WESSELING, M. C. CHEANG, K. GELMON, T. O. NIELSEN, C. BLOMQVIST, P. HEIKKILÄ, T. HEIKKINEN, H. NEVANLINNA, L. A. AKSLEN, L. R. BÉGIN, W. D. FOULKES, F. J. COUCH, X. WANG, V. CAFOUREK, J. E. OLSON, L. BAGLIETTO, G. G. GILES, G. SEVERI, C. A. McLEAN, M. C. SOUTHEY, E. RAKHA, A. R. GREEN, I. O. ELLIS, M. E. SHERMAN, J. LISSOWSKA, W. F. ANDERSON, A. COX, S. S. CROSS, M. W. R. REED, E. PROVENZANO, S.-J. DAWSON, A. M. DUNNING, M. HUMPHREYS, D. F. EASTON, M. GARCÍA-CLOSAS, C. CALDAS, P. D. PHAROAH, D. HUNTSMAN (2010): Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short- and long-term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* 7, e1000279.

DOI: 10.1371/journal.pmed.1000279

BOS, J. L., H. REHMAN, A. M. WITTINGHOFER (2007): GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.

DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.018

CANADAS, A., M. FRANÇA, C. PEREIRA, R. VILAÇA, H. VILHENA, F. TINOCO, M. J. SILVA, J. RIBEIRO, R. MEDEIROS, P. OLIVEIRA, P. DIAS-PEREIRA, M. SANTOS (2019): Canine mammary tumors: Comparison of classification and grading methods in a survival study. *Vet. Pathol.* 56, 208-219.

DOI: 10.1177/0300985818806968

CARVALHO, M. I., M. J. GUIMARÃES, I. PIRES, J. PRADA, R. SILVA-CARVALHO, C. LOPES, F. L. QUEIROGA (2013): EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Res. Vet. Sci.* 95, 1094-1099.

DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.09.003

CHALLITA-EID, P. M., D. SATPAYEV, P. YANG, Z. AN, K. MORRISON, Y. SHOSTAK, A. RAITANO, R. NADELL, W. LIU, D. R. LORTIE, L. CAPO, A. VERLINSKY, M. LEAVITT, F. MALIK, H. AVIÑA, C. I. GUEVARA, N. DINH, S. KARKI, B. S. ANAND, D. S. PEREIRA, I. B. J. JOSEPH, F. DOÑATE, K. MORRISON, D. R. STOVER (2016): Enfortumab Vedotin Antibody-Drug Conjugate Targeting Nectin-4 Is a Highly Potent Therapeutic Agent in Multiple Preclinical Cancer Models. *Cancer Res.* 76, 3003-3013.

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1313

CHERFILS, J., M. ZEGHOUF (2013): Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* 93, 269-309.

DOI: 10.1152/physrev.00003.2012

DAKO (2024): HercepTest™ for Automated Link Platforms. 29th ed., revision 2024.07. Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd., Singapore.

DELLA SALDA, L., M. MASSIMINI, M. ROMANUCCI, C. PALMIERI, A. PERILLO, V. GRIECO, D. MALATESTA, M. A. SPINILLO, G. PASSANTINO, F. DONDI, C. BENAZZI (2019): Nectin-4 and p63 immunohistochemical expression in canine prostate tumourigenesis. *Vet. Comp. Oncol.* 17, 298-307.

DOI: 10.1111/vco.12469

DOLKA, I., M. KRÓL, R. SAPIERZYŃSKI (2016): Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study. *Res. Vet. Sci.* 105, 124-133.

DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.02.004

DOLU, H., A. AYDOGAN (2018): Expression of Nectin-4 in Canine Mammary Carcinomas. *Isr. J. Vet. Med.* 73, 3-7.

DONGRE, A., R. A. WEINBERG (2019): New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 69-84.
DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4

DORN, C. R., D. O. TAYLOR, R. SCHNEIDER, H. H. HIBBARD, M. R. KLAUBER (1968): Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J. Natl. Cancer Inst.* 40, 307-318.
DOI: 10.1093/jnci/40.2.307

DUTRA, A. P., N. V. M. GRANJA, F. C. SCHMITT, G. D. CASSALI (2004): c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 1673-1681.
DOI: 10.1590/S0100-879X2004001100013

FABRE-LAFAY, S., F. MONVILLE, S. GARRIDO-URBANI, C. BERRUYER-POUYET, C. GINESTIER, N. REYMOND, P. FINETTI, R. SAUVAN, J. ADÉLAÏDE, J. GENEIX, E. LECOCQ, C. POPOVICI, P. DUBREUIL, P. VIENS, A. GONÇALVES, E. CHARAFE-JAUFFRET, J. JACQUEMIER, D. BIRNBAUM, M. LOPEZ (2007): Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer. *BMC Cancer* 7, 73.
DOI: 10.1186/1471-2407-7-73

FENG, M., Y. BAO, Z. LI, J. LI, M. GONG, S. LAM, J. WANG, D. M. MARZESE, N. DONOVAN, E. Y. TAN, D. S. B. HOON, Q. YU (2014): RASAL2 activates RAC1 to promote triple-negative breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* 124, 5291-5304.
DOI: 10.1172/JCI76711

FERREIRA, E., H. GOBBI, B. S. SARAIVA, G. D. CASSALI (2012): Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hyperplasia as a preneoplastic marker in dogs. *Vet. Pathol.* 49, 322-329.
DOI: 10.1177/0300985810396105

FERREIRA, T., F. DIAS, A. GAMA, J. F. MANO, P. A. OLIVEIRA, R. MEDEIROS (2026): Hallmarks of cancer in canine mammary tumors: Insights into a potential model for human triple-negative breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 220, 105184.

