

Stężenie białka C-reaktywnego i surowiczego składnika amyloidu A w surowicy suk z nowotworami gruczołu sutkowego

MAREK SZCZUBIAŁ, ROMAN DĄBROWSKI,
MARIOLA BOCHNIARZ, WOJCIECH ŁOPUSZYŃSKI*

Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt oraz *Katedra Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Szczubiał M., Dąbrowski R., Bochniarz M., Łopuszyński W.

Concentration of C-reactive protein and serum amyloid A in serum of bitches with mammary gland tumors

Summary

The aim of the present study was to determine the concentration of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid A (SAA) in bitches suffering from spontaneously occurring mammary gland tumors. The experiment involved 30 bitches with malignant gland tumors removed surgically (carcinoma complex – 40%, carcinoma simple – 26.7%, sarcoma – 23.3%, carcinosarcoma – 10%) and 10 clinically healthy bitches. Measurements of the CRP and SAA serum concentration were performed using a commercial ELISA test. The concentration of CRP as well as SAA were significantly higher in bitches with sarcomas or carcinosarcomas compared with the animals with carcinomas (complex or simple) and the control group. Histopathological examination showed extensive areas of necrosis and inflammatory reactions in most sarcomas and carcinosarcomas. Most likely these were the main causes of the CRP and SAA increase in the serum of bitches with these type of tumors.

Keywords: acute phase proteins, CRP, SAA, mammary gland tumors, bitches

Naruszenie homeostazy organizmu ludzi i zwierząt, spowodowane uszkodzeniem tkanek, wzrostem nowotworu lub zaburzeniami immunologicznymi, wywołuje reakcję ostrej fazy (16, 23). Jej celem jest ograniczenie uszkodzeń i przywrócenie zaburzonej homeostazy. W przebiegu reakcji ostrej fazy dochodzi do zmian w stężeniu białek surowicy, określanych jako białka ostrej fazy (bof). Białka, których poziom wzrasta co najmniej o 25%, nazywano pozytywnymi białkami ostrej fazy, natomiast te, których stężenie obniża się, określa się białkami negatywnymi ostrej fazy (8). Białka ostrej fazy są syntetyzowane głównie w hepatocytach, pod wpływem cytokin prozapalnych, przede wszystkim interleukiny 6 (IL-6) oraz interleukiny 1 (IL-1) i czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- α) (4, 8, 16). Pewne ilości bof mogą być również wytwarzane przez aktywowane limfocyty, monocyty, komórki endotelialne, fibroblasty i adipocyty (4). Choć fizjologiczna rola bof nie została jeszcze ostatecznie wyjaśniona, uważa się, że biorą one udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej, ochronie przed infekcją i naprawie uszkodzonych tkanek (4, 16). Oznaczanie bof jest coraz częściej stosowanym markerem do monitorowania przebiegu i natężenia oraz prognozowania zejścia procesu chorobowego, a także oceny skuteczności terapii chorób u zwierząt (6).

Głównymi białkami ostrej fazy u psów są białko C-reaktywne (CRP) i surowiczy składnik amyloidu A (SAA) (4, 8). Po zadziałaniu bodźca uszkadzającego tkan-

ki, stężenie tych białek może bardzo szybko wzrosnąć w surowicy nawet 1000-krotnie. Wykazano, że poziom CRP i SAA pozytywnie koreluje z rozległością uszkodzenia tkanek i natężeniem procesu zapalnego (13, 15, 31).

Różnego stopnia wzrost stężenia CRP obserwowano w surowicy psów przy infekcjach bakteryjnych i wirusowych (15, 32), babeszjozie (18), ropomaciczu (5), zapaleniu jelit (13), zapaleniu stawów (14) oraz wielu innych chorobach (15, 28, 32). Opisano także zwiększenie koncentracji CRP u psów w następstwie różnych zabiegów operacyjnych (5, 32).

SAA było dotychczas rzadziej badane u psów. Po dożylnym podaniu lipopolisacharydu *E. coli* do wzrostu stężenia SAA w surowicy krwi psów dochodziło już po 2 godzinach od iniekcji (11). Zwiększenie stężenia SAA u psów obserwowano także po infekcji *Bordetella bronchiseptica* (30), przy doświadczalnie wywołanej parwowirozie (4) i uszkodzeniu naczyń wieńcowych (19), w zapaleniach stawów (14) oraz zakażeniu *Babesia canis* (18). Stwierdzono pozytywną korelację między stężeniem SAA a CRP w surowicy psów podczas procesów zapalnych (28).

