

**Untersuchungen zu Survivin und Ki-67 als
Serumtumormarker bei Hunden mit malignen
Tumorerkrankungen**

von Annkathrin Estaller

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**Untersuchungen zu Survivin und Ki-67 als Serumentumormarker
bei Hunden mit malignen Tumorerkrankungen**

von Annkathrin Estaller
aus München

München 2023

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Angefertigt in der Kleintierklinik Göttingen des Tierärztlichen Institutes
der Georg-August-Universität Göttingen
Mentor: Prof. Dr. Stephan Neumann

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Joachim C. Manning

Tag der Promotion: 22. Juli 2023

Meiner Familie ♥

Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden als Vorträge auf folgenden Fachtagungen präsentiert:

A. Estaller (2020)

Titel: *“Untersuchungen zu Survivin als Serumentumormarker beim Hund“*

Vortrag auf der 28. Jahrestagung der Fachgruppe “Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik (InnLab)“ der DVG

Gießen: 31.01. - 01.02.2020

A. Estaller (2020)

Titel: *“Untersuchungen zu Survivin als Serummarker bei Hunden mit Tumorerkrankungen“*

Vortrag auf dem DVG-Vet-Congress 2020

Online-Kongress mit Live-Streaming: 15.10. - 17.10.2020

A. Estaller (2021)

Titel: *„Untersuchungen zu Ki-67 als Serummarker bei Hunden mit Tumorerkrankungen“*

Vortrag auf der 29. Jahrestagung der Fachgruppe “Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik (InnLab)“ der DVG

Online-Kongress mit Live-Streaming: 29.01. - 30.01.2021

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------------|--|-----------|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | LITERATURÜBERSICHT | 3 |
| 1. | Biomarker | 3 |
| 1.1 | Onkofetale Antigene..... | 3 |
| 1.2 | Tumorassoziierte Antigene..... | 4 |
| 1.3 | Anti-Tumor Antigene als Reaktion des Organismus | 6 |
| 1.4 | Organspezifische Tumor-Antigene..... | 7 |
| 1.5 | Bestimmung von Biomarkern | 8 |
| 2. | Survivin | 12 |
| 2.1 | Struktur von Survivin | 12 |
| 2.2 | Funktion von Survivin..... | 12 |
| 2.3 | Survivin im Zusammenhang mit nicht-tumorösen Erkrankungen in der Humanmedizin | 14 |
| 2.4 | Survivin im Zusammenhang mit nicht-tumorösen Erkrankungen in der Veterinärmedizin..... | 16 |
| 2.5 | Survivin im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen in der Humanmedizin..... | 16 |
| 2.6 | Survivin im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen in der Veterinärmedizin | 17 |
| 3. | Ki-67 | 19 |
| 3.1 | Struktur von Ki-67 | 19 |
| 3.2 | Funktion von Ki-67 | 20 |
| 3.3 | Verwendung von Ki-67 in der Tumordiagnostik..... | 20 |
| 3.4 | Ki-67 im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen in der Humanmedizin..... | 21 |
| 3.5 | Ki-67 im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen in der Veterinärmedizin | 22 |
| 3.6 | Ki-67 im Zusammenhang mit nicht-tumorösen Erkrankungen in der Humanmedizin | 22 |
| 3.7 | Ki-67 im Zusammenhang mit nicht-tumorösen Erkrankungen in der Veterinärmedizin..... | 23 |
| 4. | Entzündungszellen im Zusammenhang mit der Tumormikroumgebung und den Tumormarkern Survivin und Ki-67 | 24 |
| III. | PUBLIKATION 1 | 27 |
| 1. | <i>Letter of acceptance</i> zu dem Artikel " <i>Investigation of serum survivin in dogs suffering from cancer: a multicenter study</i> " | 27 |
| 2. | Artikel 1: " <i>Investigation of serum survivin in dogs suffering from cancer: a multicenter study</i> " | 29 |