DOI: 10.1016/j.critrevonc.2026.105184

GAMA, A., A. ALVES, F. SCHMITT (2008): Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: Application of the human classification. *Virchows Arch.* 453, 123-132.

DOI: 10.1007/s00428-008-0644-3

GEDON, J., A. WEHREND, M. KESSLER (2022): Ovariectomy reduces the risk of tumour development and influences the histologic continuum in canine mammary tumours. *Vet. Comp. Oncol.* 20, 476-483.

DOI: 10.1111/vco.12793

GOLDSCHMIDT, M., L. PEÑA, R. RASOTTO, V. ZAPPULLI (2011): Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 48, 117-131.

DOI: 10.1177/0300985810393258

GOLDSCHMIDT, M. H., L. PEÑA, V. ZAPPULLI (2017): Tumors of the Mammary Gland. In: *Tumors in Domestic Animals*, 5th ed. (Meuten, D. J., Ed.), Wiley Blackwell, Ames, Iowa, pp.723-765.

DOI: 10.1002/9781119181200.ch17

GRAY, M., J. MEEHAN, C. MARTÍNEZ-PÉREZ, C. KAY, A. K. TURNBULL, L. R. MORRISON, L. Y. PANG, D. ARGYLE (2020): Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. *Front. Oncol.* 10, 617.

DOI: 10.3389/fonc.2020.00617

GUDAN KURILJ, A. (2009): Poredbena patologija tumora mliječne žlijezde kuja i mačaka u Republici Hrvatskoj. PhD Thesis, University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb, Croatia.

GUDAN KURILJ, A., M. HOHŠTETER, B. ARTUKOVIĆ, K. SEVERIN, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, A. BECK, S. SEIWERTH, R. SABOČANEC, Ž. GRABAREVIĆ (2011): Histopathological evaluation and immunohistochemical study of estrogen receptor α , HER-2 and Ki-67 in canine neoplastic mammary lesions. *Vet. arhiv* 81, 709-722.

GUIMARÃES, M. J., M. I. CARVALHO, I. PIRES, J. PRADA, A. GONZALEZ GIL, C. LOPES, F. L. QUEIROGA (2014): Concurrent expression of cyclo-oxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in canine malignant mammary tumours. *J. Comp. Pathol.* 150, 27-34.
DOI: 10.1016/j.jcpa.2013.07.005

KASZAK, I., A. RUSZCZAK, S. KANAFKA, K. KACPRZAK, M. KRÓL, P. JURKA (2018): Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Vet. Scand.* 60, 66.
DOI: 10.1186/s13028-018-0417-1

KUMARAGURUPARAN, R., D. PRATHIBA, S. NAGINI (2006): Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res. Vet. Sci.* 81, 218-224.
DOI: 10.1016/j.rvsc.2005.11.002

KWON, J. Y., N. MOSKWA, W. KANG, T. M. FAN, C. LEE (2023): Canine as a comparative and translational model for human mammary tumor. *J. Breast Cancer* 26, 1-13.
DOI: 10.4048/jbc.2023.26.e4

LATTANZIO, R., R. GHASEMI, F. BRANCATI, R. L. SORDA, N. TINARI, L. PERRACCHIO, S. IACOBELLI, M. MOTTOLESE, P. G. NATALI, M. PIANTELLI (2014): Membranous Nectin-4 expression is a risk factor for distant relapse of T1-T2, N0 luminal-A early breast cancer. *Oncogenesis* 3, e118.
DOI: 10.1038/oncsis.2014.32

LI, N., S. LI (2014): RASAL2 promotes lung cancer metastasis through epithelial-mesenchymal transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 455, 358-362.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.020

LIU, Z., M. LI, Z. JIANG, X. WANG (2018): A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-Negative Breast Cancer. *Transl. Oncol.* 11, 311-329.

DOI: 10.1016/j.tranon.2018.01.011

MAINENTI, M., R. RASOTTO, P. CARNIER, V. ZAPPULLI (2014): Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *Vet. J.* 202, 62-68.

DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.06.003

MANJUNATHA REDDY, G. B., P. KUMAR, R. KUMAR, R. V. S. PAWAIYA, R. RAVINDRAN (2009): Histopathological classification and incidence of canine mammary tumours. *Indian J. Vet. Pathol.* 33, 152-155.

MARTÍN DE LAS MULAS, J., J. ORDÁS, Y. MILLÁN, V. FERNÁNDEZ-SORIA, S. RAMÓN Y CAJAL (2003): Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res. Treat.* 80, 363-367.

DOI: 10.1023/A:1024929730165

MARTÍN DE LAS MULAS, J., Y. MILLÁN, R. DIOS (2005): A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet. Pathol.* 42, 200-212.