Dane z medycyny ludzkiej wskazują, że do wzrostu stężenia CRP i SAA dochodzi u chorych z nowotworami i oznaczanie tych białek może być przydatnym wskaźnikiem do oceny stopnia zaawansowania choroby i prognozowania czasu przeżycia (1, 7, 24).

Nowotwory, a zwłaszcza ich formy złośliwe, należą do najgroźniejszych chorób u ludzi i zwierząt. Nowotwory gruczołu sutkowego pod względem częstości występowania u suk zajmują drugie miejsce po nowotworach skóry (17, 21). W około 50% przypadków proces ma charakter złośliwy (21). Jak dotąd przeprowadzono niewiele badań dotyczących kształtowania się poziomu białek ostrej fazy w przebiegu tego schorzenia u suk.

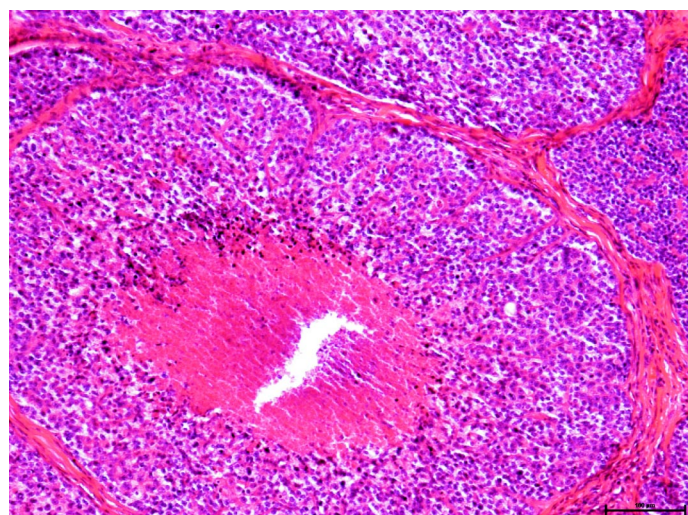
Celem przeprowadzonych badań było określenie kształtowania się stężenia CRP i SAA w surowicy krwi suk z nowotworami gruczołu sutkowego.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 40 sukach różnych ras, będących pacjentami Katedry i Kliniki Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie. Grupę doświadczalną tworzyło 30 wyselekcjonowanych suk w wieku od 6 do 13 lat, które operowano z powodu nowotworu w gruczole sutkowym. Grupę kontrolną stanowiło 10 klinicznie zdrowych suk, w wieku 3-8 lat sterylizowanych na życzenie właściciela. U wszystkich zwierząt przeprowadzono badanie kliniczne, rutynowe badanie hematologiczne i biochemiczne krwi oraz badanie moczu. U suk doświadczalnych, poza obecnością nowotworu w gruczole sutkowym, nie stwierdzono innych schorzeń. Wszystkie zwierzęta były operowane w znieczuleniu ogólnym (atropina + ksylazyna + ketamina). Od wszystkich zwierząt przed przystąpieniem do znieczulenia pobierano z żyły odpromieniowej po 9 cm³ krwi do próbek typu Vacuette. Z krwi po odwirowaniu uzyskiwano surowicę. Bezpośrednio po otrzymaniu surowica była zamrażana w temperaturze -76°C i w głębokim zamrożeniu przechowywana do momentu badań. W surowicy określano stężenie białka C-reaktywnego (CRP) i surowiczego składnika amyloidu A (SAA).

Stężenie CRP oznaczano metodą ELISA przy użyciu komercyjnego zestawu C-Reactive Protein Assay (Tridelta Development Ltd, Kildare, Irlandia). Odczytu absorbancji dokonywano za pomocą czytnika ELISA ELX 800 (BIO-TEK Instruments Inc., Vermont, USA) przy długości fali 450 nm.

Stężenie SAA oznaczano metodą ELISA, używając komercyjnego zestawu Serum Amyloid A Assay (Tridelta Development Ltd, Kildare, Irlandia). Odczyt absorbancji przeprowadzano za pomocą czytnika ELISA ELX 800 (BIO-TEK Instruments Inc., Vermont, USA) przy długości fali 450 nm.