| | |
|--|-----------|
| IV. PUBLIKATION 2 | 43 |
| 1. <i>Letter of acceptance</i> zu dem Artikel " <i>Utility of Serum Ki-67 as a Marker for Malignancy in Dogs</i> " | 43 |
| 2. Artikel 2: " <i>Utility of Serum Ki-67 as a Marker for Malignancy in Dogs</i> " | 45 |
| V. DISKUSSION | 65 |
| VI. ZUSAMMENFASSUNG | 75 |
| VII. SUMMARY | 77 |
| VIII. LITERATURVERZEICHNIS | 79 |
| IX. DANKSAGUNG | 89 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------|--|
| AFP | Alpha-Fetoprotein |
| AUC | Area under the curve |
| Bax | Bcl-2-associated X protein |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 |
| BID | BH3 interacting domain death agonist |
| BIR | Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat |
| BIRC5 | Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 |
| BRCA | Breast Cancer gene |
| bzw. | beziehungsweise |
| CA | Cancer-Antigen |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CEA | Carcinoembryonales Antigen |
| CgA | Chromogranin A |
| CPC | Chromosomal Passenger Complex |
| CTC | Zirkulierende Tumorzellen |
| CYFRA 21-1 | Cytokeratin Fragment 19 |
| DCA | Dichloroacetic acid |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DR3 | Death-Rezeptor 3 |
| EDTA | Ethyldiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| et al. | et alii/ et aliae (= und andere) |
| Fig. | Figure (Abbildung) |
| g | Beschleunigungsgröße der Zentrifuge |
| h | Hour |
| hCG | Humanes Choriongonadotropin |
| HE4 | Humanes Epididymales Protein 4 |
| HER2 | Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 |

| | |
|------------|---|
| HIES | Hydroxyindolessigsäure |
| HRP | Horseradish Peroxidase |
| IAP | Inhibitor of apoptosis |
| IU/l | International units per litre |
| JVS | Journal of Veterinary Science |
| kb | Kilobase |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| L | Liter |
| Li-Heparin | Lithium-Heparin |
| LR | Linker Region |
| mdpi | Multidisciplinary Digital Publishing Institute |
| MFSD1 | Major facilitator superfamily domain-containing protein 1 |
| mg | Milligramm |
| MKi67 | Marker of proliferation Ki-67 |
| ml | Milliliter |
| m-RNA | Messenger Ribonucleic Acid |
| MTUS1 | Mitochondrialer Tumorsuppressor 1 |
| MUC | Mucin |
| n | Anzahl |
| NCI | National Cancer Institute |
| ng/ml | Nanogramm pro Milliliter |
| NLR | Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio |
| nm | Nanometer |
| ns | Not significant |
| NSE | Neuronenspezifische Enolase |
| O.D. | Optical Density |
| p | Probabilitas (= Wahrscheinlichkeit) |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PECAM-1 | Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1 |
| pg/ml | Picogramm pro Milliliter |

| | |
|-------|---|
| PSA | Prostata-spezifisches Antigen |
| r | Korrelationskoeffizient |
| p53 | Tumorsuppressor p53-Protein |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| RNA | Ribonucleic acid |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| ROC | Receiver Operating Characteristic |
| rs | Korrelationskoeffizient nach Spearman |
| SCC | Squamous Cell Carcinoma |
| SIRS | Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom |
| Tab. | Table/ Tabelle |
| TNFR1 | Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1 |
| TPBG | Trophoblast Glycoprotein |
| u.a. | unter anderem |
| VEGF | Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor |
| WHO | World Health Organization |
| yr | Year |
| z.B. | zum Beispiel |
| % | Prozent |
| µl | Mikroliter |

I. EINLEITUNG

Tumorerkrankungen treten auch in der Veterinärmedizin immer häufiger auf, unter anderem auch, da unsere Haustiere durch die bessere medizinische Versorgung immer älter werden und damit auch die Wahrscheinlichkeit für die Erkrankung an einem Tumorleiden ansteigt. Die Diagnostik einer Tumorerkrankung erfordert meist invasive, komplizierte, zeit- und kostenintensive Methoden. Um die Tumordiagnostik zu vereinfachen werden in der Humanmedizin bereits zahlreiche Tumormarker im Blut untersucht, um Aussagen über das mögliche Vorhandensein von Tumorgewebe, den Verlauf und die Prognose einer Krebserkrankung sowie eine möglichst frühzeitige Erkennung von Rezidiven zu treffen (AMAYO und KURIA, 2009; BORREBAECK, 2017).