DOI: 10.1354/vp.42-2-200

McLAUGHLIN, S. K., S. N. OLSEN, B. DAKE, T. DE RAEDT, E. LIM, R. T. BRONSON, R. BEROUKHIM, K. POLYAK, M. BROWN, C. KUPERWASSER, K. CICHOWSKI (2013): The RasGAP gene, RASAL2, is a tumor and metastasis suppressor. *Cancer Cell* 24, 365-378.

DOI: 10.1016/j.ccr.2013.08.004

MEI, C., Y. LIU, Z. LIU, Y. ZHI, Z. JIANG, X. LYU, H. WANG (2025): Dysregulated signaling pathways in canine mammary tumor and human triple negative breast cancer: Advances and potential therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.* 26, 145.

DOI: 10.3390/ijms26010145

MICHEL, E., S. K. FELDMANN, M. P. KOWALEWSKI, C. ROHRER BLEY, A. BOOS, F. GUSCETTI, I. M. REICHLER (2012): Expression of prolactin receptors in normal canine mammary tissue, canine mammary adenomas and mammary adenocarcinomas. BMC Vet. Res. 8, 72.

DOI: 10.1186/1746-6148-8-72

MILBURN, M. V., L. TONG, A. M. DEVOS, A. BRÜNGER, Z. YAMAIZUMI, S. NISHIMURA, S.-H. KIM (1990): Molecular switch for signal transduction: Structural differences between active and inactive forms of protooncogenic Ras proteins. Science 247, 939-945.

DOI: 10.1126/science.2406906

MISDORP, W., R. W. ELSE, E. HELLMÉN, T. P. LIPSCOMB (1999): Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat. 2nd Series, Vol. VII, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. ISBN 1-881041-66-2.

MISDORP, W. (2002): Tumors of the mammary gland. In: Tumors in Domestic Animals, 4th ed. (Meuten, D. J., Ed.), Iowa State Press, Ames, Iowa, pp. 575-606.

DOI: 10.1002/9780470376928.ch12

MOHR, A., F. LÜDER RIPOLI, S. C. HAMMER, S. WILLENBROCK, M. HEWICKER-TRAUTWEIN, Z. KIELBOWICZ, H. MURUA ESCOBAR, I. NOLTE (2016): Hormone receptor expression analyses in neoplastic and non-neoplastic canine mammary tissue by a bead based multiplex branched DNA assay: A gene expression study in fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded samples. PLoS One 11, e0163311.

DOI: 10.1371/journal.pone.0163311

MOL, J. A., I. S. LANTINGA-VAN LEEUWEN, E. VAN GARDEREN, P. J. SELMAN, M. A. OOSTERLAKEN-DIJKSTERHUIS, J. A. SCHALKEN, A. RIJNBEEK (1999): Mammary growth hormone and tumorigenesis—lessons from the dog. Vet. Q. 21, 111-115.

DOI: 10.1080/01652176.1999.9695004

MONTEIRO, L. N., M. A. RODRIGUES, D. A. GOMES, B. S. SALGADO, G. D. CASSALI (2018): Tumour-associated macrophages: Relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours. *Vet. J.* 234, 119-125.

DOI: 10.1016/j.tvjl.2018.02.016

M-RABET, M., O. CABAUD, E. JOSSELIN, P. FINETTI, R. CASTELLANO, A. FARINA, E. AGAVNIAN-COUQUIAUD, G. SAVIANE, Y. COLLETTE, P. VIENS, A. GONÇALVES, C. GINESTIER, E. CHARAFE-JAUFFRET, D. BIRNBAUM, D. OLIVE, F. BERTUCCI, M. LOPEZ (2017): Nectin-4: a new prognostic biomarker for efficient therapeutic targeting of primary and metastatic triple-negative breast cancer. *Ann. Oncol.* 28, 769-776.

DOI: 10.1093/annonc/mdw678

NGUYEN, F., L. PEÑA, C. IBISCH, D. LOUSSOUARN, A. GAMA, N. RIEDER, A. BELOUSOV, M. CAMPONE, J. ABADIE (2018): Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: Natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Res. Treat.* 167, 635-648.

DOI: 10.1007/s10549-017-4548-2

NIELSEN, T. O., F. D. HSU, K. JENSEN, M. CHEANG, G. KARACA, Z. HU, T. HERNANDEZ-BOUSSARD, C. LIVASY, D. COWAN, L. DRESSLER, L. A. AKSLEN, J. RAGAZ, A. M. GOWN, C. B. GILKS, M. VAN DE RIJN, C. M. PEROU (2004): Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 10, 5367-5374.

DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0220

NIETO, A., L. PEÑA, M. D. PÉREZ-ALENZA, M. A. SÁNCHEZ, J. M. FLORES, M. CASTAÑO (2000): Immunohistologic Detection of Estrogen Receptor Alpha in Canine Mammary Tumors: Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance. *Vet. Pathol.* 37, 239-247.

DOI: 10.1354/vp.37-3-239

NIETO, A., M. D. PÉREZ-ALENZA, N. DEL CASTILLO, E. TABANERA, M. CASTAÑO, L. PEÑA (2003): BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *J. Comp. Pathol.* 128, 260-268.