Ryc. 1. Ognisko martwicy centralnej w raku litym typu comedo. Barw. H. i E. Pow. ok. 200 ×

Wycinki usuniętych operacyjnie nowotworów gruczołu sutkowego utrwalano przez 24 godz. w obojętnej 10% formalinie, a następnie przeprowadzano rutynowo do bloczków parafinowych i krojono na skrawki histologiczne o grubości 4 μm. Do oceny histologicznej zabarwionych hematoksyliną i eozyną preparatów mikroskopowych zastosowano klasyfikację guzów i dysplazji gruczołu sutkowego wg WHO (20). W trakcie badania histologicznego zwracano uwagę na występowanie ognisk martwicy i reakcji zapalnej w badanych guzach.

Wyniki badań poddano analizie statystycznej, określając średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe (± SD). Różnice pomiędzy grupami analizowano przy użyciu testu t-Studenta dla $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,001$.

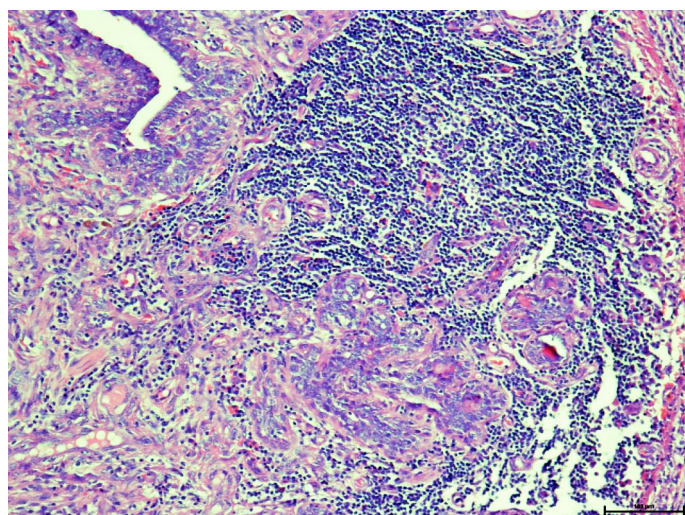
Wyniki i omówienie

Wszystkie usunięte z gruczołu sutkowego badanych suk guzy zakwalifikowano do czterech grup nowotworów złośliwych (tab. 1). Najliczniejszą grupę stanowiły raki złożone (40,0%) a w dalszej kolejności: raki proste (26,7%), mięsaki (23,3%) oraz rakomięsaki (10,0%). Zarówno w rakach, jak i mięsakach oraz rakomięsakach badanie histologiczne ujawniło ogniska martwicy i odczyny zapalne, przy czym rozległość martwicy i intensywność nacieków zapalnych były różne. W niektórych guzach, zakwalifikowanych jako raki złożone lub raki proste występowały małe, często wielogniskowe obszary martwicy i/lub niewielkie nacieki zapalne (ryc. 1). Rozległe obszary martwicy i znacznego stopnia odczynu zapalne występowały w większości rakomięsaków i mięsaków (ryc. 2).

Stężenia CRP i SAA w surowicy suk grupy kontrolnej nie odbiegały od wartości

Tab. 1. Histologiczna charakterystyka nowotworów gruczołu sutkowego u badanych suk

Typ histologiczny nowotworu	Liczba (%)
Rak złożony	12 (40,0)
Rak prosty	8 (26,7)
Rak brodawkowo-cewkowy	4 (13,3)
Rak lity	4 (13,3)
Mięsak	7 (23,3)
Włókniakomięsak	5 (16,7)
Kostniakomięsak	2 (6,7)
Rakomięsak	3 (10,0)



Ryc. 2. Ogniskowy nacieki komórek jednojądrowych w obwodowej strefie wzrostu raka cewkowo-brodawkowatego. Barw. H. i E. Pow. ok. 200 ×