Tumormarker können bei Krebserkrankungen in erhöhter Konzentration auftreten, sie werden dabei direkt von den Krebszellen oder vom Körper selbst, als Reaktion auf den Tumor, gebildet. Insbesondere die Anwesenheit messbarer embryonaler Moleküle in einem adulten Organismus weist auf das Vorhandensein von Tumorgewebe hin (VEIGA et al., 2019). Beispiele hierfür sind das Carcinoembryonale Antigen (CEA) oder das Alpha-Fetoprotein (AFP), welche unter physiologischen Bedingungen während der Embryonalentwicklung exprimiert werden und deshalb bei vermehrtem Auftreten in adulten Organismen als Tumormarker in der Humanmedizin verwendet werden (SOLTANI, 1979; THRIVENI et al., 2007; WANG et al., 2014). Die Bestimmung von Tumormarkern ist somit eine wertvolle Untersuchungsmethode in der Onkologie. Sie unterscheidet sich von anderen Untersuchungsmethoden, wie z.B. der Bildgebung und der Histologie, dadurch, dass sie wenig invasiv, praktisch und preisgünstiger durchzuführen ist (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007; BORREBAECK, 2017).

Die Erforschung von Biomarkern ist auch in der Veterinärmedizin zu einem Schwerpunkt geworden und könnte großes Potenzial für die Veterinär-onkologie haben. In der Veterinärmedizin wurden bisher nur wenige diagnostische Tumormarker in der klinischen Praxis eingesetzt (BRYAN, 2016; KASZAK et al., 2018). Es hat sich gezeigt, dass ihr diagnostischer Nutzen aufgrund unzureichender Differenzierung zwischen den verschiedenen untersuchten Gruppen der jeweiligen Studien oft begrenzt ist (FUKUMOTO et al., 2015; BRYAN, 2016). Bösartiges Tumorgewebe unterscheidet sich von anderen Gewebeformen vor allem durch seine höhere Proliferationsrate. Studien zeigen, dass Tumorgewebe in Zellkulturen eine deutlich erhöhte Proliferation im Vergleich zu Kontrollgewebe aufweist

(ROSS et al., 2000; KROEMER und POUYSSEGUR, 2008). Dementsprechend sind Moleküle, die im Zusammenhang mit der Zellproliferation verstärkt exprimiert werden, für die Verwendung als Tumormarker sehr interessant. Im Rahmen dieser Dissertation sollten die beiden Tumormarker, der Proliferationsmarker Ki-67 und der Apoptose-Inhibitor Survivin, daraufhin näher untersucht werden, ob sie für die Erkennung von malignen Tumoren bei Hunden geeignet sind. Die meisten Studien untersuchten das Auftreten von Survivin und Ki-67 in Geweben, was in der Regel invasive Untersuchungsmethoden erfordert (SHOENEMAN et al., 2012; KAVYA et al., 2017). Nur wenige Studien haben die Survivin- und Ki-67-Konzentrationen im Blut von Hunden mit Tumoren untersucht (TANGO et al., 2010; JENA et al., 2019). Um zu diesem Ansatz einen weiteren Beitrag zu leisten wurden in dieser Doktorarbeit die Serumkonzentrationen von Survivin und Ki-67 bei Hunden mit Tumoren mit denen von gesunden Kontrolltieren und Hunden mit nichttumorösen Erkrankungen verglichen, um festzustellen, ob Survivin und Ki-67 als Serumentumormarker bei Hunden eingesetzt werden könnten.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Biomarker

Gemäß der Definition des National Cancer Institutes (NCI) des National Institutes of Health ist ein Biomarker ein biologisches Molekül, das im Blut, in anderen Körperflüssigkeiten oder im Gewebe gefunden wird und ein Anzeichen für einen physiologischen oder pathologischen Prozess oder für einen gewissen Gesundheitszustand oder eine Krankheit ist (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING, 2001; ARONSON und FERNER, 2017). Entsprechend kommen viele verschiedene Moleküle als Biomarker in Frage u.a. Nukleinsäuren, Peptide, Proteine und Metaboliten.

Biomarker können anhand von verschiedenen Kriterien klassifiziert werden, z.B. gemäß ihrer Anwendung. Dabei ergeben sich beispielsweise diagnostische Biomarker, Biomarker für die Stadieneinteilung von Krankheiten, prognostische Biomarker oder Biomarker zur Therapiebegleitung oder -individualisierung und auch in der Arzneimittelentwicklung finden Biomarker Anwendung (DUFFY, 2013). Ein anderes Kriterium zur Klassifizierung von Biomarkern, welches in der folgenden Auflistung einiger beispielhafter molekularer Biomarker angewendet wurde, ist ihr Ursprung bzw. Vorkommen im Organismus (ARONSON und FERNER, 2017).