DOI: 10.1053/jcpa.2002.0631

NOSALOVA, N., M. HUNIADI, Ľ. HORŇÁKOVÁ, A. VALENČÁKOVÁ, S. HORŇÁK, K. NAGOOS, J. VOZAR, D. CIZKOVA (2024): Canine mammary tumors: Classification, biomarkers, traditional and personalized therapies. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 2891.

DOI: 10.3390/ijms25052891

NOYCE, R. S., D. G. BONDRE, M. N. HA, L.-T. LIN, G. SISSON, M.-S. TSAO, C. D. RICHARDSON (2011): Tumor Cell Marker PVRL4 (Nectin 4) Is an Epithelial Cell Receptor for Measles Virus. *PLoS Pathog.* 7, e1002240.

DOI: 10.1371/journal.ppat.1002240

NOYCE, R. S., S. DELPEUT, C. D. RICHARDSON (2013): Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. *Virology* 436, 210-220.

DOI: 10.1016/j.virol.2012.11.011

NUNES, F. C., K. A. DAMASCENO, C. B. DE CAMPOS, A. C. BERTAGNOLLI, G. E. LAVALLE, G. D. CASSALI (2019): Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. *Vet. Anim. Sci.* 7, 100039.

DOI: 10.1016/j.vas.2018.09.003

OLSEN, S. N., A. WRONSKI, Z. CASTAÑO, B. DAKE, C. MALONE, T. DE RAEDT, M. ENOS, Y. S. DEROSE, W. ZHOU, S. GUERRA, M. LODA, A. WELM, A. H. PARTRIDGE, S. S. McALLISTER, C. KUPERWASSER, K. CICHOWSKI (2017): Loss of RasGAP tumor suppressors underlies the aggressive nature of luminal B breast cancers. *Cancer Discov.* 7, 202-217.

DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0520

PAI, E. F., W. KABSCH, U. KRENGEL, K. C. HOLMES, J. JOHN, A. WITTINGHOFFER (1989): Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* 341, 209-214.

DOI: 10.1038/341209a0

PARKER, J. S., M. MULLINS, M. C. U. CHEANG, S. LEUNG, D. VODUC, T. VICKERY, S. DAVIES, C. FAURON, X. HE, Z. HU, J. F. QUACKENBUSH, I. J. STIJLEMAN, J. PALAZZO, J. S. MARRON, A. B. NOBEL, E. MARDIS, T. O. NIELSEN, M. J. ELLIS, C. M. PEROU, P. S. BERNARD (2009): Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* 27, 1160-1167.

DOI: 10.1200/JCO.2008.18.1370

PASTOR, N., N. C. CABALLÉ, M. SANTELLA, L. J. EZQUERRA, R. TARAZONA, E. DURAN (2018): Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. *Austral J. Vet. Sci.* 50, 143-147.

DOI: 10.4067/S0719-81322018000300143

PAVLOVA, N. N., C. PALLASCH, A. E. H. ELIA, C. J. BRAUN, T. F. WESTBROOK, M. HEMANN, S. J. ELLEDGE (2013): A role for PVRL4-driven cell–cell interactions in tumorigenesis. *eLife* 2, e00358.

DOI: 10.7554/eLife.00358

PEÑA, L., P. J. DE ANDRÉS, M. CLEMENTE, P. CUESTA, M. D. PÉREZ-ALENZA (2013): Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: Relationship with clinical and histological characteristics. *Vet. Pathol.* 50, 94-105.

DOI: 10.1177/0300985812447830

PEÑA, L., A. GAMA, M. H. GOLDSCHMIDT, J. ABADIE, C. BENAZZI, M. CASTAGNARO, L. DÍEZ, F. GÄRTNER, E. HELLMÉN, M. KIUPEL, Y. MILLÁN, M. A. MILLER, F. NGUYEN, A. POLI, G. SARLI, V. ZAPPULLI, J. MARTÍN DE LAS MULAS (2014): Canine mammary tumors: A review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 51, 127-145.

DOI: 10.1177/0300985813509388

PÉREZ-ALENZA, M. D., G. R. RUTTEMAN, L. PEÑA, A. C. BEYNEN, P. CUESTA (1998): Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *J. Vet. Intern. Med.* 12, 132-139.

DOI: 10.1111/j.1939-1676.1998.tb02108.x

QUEIROGA, F. L., M. D. PÉREZ-ALENZA, G. SILVÁN, L. PEÑA, C. S. LOPES, J. C. ILLERA (2008): Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 β -estradiol) in canine mammary tumours. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 110, 76-82.

DOI: 10.1016/j.jsbmb.2008.02.023

QUEIROGA, F. L., T. RAPOSO, M. I. CARVALHO, J. PRADA, I. PIRES (2011): Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: Most recent findings. *In Vivo* 25, 455-465.

RAJC, J., D. GUGIĆ, I. FRÖHLICH, K. MARJANOVIĆ, B. DUMENČIĆ (2017): Prognostic role of Nectin-4 expression in luminal B (HER2-negative) breast cancer. *Pathol. Res. Pract.* 213, 1102-1108.