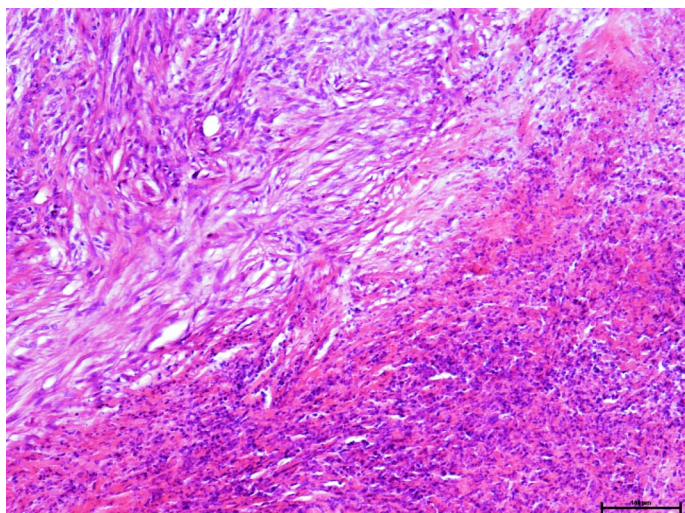
Tab. 2. Stężenie CRP i SAA w surowicy badanych suk

Grupa	Typ histologiczny nowotworu	Liczba suk	Stężenie CRP (µg/ml)		Stężenie SAA (µg/ml)	
			Zakres	$\bar{x} \pm SD$	Zakres	$\bar{x} \pm SD$
Suki z nowotworem gruczołu sutkowego	Rak złożony	12	2,3-13,1	5,7 ± 4,0 ^{a,b}	3,1-5,1	3,6 ± 0,7 ^{a,A}
	Rak prosty	8	1,3-8,6	3,8 ± 3,1 ^{c,d}	3,2-3,8	3,5 ± 0,2 ^{b,B}
	Mięsak	7	43,6-470,0	**305,4 ± 145,9 ^{a,c}	3,3-193,1	**106,8 ± 65,9 ^{a,b}
	Rakomięsak	3	138,0-270,0	**214,7 ± 68,5 ^{b,d}	5,1-133,7	*82,9 ± 68,4 ^{A,B}
Suki zdrowe		10	1,2-11,2	3,9 ± 3,4	3,2-7,5	4,1 ± 1,4

Objaśnienia: a, b, c, d – wyniki oznaczone takimi samymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0,001$; A – wyniki oznaczone takimi samymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0,01$; B – wyniki oznaczone takimi samymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0,05$; * – różnica statystycznie istotna ($p < 0,01$) przy porównaniu z grupą suk zdrowych; ** – różnica statystycznie istotna ($p < 0,001$) przy porównaniu z grupą suk zdrowych

przyczynianych w literaturze jako prawidłowe dla zdrowych psów (4, 15, 32) – tab. 2. W porównaniu do grupy kontrolnej średnie wartości stężenia obu białek były istotnie wyższe u suk z mięsakiem oraz rakomięsakiem. Zarówno stężenie CRP, jak i SAA u suk z tymi nowotworami było również istotnie wyższe niż u suk z rakiem złożonym lub rakiem prostym. Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w wartościach stężenia CRP i SAA między grupą suk z rakiem złożonym a sukami z rakiem prostym, a także pomiędzy grupami suk z mięsakiem oraz rakomięsakiem.

Wobec większości nowotworów złośliwych pobudza na jest komórkowa odpowiedź immunologiczna. Badania histopatologiczne wykazują, że zazwyczaj posiadają one nacieki zapalne (26). W nacieku zapalnym dominują limfocyty, makrofagi, a także komórki dendrytyczne, granulocyty i komórki tuczne. Najważniejszą komórką odpowiedzi przeciwnowotworowej są swoiste limfocyty pomocnicze (Th), które mogą rozpoznawać swoiste antygeny związane z nowotworem prezentowane wraz z cząsteczkami MHC klasy II (12). Aktywowane limfocyty Th wydzielają szereg cytokin, które wspomagają lub aktywują kolejne komórki układu immunologicznego albo bezpośrednio niszczą komórki nowotworowe. W odpo-



Ryc. 3. Granica rozległego obszaru martwicy z towarzyszącym naciekiem zapalnym we włókniakomięsaku. Barw. H. i E. Pow. ok. 200 ×

wiedzi przeciwnowotworowej biorą również udział cytokiny wydzielane przez makrofagi (12). Wśród cytokin wydzielanych przez limfocyty Th i makrofagi znajdują się: IL-6, IL-1 i TNF alfa, które są głównymi czynnikami indukującymi syntezę białek ostrej fazy przez hepatocyty (4, 8, 16).