Um einen Überblick über das große Feld der molekularen Biomarker zu erlangen, werden einige Biomarker ihrer Herkunft und Funktion nach eingeordnet und vorgestellt, wobei der Fokus bei der Auswahl der folgenden Biomarker auf Tumorerkrankungen liegt, um dem Thema dieser Doktorarbeit zu entsprechen.

1.1 Onkofetale Antigene

Onkofetale Antigene werden physiologischerweise nur in der Embryonalentwicklung in messbaren Konzentrationen exprimiert und treten in adulten Organismen nur in Zusammenhang mit Tumorgeschehen oder gewissen Erkrankungen auf (KLOPPEL und CASELITZ, 1987).

Ein bekannter Vertreter ist das Alpha-Fetoprotein (AFP), ein Protein, das unter physiologischen Bedingungen während der Embryonalentwicklung und in geringen Mengen auch in der Leber und im Darm gebildet wird und als fetales Transportmolekül im Blut

fungiert. Es wird in der Medizin u.a. in der Diagnostik von entzündlichen Lebererkrankungen, hepatozellulären Karzinomen, Keimzelltumoren und in der Pränataldiagnostik zur Früherkennung von Hydrozephalus, Neuralrohrdefekten oder anderen Fehlbildungen oder Störungen gemessen (SOLTANI, 1979).

Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) ist ein an der Zelladhäsion beteiligtes Glykoprotein, das unter normalen Umständen nur während der Entwicklung des Magen-Darm-Traktes im Fötus produziert wird. Bei Erwachsenen wird es nur in geringen Konzentrationen von Darm, Leber, Pankreas und Mammagewebe produziert (GAN et al., 2011). Erhöhte Konzentrationen im Serum sind daher hinweisend auf eine mögliche Tumorerkrankung, können aber auch auf einen sehr hohen Tabakkonsum hindeuten (DUFFY, 2001, 2013).

Das Trophoblast Glycoprotein (TPBG) wird eigentlich in Trophoblasten von Föten produziert, kann aber auch in adulten Organismen z.B. bei malignen Tumorerkrankungen des Magen-Darm-Traktes oder der Ovarien und bei der Parkinson Erkrankung vermehrt exprimiert werden (TATARINOV, 1978; PARK et al., 2021).

Ein weiteres Beispiel ist das Immature Laminin Receptor Protein, dessen Expression ebenfalls auf einige embryonale und fötale Zellen beschränkt ist und es taucht bei ausgewachsenen Individuen überwiegend bei bösartigen Tumorerkrankungen wie beispielsweise Mammakarzinomen, Fibrosarkomen und Leukämie auf (BARSOUM und SCHWARZENBERGER, 2014).

Auch Ki-67 und Survivin können in die Kategorie der onkofetalen Antigene eingeteilt werden, auf diese beiden Biomarker wird im weiteren Verlauf dieser Doktorarbeit noch detaillierter eingegangen.

1.2. Tumorassoziierte Antigene

Die Tumoren produzieren auch selbst vermehrt Moleküle, bzw. fördern die Produktion gewisser Moleküle im Organismus, um eine für das Tumorwachstum förderliche Tumormikroumgebung zu schaffen (SOYSAL et al., 2015; KIM und BAE, 2016).

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist ein Wachstumsfaktor mit signifikanter pro-angiogenetischer Aktivität, der die Gefäßpermeabilität erhöht und die Zellmigration fördert. Darüber hinaus besitzt er eine die Mitose induzierende und anti-

apoptotische Wirkung auf die Endothelzellen. Aufgrund dieser Eigenschaften trägt er aktiv dazu bei, sowohl physiologische als auch pathologische angiogenetische Prozesse zu unterstützen (MELINCOVICI et al., 2018).

Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor HER2 begünstigt maligne Prozesse durch eine Steigerung der Zellproliferation und die Hemmung der Apoptose. Eine HER2-Überexprimierung bei Brustkrebs geht mit einer erhöhten Aggressivität, Metastasierungsrate und Resistenz gegen Chemotherapie einher. Brustkrebspatientinnen, bei denen eine HER2-Mutation nachgewiesen wurde, können therapeutisch von HER2-Inhibitoren profitieren. Auch bei anderen Krebsarten, z.B. bei Ösophaguskarzinomen, konnte eine übermäßige Expression von HER2 nachgewiesen werden (DUFFY, 2013; YAN et al., 2015).