DOI: 10.1016/j.prp.2017.07.019

RAPOSO, T. P., I. PIRES, M. I. CARVALHO, J. PRADA, D. J. ARGYLE, F. L. QUEIROGA (2015): Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. *Vet. Comp. Oncol.* 13, 464-474.

DOI: 10.1111/vco.12067

RAPOSO, T. P., I. PIRES, J. PRADA, F. L. QUEIROGA, D. J. ARGYLE (2017): Exploring new biomarkers in the tumour microenvironment of canine inflammatory mammary tumours. *Vet. Comp. Oncol.* 15, 655-666.

DOI: 10.1111/vco.12209

RAPOSO-FERREIRA, T. M. M., B. K. BRISSON, A. C. DURHAM, R. LAUFER-AMORIM, V. KRISTIANSEN, E. PURÉ, S. W. VOLK, K. SORENMO (2018): Characteristics of the epithelial-mesenchymal transition in primary and paired metastatic canine mammary carcinomas. *Vet. Pathol.* 55, 622-633.

DOI: 10.1177/0300985818776054

RASOTTO, R., D. BERLATO, M. H. GOLDSCHMIDT, V. ZAPPULLI (2017): Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: An observational cohort study of 229 cases. *Vet. Pathol.* 54, 571-578.

DOI: 10.1177/0300985817698208

RAVAL, S. H., R. S. PARMAR, M. M. PANDYA, D. V. JOSHI (2024): Unveiling the Canine Mammary Gland: From Development to Neoplasm. *Indian J. Vet. Pathol.* 48, 205-225.

DOI: 10.5958/0973-970X.2024.00036.1

RAZAVIRAD, A., S. RISMANCHI, P. MORTAZAVI, A. MUHAMMADNEJAD (2024): Canine Mammary Tumors as a Potential Model for Human Breast Cancer in Comparative Oncology. *Vet. Med. Int.* 2024, 9319651.

DOI: 10.1155/2024/9319651

REYMOND, N., S. FABRE, E. LECOCQ, J. ADÉLAÏDE, P. DUBREUIL, M. LOPEZ (2001): Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. *J. Biol. Chem.* 276, 43205-43215.

DOI: 10.1074/jbc.M103810200

RIOS-HOYO, A., N.-L. SHAN, P. L. KARN, L. PUSZTAI (2025): Clinical implications of breast cancer intrinsic subtypes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1464, 435-448.

DOI: 10.1007/978-3-031-70875-6_21

RIVERA, P., M. MELIN, T. BIAGI, T. FALL, J. HÄGGSTRÖM, K. LINDBLAD-TOH, H. VON EULER (2009): Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res.* 69, 8770-8774.

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1725

RUNGSIPAT, A., S. TATEYAMA, R. YAMAGUCHI, K. UCHIDA, N. MIYOSHI, T. HAYASHI (1999): Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 27-32.

DOI: 10.1292/jvms.61.27

RUTTEMAN, G. R., N. WILLEKES-KOOLSCHIJN, M. M. BEVERS, A. A. VAN DER GUGTEN, W. MISDORP (1986): Prolactin binding in benign and malignant mammary tissue of female dogs. *Anticancer Res.* 6, 829-835.

SALAS, Y., A. MÁRQUEZ, D. DIAZ, L. ROMERO (2015): Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. *PLoS One* 10, e0127381.

DOI: 10.1371/journal.pone.0127381

SANTOS, A. A., M. D. LOPES, A. C. CASSALI, G. D. FERREIRA, R. SERAKIDES, G. D. CASSALI (2011): Matrix metalloproteinase-2 expression in canine mammary carcinomas: relationship with lymph node metastasis and clinical outcome. *Vet. J.* 190, 210-216.

DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.10.015

SASSI, F., C. BENAZZI, G. CASTELLANI, G. SARLI (2010): Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Vet. Res.* 6, 5.

DOI: 10.1186/1746-6148-6-5

SCHAFER, K. A., G. KELLY, R. SCHRADER, W. C. GRIFFITH, B. A. MUGGENBURG, L. A. TIERNEY, J. F. LECHNER, E. B. JANOVITZ, F. F. HAHN (1998): A Canine Model of Familial Mammary Gland Neoplasia. *Vet. Pathol.* 35, 168-177.

DOI: 10.1177/030098589803500302

SCHEFFZEK, K., M. R. AHMADIAN, W. KABSCH, L. WIESMÜLLER, A. LAUTWEIN, F. SCHMITZ, A. WITTINGHOFFER (1997): The Ras-RasGAP complex: Structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277, 333-338.

DOI: 10.1126/science.277.5324.333

SCHLAFFER, D. H., R. A. FOSTER (2016): Female Genital System. In: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, Vol. 3, 6th ed. (Maxie, M. G., Ed.), Elsevier, St. Louis, pp.358-464.

DOI: 10.1016/B978-0-7020-5319-1.00015-3

SCHNEIDER, R., C. R. DORN, D. O. N. TAYLOR (1969): Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival. *J. Natl. Cancer Inst.* 43, 1249-1261.