Powstawanie ognisk martwicy jest dodatkowym czynnikiem zwiększającym odczyn zapalny w guzie nowotworowym (20). Substancje uwalniane z martwych tkanek są również jednym z czynników aktywujących komórki wytwarzające cytokiny prozapalne. Według poglądów niektórych autorów (8), obecność w guzie obszarów martwicy i procesu zapalnego znacznie zwiększa produkcję bof, która generalnie jest umiarkowana w przebiegu choroby nowotworowej, w porównaniu do infekcji i zapalenia (7, 28, 32). Dane literaturowe są zbieżne z wynikami badań własnych. Jedynie w części usuniętych raków (złożonych i prostych) badanie histologiczne uwidocznilo niewielkie ogniska martwicy i/lub nacieki zapalne. Jednocześnie w grupach suk z tymi typami nowotworów nie stwierdzono istotnych zmian stężenia CRP i SAA w porównaniu do suk zdrowych. W większości rakomięsaków i mięsaków występowały rozległe obszary martwicy i/lub znaczne odczyny zapalne. W surowicy suk z tymi nowotworami doszło także do istotnego wzrostu stężenia CRP i SAA. Wskazuje to, że głównym czynnikiem indukującym wzrost poziomu białek ostrej fazy u suk z nowotworami złośliwymi gruczołu sutkowego są wtórne zmiany martwicze w guzie. Pewne ilości bof mogły być również produkowane przez komórki nowotworu, co wykazały badania immunohistochemiczne Nozoe i wsp. (22).

Nowotwory pochodzenia mezenchymalnego (mięsaki) i mieszane (rakomięsaki) – w świetle wielu badań – są znacznie bardziej złośliwe niż nowotwory nabłonkowe (raki) (10, 27). Te nowotwory zwykle szybko rosną i mają dużą skłonność do tworzenia przerzutów. Szybkie tempo proliferacji komórkowej, naciekanie okolicznych tkanek oraz infiltracja do naczyń krwionośnych i limfatycznych predysponuje te guzy do powstawania obszarów martwicy w guzie. Według niektórych autorów (9), obecność dużych ognisk martwicy w nowotworze wskazuje na jego dużą złośliwość. W świetle tych danych i wyników przeprowadzonych badań własnych można przypuszczać, że określanie stężenia CRP i SAA w surowicy suk z nowotworami gruczołu sutkowego dostarcza pośrednio informacji o stopniu złośliwości nowotworu i może mieć znaczenie prognostyczne. Wymaga to jednak dalszych badań w tym kierunku.

W dostępnym piśmiennictwie badań na temat białek ostrej fazy u suk z nowotworami gruczołu sutkowego jest niewiele. Tecler i wsp. (28) stwierdzili wyższe stężenie CRP i SAA w surowicy psów z różnymi nowotworami – w większości dotyczącymi gruczołu sutkowego – w po-

równaniu do psów zdrowych. Jednak różnice nie osiągnęły istotności statystycznej. Nie było również statystycznie istotnych różnic w wartościach stężenia CRP i SAA pomiędzy psami z nowotworami nabłonkowymi (raki), mezenchymalnymi (mięsakami) oraz mieszanymi (rakomięsakami), chociaż najwyższe stężenie tych białek stwierdzano wśród zwierząt z mięsakami. W innych badaniach nie znaleziono różnic w stężeniu surowiczego CRP między sukami z gruczolakorakiem gruczołu sutkowego (0,8-5,4 µg/ml) a zdrowymi (1,1-6,3 µg/ml) (15). We wcześniejszych badaniach dotyczących CRP stwierdzono, że średnia wartość stężenia tego białka u suk z niezłośliwymi nowotworami gruczołu sutkowego oraz złośliwymi, ale bez przerzutów wynosiła 5 µg/ml (3). W przypadku suk, u których doszło do przerzutów nowotworu z gruczołu sutkowego do odległych narządów, stężenie CRP wzrosło do 25 µg/ml. Thougaard i wsp. (29) nie stwierdzili istotnych różnic między sukami z nowotworem gruczołu sutkowego a zdrowymi w stężeniu surowiczej kwaśnej alfa-1 glikoproteiny. Zwiększenie stężenia tego białka opisano natomiast u psów z białaczką, różnymi rakami (z wyjątkiem raków gruczołu sutkowego) oraz mięsakami (23). Badania Yamamoto i wsp. (32) wykazały, że stężenie CRP w surowicy psów z różnymi nowotworami wahało się od 5,1 µg/ml do 307,1 µg/ml i było wyższe w porównaniu do stężenia u zwierząt zdrowych (2,4 µg/ml-30,0 µg/ml).