Auch das Glykoprotein Cancer-Antigen 15-3 (CA 15-3) weist erhöhte Werte bei Patienten mit Mammakarzinomen auf, darüber hinaus findet man es aber auch bei Ovarial-, Pankreas-, Magen- und Lungenkrebs und bei einigen gutartigen Erkrankungen wie z.B. chronischer Hepatitis, Leberzirrhose, Sarkoidose und Hypothyreose. Seine tumorfördernde Wirkung liegt in der Begünstigung von Tumorinvasion und -metastasen und es blockiert den Zugang von Immunzellen zum Tumorgewebe. Es wird als Tumormarker zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes, des Therapieerfolges und der Prognose verwendet (DUFFY et al., 2010).

Eine weitere Form von Biomarkern sind die zirkulierenden Tumorzellen (CTC), die sich von ihrem jeweiligen Primärtumor separiert haben, über die Lymph- und Blutbahnen in den Rest des Körpers gelangen und das Potential haben, in entfernten Organen zu Metastasen heranzuwachsen. Die Untersuchung von CTCs im Serum wird dementsprechend als „flüssige Biopsie“ bezeichnet und kann Informationen über den Krankheitsverlauf von Brustkrebspatientinnen liefern, wie Metastasierungs- und Rezidivwahrscheinlichkeit, Prognose und Überlebenszeit (BIDARD et al., 2016).

Auch die in dieser Doktorarbeit untersuchten und in den beiden folgenden Abschnitten des Literaturteils noch im Detail beschriebenen Biomarker, der Apoptose-Inhibitor Survivin und der Proliferationsmarker Ki-67, kann man dieser Kategorie der tumorassoziierten Antigene zuordnen.

1.3 Anti-Tumor Antigene als Reaktion des Organismus

Als Reaktion auf ein Tumorgeschehen im Organismus produziert auch der Körper selbst als eine Art Abwehrreaktion gewisse Moleküle, um sich gegen die Tumorerkrankung zu schützen. Dies geschieht unter reger Beteiligung des Immunsystems (HARRIS et al., 2017).

Ein Beispiel hierfür ist das MFSD1 Protein (Major facilitator superfamily domain-containing protein 1), welches in erhöhter Konzentration der Tumormetastasierung entgegenwirkt, indem es in der Tumorzelle die Oberflächenrezeptoren beeinflusst und für eine erhöhte Haftung der Zellen aneinander sorgt, wodurch die Zellmigration negativ beeinflusst wird. Bei Brust-, Magen- und Lungenkrebspatienten mit einem niedrigeren MFSD1-Spiegel zeigte sich eine schlechtere Prognose (ROBLEK et al., 2022).

Tumorzellen präsentieren u.a. aufgrund von Mutationen häufig spezifische, tumorassoziierte Antigene auf den MHC-1-Proteinen auf ihrer Zelloberfläche, welche sie von gesunden Zellen unterscheiden. Erfolgt eine Bindung der spezifischen Zytotoxischen T-Zelle an das präsentierte Antigen und dadurch die Bildung des jeweiligen MHC-I-Peptid-Komplexes, kommt es durch Lyse zur Zerstörung der Tumorzelle. Das Oberflächenprotein CD8⁺ der Zytotoxischen T-Zellen ist demnach ein interessanter Biomarker für die Immuntherapie gegen Krebserkrankungen (RASKOV et al., 2021).

Das am Mitochondrium lokalisierte Protein Mitochondrialer Tumorsuppressor 1 (MTUS1) wirkt dem Tumorwachstum entgegen, indem es vermutlich verschiedene mitochondriale Funktionen wie die Energieversorgung der Zelle, die Produktion reaktiver Sauerstoffzwischenprodukte und deren Interaktion mit anderen Zellzyklusregulatoren steuert (JAKOUBE et al., 2021).

Ein weiteres Antitumorprotein ist p53, welches die Genexpression der Gene für die Regulierung der DNS-Reparatur und der Apoptose beeinflusst. Dadurch kann p53 die Proliferation geschädigter, mutierter und potentiell maligner Zellen aufhalten, indem es den Zellzyklus unterbricht. Bei sehr vielen Tumorerkrankungen treten p53-Mutationen auf, Krebszellen können in diesem Fall nicht mehr durch p53 eliminiert werden, was u.a. ein schlechteres Therapieansprechen zur Folge hat (STIEWE, 2007).

Die beiden brustkrebspezifischen Gene, Breast Cancer genes 1 und 2 (BRCA 1 und BRCA 2) sind Tumorsuppressorgene die Proteine produzieren, welche bei der DNS-Reparatur helfen und damit der Tumorentstehung aktiv entgegenwirken. Mutationen in diesen Genen, die häufig vererbt werden, führen zu einem erhöhten Risiko diverse Krebsarten zu entwickeln, insbesondere Brust- und Ovarialkrebs (PETRUCELLI et al., 1993).