DOI: 10.1093/jnci/43.6.1249

SHOJI, K., M. YONEDA, T. FUJIYUKI, Y. AMAGAI, A. TANAKA, A. MATSUDA, K. OGIHARA, Y. NAYA, F. IKEDA, H. MATSUDA, H. SATO, C. KAI (2016): Development of new therapy for canine mammary cancer with recombinant measles virus. *Mol. Ther. Oncolytics* 3, 15022.

DOI: 10.1038/mto.2015.22

SIMANSHU, D. K., D. V. NISSLEY, F. McCORMICK (2017): RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell* 170, 17-33.

DOI: 10.1016/j.cell.2017.06.009

SLEECKX, N., H. DE ROOSTER, E. J. B. VELDHUIS KROEZE, C. VAN GINNEKEN, L. VAN BRANTEGEM (2011): Canine mammary tumours, an overview. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 1112-1131.

DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x

SONNENSCHN, E. G., L. T. GLICKMAN, M. H. GOLDSCHMIDT, L. J. McKEE (1991): Body Conformation, Diet, and Risk of Breast Cancer in Pet Dogs: A Case-Control Study. *Am. J. Epidemiol.* 133, 694-703.

DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a115951

SORENMO, K. U. (2003): Canine mammary gland tumors. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 573-596.

DOI: 10.1016/S0195-5616(03)00020-2

SORENMO, K. U., V. M. KRISTIANSEN, M. A. COFONE, F. S. SHOFR, A.-M. BREEN, M. LANGELAND, C. M. MONGIL, A. M. GRONDAHL, J. TEIGE, M. H. GOLDSCHMIDT (2009): Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet. Comp. Oncol.* 7, 162-172.

DOI: 10.1111/j.1476-5829.2009.00184.x

SORENMO, K. U., R. RASOTTO, V. ZAPPULLI, M. H. GOLDSCHMIDT (2011): Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet. Pathol.* 48, 85-97.

DOI: 10.1177/0300985810389480

TAKAI, Y., J. MIYOSHI, W. IKEDA, H. OGITA (2008): Nectins and nectin-like molecules: Roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 603-615.

DOI: 10.1038/nrm2457

TESI, M., F. MILLANTA, A. POLI, G. MAZZETTI, A. PASQUINI, D. PANZANI, A. ROTA, I. VANNOZZI (2020): Role of body condition score and adiponectin expression in the progression of canine mammary carcinomas. *Vet. Med. Sci.* 6, 265-271.

DOI: 10.1002/vms3.232

THIERY, J. P., H. ACLOQUE, R. Y. J. HUANG, M. A. NIETO (2009): Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.

DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007

TIMMERMANS-SPRANG, E. P. M., A. GRACANIN, J. A. MOL (2017): Molecular Signaling of Progesterone, Growth Hormone, Wnt, and HER in Mammary Glands of Dogs, Rodents, and Humans: New Treatment Target Identification. *Front. Vet. Sci.* 4, 53.

DOI: 10.3389/fvets.2017.00053

TORRES, C. G., M. P. ITURRIAGA, P. CRUZ (2021): Hormonal Carcinogenesis in Canine Mammary Cancer: Molecular Mechanisms of Estradiol Involved in Malignant Progression. *Animals* 11, 608.

DOI: 10.3390/ani11030608

VAN GARDEREN, E., H. J. A. VAN DER POEL, J. F. SWENNENHUIS, E. H. J. WISSINK, G. R. RUTTEMAN, E. HELLMÉN, J. A. MOL, J. A. SCHALKEN (1999): Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors. *Endocrinology* 140, 5907-5914.

DOI: 10.1210/endo.140.12.7189

VAZQUEZ, E., Y. LIPOVKA, A. CERVANTES-ARIAS, A. GARIBAY-ESCOBAR, M. M. HABY, F. L. QUEIROGA, C. VELAZQUEZ (2023): Canine Mammary Cancer: State of the Art and Future Perspectives. *Animals* 13, 3147.

DOI: 10.3390/ani13193147

VERONESI, M., M. BATTOCCHIO, C. RIZZI, G. SIRONI (2003): Relationship between dysplastic and neoplastic mammary lesions and pseudopregnancy in the bitch. *Vet. Res. Commun.* 27 (Suppl. 1), 245-247.

DOI: 10.1023/B:VERC.0000014201.76591.e7

VETTER, I. R., A. WITTINGHOFER (2001): The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.

DOI: 10.1126/science.1062023

WANG, X., C. QIAN, Y. YANG, M.-Y. LIU, Y. KE, Z.-M. QIAN (2019): Phosphorylated Rasal2 facilitates breast cancer progression. *EBioMedicine* 50, 144-155.

DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.11.019

WEISMAN, P. S., C. K. Y. NG, E. BROGI, R. E. EISENBERG, H. H. WON, S. PISCUOGLIO, M. R. DE FILIPPO, R. IORIS, M. AKRAM, L. NORTON, B. WEIGELT, M. F. BERGER, J. S. REIS-FILHO, H. Y. WEN (2016): Genetic alterations of triple negative breast cancer by targeted next-generation sequencing and correlation with tumor morphology. *Mod. Pathol.* 29, 476-488.