Badania odnośnie do stężenia bof były intensywnie prowadzone u ludzi z chorobą nowotworową. Podwyższone stężenie CRP i SAA stwierdzono, m.in. u chorych na nowotwory: jelita grubego, pęcherza moczowego, przetyku, piersi i płuc (1, 7, 24). Stężenie CRP i SAA u kobiet z rakiem piersi, a także u ludzi z innymi nowotworami, było najwyższe w zaawansowanym stadium choroby, kiedy nowotwór miał duże rozmiary, występowały owrzodzenia w obrębie guza oraz przerzuty nowotworu (2, 7). Badania te wskazują, że CRP i SAA mogą być dobrymi markerami do monitorowania stopnia zaawansowania nowotworu. Uważa się również, że określanie stężenia tych białek ostrej fazy u chorych na nowotwór może mieć wartość prognostyczną (1, 7). Niedawno wykazano, że utrzymujący się wysoki poziom białka CRP u ludzi był związany z większym ryzykiem rozwoju raka płuc, piersi, prostaty, jelita grubego (25). Dostarcza to pośredniego dowodu, że przewlekły stan zapalny może być czynnikiem indukującym rozwój nowotworu.

Przeprowadzone badania własne pozwalają stwierdzić, że obecność nowotworu złośliwego w gruczole sutkowym suk może spowodować zachwianie ogólnoustrojowej homeostazy i zwiększenie produkcji białek ostrej fazy, takich jak CRP i SAA. Istotnego wzrostu stężenia CRP i SAA należy oczekiwać szczególnie w przypadkach nowotworów, którym towarzyszą rozległe zmiany martwicze i zapalne w obrębie guza.

Piśmiennictwo

1. Albuquerque K. V., Price M. R., Badley R. A., Yonrup I., Pearson D., Blamey R. W., Robertson J. F.: Pre-treatment serum levels of tumour markers in metastatic breast cancer: a prospective assessment of their role in predicting response to therapy and survival. *J. Surg. Oncol.* 1995, 21, 504-509.
2. Biran H., Friedman N., Neumann L., Pras M., Shainkin-Kestenbaum R.: Serum amyloid A (SAA) variations in patients with cancer: correlation with disease activity, stage, primary site, and prognosis. *J. Clin. Pathol.* 1986, 39, 794-797.
3. Caspi D., Snel F. W., Batt R. M., Bennett D., Rutteman G. R., Hartman E. G., Baltz M. L., Gruys E., Pepys M. B.: C-reactive protein in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 1987, 48, 919-921.