DOI: 10.1038/modpathol.2016.39

YOSHIDA, K., M. HIROKAWA, S. YAMAGUCHI, K. NAKANISHI, M. MIYOSHI, K. UCHIDA, T. TATEYAMA (2014): Correlation between epithelial-mesenchymal transition-related proteins and clinicopathological features in canine mammary gland carcinomas. *Vet. Pathol.* 51, 1070-1080.

DOI: 10.1177/0300985814536102

ZAPPULLI, V., L. PEÑA, R. RASOTTO, M. H. GOLDSCHMIDT, A. GAMA, J. L. SCRUGGS, M. KIUPEL (2019): Classification of canine mammary tumors. In: *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals, Vol. 2: Mammary Tumors* (KIUPEL, M., Ed.), Davis-Thompson DVM Foundation, Gurnee, IL, USA, pp. 60-196.

ZEINDLER, J., S. D. SOYSAL, S. PISCUOGLIO, C. K. Y. NG, R. MECHERA, A. ISAAK, W. P. WEBER, S. MUENST (2019): Nectin-4 Expression Is an Independent Prognostic Biomarker and Associated With Better Survival in Triple-Negative Breast Cancer. *Front. Oncol.* 9, 747.

DOI: 10.3389/fonc.2019.00747

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNASTVENIH RADOVA

Ivana Mihoković Buhin rođena je 24. studenoga 1991. godine u Bjelovaru. Osnovnu školu i opću gimnaziju završila je u Bjelovaru. Godine 2010. upisala je Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojem je diplomirala 2017. godine.

Od svibnja do listopada 2017. godine u okviru programa Erasmus+ obavila je stručnu praksu u veterinarskoj klinici Clinica Veterinaria Gran Sasso u Milanu. Nakon povratka u Hrvatsku radila je u veterinarskoj ambulanti u Bjelovaru do prosinca 2018. godine, kada se zaposlila na mjestu asistentice u Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje je i danas zaposlena. Sudjeluje u izvođenju nastave na obveznim i izbornim kolegijima Zavoda za veterinarsku patologiju u okviru studija na hrvatskom i engleskom jeziku te je aktivno uključena u stručni rad Zavoda.

Godine 2020. upisala je doktorski studij Veterinarske znanosti na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na istom je fakultetu 2025. godine završila sveučilišni specijalistički studij Veterinarska patologija te stekla akademski naziv sveučilišne specijalistice veterinarske medicine.

Njezin stručni i znanstveni interes usmjeren je na neoplazije pasa i mačaka. Autorica je ili koautorica 23 znanstvena i stručna rada. Članica je Europskog društva veterinarskih patologa (European Society of Veterinary Pathology, ESVP).

Udana je i majka jedne djevojčice.

ZNANSTVENI RADOVI

HUBER, D., D. VLAHOVIĆ, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, B. ARTUKOVIĆ, M. HOHŠTETER, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN (2026): Cardiac involvement in European canine babesiosis - a pathological perspective. *Top. Companion Anim. Med.* 71, 101060. DOI:10.1016/j.tcam.2026.101060.

HUBER, D., D. VLAHOVIĆ, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, I. CIPRIĆ, B. ARTUKOVIĆ, A. GUDAN KURILJ, M. HOHŠTETER, K. SEVERIN, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK (2026): Tumors of the urinary system in cats. *Vet. arhiv* 96, 175–185. DOI:10.24099/vet.arhiv.2908.

DETELJ, D., D. VLAHOVIĆ, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, B. ARTUKOVIĆ, A. GUDAN KURILJ, M. HOHŠTETER, I. CIPRIĆ, D. HUBER (2025): Pregled patologije posteljica pobačene ždrebadi u pobačajima nezarazne etiologije. *Veterinar* 63, 28–33.

LIPAR, M., A. MARTINOVIĆ, T. NIKUŠEVA MARTIĆ, T. KURTOVIĆ, J. BUBIĆ ŠPOLJAR, A. GELEMANOVIĆ, M. HOHŠTETER, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, A. MUSULIN, V. NESEK ADAM, B. GORJANC, S. VUKIČEVIĆ, D. VNUK (2025): Role of cytokines in wound healing following wound catheter analgesia in rats. *Vet. Sci.* 12, 1214. DOI:10.3390/vetsci12121214.

ERAGHI, V., I. CIPRIĆ, N. SERDAR, A. JONKER, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, D. VLAHOVIĆ, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, B. ARTUKOVIĆ, D. HUBER, M. MATASOVIĆ, M. HOHŠTETER, A. GUDAN KURILJ (2025): Feline lymphoma in focus: examining the patterns and types in Croatia's pathological records. *Vet. Sci.* 12, 986. DOI:10.3390/vetsci12100986.

ERAGHI, V., L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, M. MATASOVIĆ, D. VLAHOVIĆ, D. HUBER, A. GUDAN KURILJ, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, B. ARTUKOVIĆ, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, I. CIPRIĆ, M. HOHŠTETER (2025): Canine lymphoma in Croatia: a fourteen-year retrospective study. *BMC Vet. Res.* 21, 172. DOI:10.1186/s12917-025-04634-x.

HUBER, D., L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, A. GUDAN KURILJ, M. HOHŠTETER, B. ARTUKOVIĆ (2025): Pyometra in Croatian cats – a rare cause of death, with the first report of concurrent pyometra and pneumonia in a cat. *Vet. arhiv* 95, 113–120. DOI:10.24099/vet.arhiv.2609.

HUBER, D., K. SEVERIN, D. VLAHOVIĆ, S. KRIŽANAC, S. MOFARDIN, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, A. GUDAN KURILJ, B. ARTUKOVIĆ, M. HOHŠTETER (2024): Cancer morbidity in Croatian cats: retrospective study on spontaneously arising tumors (2009–2019). *Top. Companion Anim. Med.* 58, 100841. DOI:10.1016/j.tcam.2023.100841.

MEDVEN ZAGRADIŠNIK, L., H. ŽIDAK, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, S. MENČIK, A. GUDAN KURILJ, B. ARTUKOVIĆ, D. HUBER, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, D. VLAHOVIĆ, K. SEVERIN, M. HOHŠTETER (2023): Pojavnost neoplazija u hrvatskih autohtonih pasmina pasa: retrospektivna analiza tijekom desetogodišnjeg razdoblja. *Hrv. Vet. Vjesn.* 31, 32–40.

ARTUKOVIĆ, B., A. GUDAN KURILJ, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, M. HOHŠTETER (2022): Granular cell tumor in the central nervous system of a ferret (*Mustela putorius furo*) - a case report. *Vet. arhiv* 92, 205–212. DOI:10.24099/vet.arhiv.1705.

HUBER, D., I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, V. STEVANOVIĆ, Ž. GRABAREVIĆ (2022): Pyometra associated with *Staphylococcus pseudintermedius* in two bitches. *Top. Companion Anim. Med.* 49, 100650. DOI:10.1016/j.tcam.2022.100650.

PARAVIĆ, M., L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, A. GUDAN KURILJ, B. ARTUKOVIĆ, D. HUBER, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, M. HOHŠTETER (2021): Komparativna analiza tumora mezenhimalnih vretenastih stanica upotrebom histopatološke i citološke pretrage. In: *Zbornik radova Veterinarski dani 2021*. Zagreb, pp. 195–204.

VUKOVIĆ, S., L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, K. SEVERIN, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, A. GUDAN KURILJ, B. ARTUKOVIĆ, D. HUBER, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, D. VLAHOVIĆ, M. HOHŠTETER (2021): Komparativna analiza citoloških i histopatoloških karakteristika melanocitnih tumora pasa. *Veterinar* 59, 39–44.

GUDAN KURILJ, A., K. SEVERIN, M. HOHŠTETER, B. ARTUKOVIĆ, Ž. GRABAREVIĆ, D. HUBER, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN (2021): Pathomorphological features and mast cell count in canine visceral hemangiosarcomas. *Vet. arhiv* 91, 159–168.
DOI:10.24099/vet.arhiv.1245

HOHŠTETER, M., I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, B. ARTUKOVIĆ, A. BECK, A. GUDAN KURILJ (2021): Expression of E-cadherin and Ki-67 in canine apocrine and sebaceous gland tumors. *Vet. arhiv* 91, 51–63.
DOI:10.24099/vet.arhiv.0778

STRUČNI RADOVI

MIHOKOVIĆ BUHIN, I., N. SERDAR (2025): Subaortalna stenoza u mačke. *Hrv. Vet. Vjesn.* 33, 62–65.

HUBER, D., L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, A. GUDAN KURILJ, B. ARTUKOVIĆ, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, M. HOHŠTETER, I. CIPRIĆ, D. VLAHOVIĆ (2023): Novotvorine mokraćnog mjehura u mačaka – histopatološko istraživanje. *Hrv. Vet. Vjesn.* 31, 50–55.

VLAHOVIĆ, D., **I. MIHOKOVIĆ BUHIN** (2022): Otvoreni arterijski vod u pasa. *Hrv. Vet. Vjesn.* 30, 52–55.

ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, I.-C., **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, D. VLAHOVIĆ (2021): Unilateralna agenezija bubrega i kronični fibrozirajući nefritis. *Hrv. Vet. Vjesn.* 29, 56–60.

MIHOKOVIĆ BUHIN, I., I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN (2021): Dijafragmatska hernija u mačaka. *Hrv. Vet. Vjesn.* 29, 60–63.

GDAN KURILJ, A., A. M. BAŠIĆ, **I. MIHOKOVIĆ BUHIN**, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, D. HUBER, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, M. HOŠTETER, B. ARTUKOVIĆ, Ž. GRABAREVIĆ, O. SMOLEC (2020): Pregled uzroka uginuća domaćih životinja u perianestezijskom razdoblju. *Hrv. Vet. Vjesn.* 28, 20–28.

MIHOKOVIĆ BUHIN, I., Š. NALETILIĆ, M. PALIĆ, A. OGNJENOVIĆ (2020): Limfom mačaka. *Hrv. Vet. Vjesn.* 28, 70–74.

MIHOKOVIĆ BUHIN, I., L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, D. HUBER, V. STEVANOVIĆ (2019): Panleukopenija mačaka. *Hrv. Vet. Vjesn.* 27, 50–53.