4. Ceron J. J., Eckersall P. D., Martinez-Subiela S.: Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Pathol.* 2005, 34, 85-99.
5. Dąbrowski R., Wawron W., Kostro K.: Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariectomy in healthy bitches and those with pyometra. *Theriogenology* 2007, 67, 321-327.
6. Eckersall P. D.: Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Rev. Med. Vet.* 2000, 151, 577-584.
7. Gockel I., Dirksen K., Junginger T., Messow C. M.: Significance of preoperative C-reactive protein as a parameter of the perioperative course and the prognosis in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the oesophagus. *World J. Gastroenterol.* 2006, 12, 3746-3750.
8. Gruys E., Obwolo M. J., Toussaint M.: Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet. Bull.* 1994, 64, 1009-1018.
9. Hampe J. F., Misdorp W.: Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull. WHO* 1974, 50, 111-133.
10. Hellmen E., Bergstrom R., Holmberg L., Spangberg I., Hansson K., Lindgren A.: Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet. Pathol.* 1993, 30, 20-27.
11. Higgins M. A., Berridge B. R., Mills B. J., Schultze A. E., Gao H., Searfoss G. H., Baker T. K., Ryan T. P.: Gene expression analysis of the acute phase response using a canine microarray. *Toxicol. Sci.* 2003, 74, 470-484.
12. Jakóbsiak M.: Immunologia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000.
13. Jergens A. E., Schreiner C. A., Frank D. E., Niyo Y., Ahrens F. E., Eckersall P. D., Benson T. J., Evans R.: A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *J. Vet. Intern. Med.* 2003, 17, 291-297.
14. Kjølgaard-Hansen M., Christensen M. B., Lee M. H., Jensen A. L., Jacobsen S.: Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid from spontaneously diseased dogs with joint diseases or other conditions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007, 117, 296-301.
15. Kjølgaard-Hansen M., Kristensen A. T., Jensen A. L.: Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum. *J. Vet. Med. A* 2003, 50, 164-168.
16. Kostro K., Gliński Z., Wójcicka-Lorenowicz K., Krakowski L.: Białka ostrej fazy jako markery chorób u zwierząt. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 539-544.
17. Malicka E., Piusiński W., Sendecka H., Bielecki W., Osińska B., Lenartowicz-Kubrat Z.: Nowotwory psów stwierdzane w badaniach anatomopatologicznych w latach 1985-1993. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 103-106.
18. Matijacko V., Mrljak V., Kis L., Kucer N., Forseck J., Zivcinkaj T., Romic Z., Simec Z., Ceron J. J.: Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet. Parasitol.* 2007, 144, 242-250.
19. McDuffie J. E., Yu X., Sobocinski G., Song Y., Chupka J., Albassam M.: Acute coronary artery injury in dogs following administration of CI-1034, an endothelin A receptor antagonist. *Cardiovasc. Toxicol.* 2006, 6, 291-38.
20. Misdorp W., Else R. W., Hellmen E., Lipscomb T. P.: Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. T. 7, Schuman F. Y. (red.). *Armed Forces Institute of Pathology*, Washington, DC 1999.
21. Nowak M., Madej J. A.: Występowanie nowotworów u zwierząt domowych na terenie Dolnego Śląska w latach 2000-2004. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 900-904.
22. Nozoe T., Korenaga D., Futatsugi M., Saeki H., Maehara Y., Sugimachi K.: Immunohistochemical expression C-reactive protein in squamous cell carcinoma of the esophagus – significance as a tumor marker. *Cancer Lett.* 2003, 192, 89-95.
23. Ogilvie G. K., Walters L. M., Greeley S. G., Henkel S. E., Salman M. D.: Concentration of α -1 acid glycoprotein in dogs with malignant neoplasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1993, 203, 1144-1146.
24. Raynes J. G., Cooper E. H.: Comparison of serum amyloid A protein and C-reactive protein concentrations in cancer and non-malignant disease. *J. Clin. Pathol.* 1983, 36, 798-803.
25. Siemes C., Visser L. E., Coebergh J. W., Splinter T. A., Witteman J. C., Uitterlinden A. G., Hofman A., Pols H. A., Stricker B. H.: C-reactive protein levels, variation in the C-reactive protein gene, and cancer risk: the Rotterdam Study. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24, 5216-5222.
26. Skrzypczak M.: Angiogeneza w nowotworach gruczołu sutkowego suk. Rozprawa doktorska, SGGW, Warszawa 2004.
27. Szczubiał M., Dądrowski R., Śmiech A., Łopuszyński W., Wawron W., Kusy R., Iwanicki R.: Przydatność wybranych czynników klinicznych w prognozowaniu przebiegu nowotworów złośliwych gruczołu sutkowego u suk. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 160-164.
28. Tecler F., Spiranelli E., Bonfanti U., Ceron J. J., Paltrinieri S.: Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *J. Vet. Intern. Med.* 2005, 19, 865-870.
29. Thougaard A. V., Hellmen E., Pedersen H. D., Jensen A. L.: Correlation between α -1 acid glycoprotein and total sialic acid in serum from dogs with tumours. *J. Vet. Med. A* 1999, 46, 231-237.
30. Yamamoto S., Miyaji S., Ashida Y., Otabe K., Momotani E., Rikihisa Y.: Preparation of anti-canine serum amyloid A (SAA) serum and purification of SAA from canine high-density lipoprotein. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994, 41, 41-53.
31. Yamamoto S., Shida T., Honda M., Ashida Y., Rikihisa Y., Odakura S., Hayashi S., Nomura M., Isayama Y.: Serum C-reactive protein and immune responses in dogs inoculated with Bordetella bronchiseptica (phase I cells). *Vet. Res. Commun.* 1994, 18, 347-357.
32. Yamamoto S., Shida T., Miyaji S., Santsuka H., Fujise H., Mukawa K., Furukawa E., Nagae T., Naiki M.: Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Vet. Res. Commun.* 1993, 17, 85-93.