1.4 Organspezifische Tumor-Antigene

Es gibt zum aktuellen Zeitpunkt keine definitiv spezifischen Biomarker für maligne Tumorerkrankungen, da die jeweiligen Tumormarker meist auch bei gesunden Individuen oder gutartigen Erkrankungen auftreten. Auch sind noch keine rein tumorspezifischen Marker bekannt, es gibt allerdings Tumormarker, die weitestgehend organspezifisch sind (DUFFY, 2007).

Dazu gehört das Humane Epididymal Protein 4 (HE4), welches bei epithelialen Ovarialkarzinomen im Vergleich zu normalem Eierstockgewebe deutlich erhöhte Serumkonzentrationen aufweist. Es spielt eine nachgewiesene Rolle in der Tumorentstehung, der Metastasierungsrate, der erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Zytotoxizität als Form der körpereigenen Tumorabwehr (JAMES et al., 2020).

Neben HE4 ist das Cancer-Antigen 125 (CA-125) aktuell der einzige, zugelassene diagnostische Marker für Ovarialkrebs. CA-125 fördert die Tumorzellproliferation und hemmt Immunreaktionen gegen Krebserkrankungen. Es handelt sich um das langkettige Transmembran-Glykoprotein Mucin 16 (MUC16), welches physiologischerweise von Bronchial-, Endometrium-, Ovarial- und Hornhautepithelzellen gebildet wird. Unter pathologischen Bedingungen beschützt es die Tumorzellen des Ovarialkarzinoms vor den Natürlichen Killerzellen. Die Wechselwirkung zwischen MUC16 und dem membranständigen Glykoprotein Mesothelin ermöglicht es Tumorzellen durch gegenseitige Bindung die metastatische Tumormasse zu vergrößern und ermöglicht auch die Anhaftung von Ovarialkarzinomzellen an die Mesothelschleimhaut (DUFFY, 2013; FELDER et al., 2014).

Das sekretorische Glykoprotein prostataspezifisches Antigen (PSA), wird in den Epithelzellen der Prostata unter physiologischen Bedingungen zur Verflüssigung des Prostatasekrets produziert. In der Diagnostik des Prostatakarzinoms kann es aufgrund einer hochregulierten

Produktion durch die entsprechenden Tumorzellen als organspezifischer Tumormarker fungieren und zur Früherkennung im Serum gemessen werden (TOSOIAN und LOEB, 2010).

Spezifisch für zentrale und periphere Neuronen sowie für neuroendokrine Zellen, z.B. in der Lunge, im Magen-Darm-Trakt oder in der Schilddrüse, ist das Glykolyseenzym neuronenspezifische Enolase (NSE). Erhöhte Serumkonzentrationen von NSE treten beispielsweise bei Erkrankungen wie Lungenfibrose, Bronchopneumonie, Lebererkrankungen, Enzephalitis, Hirninfarkten oder bei Tumorerkrankungen wie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, neuroendokrinen Tumoren und Neuroblastomen auf (HAQUE et al., 2018).

1.5 Bestimmung von Biomarkern

Wie oben bereits erwähnt können Biomarker im Blut, in weiteren Körperflüssigkeiten wie u.a. Urin, Liquor und Speichel oder im Gewebe gemessen werden (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING, 2001; ARONSON und FERNER, 2017). Die meisten Biomarker lassen sich sogar auf mehr als eine Art bestimmen. Der folgende Abschnitt stellt eine beispielhafte Aufzählung einiger Biomarker dar, welche im Gewebe, im Urin oder im Blut nachgewiesen werden können.

Bestimmung von Biomarkern im Gewebe

Ein immunhistochemischer Marker für neuroendokrine Tumore ist Chromogranin A (CgA), ein hydrophiles, einkettiges Peptid, das von endokrinen und neuroendokrinen Zellen gebildet wird und als Vorstufe vieler biologisch aktiver Peptide fungiert. Es wird zusammen mit Katecholaminen und Polypeptidhormonen oder zellspezifischen Neurotransmittern gespeichert und nach Bedarf freigesetzt. Aufgrund des erhöhten Vorkommens von Chromogranin A in neuroendokrinen Gewebe und seiner erhöhten Konzentration bei Auftreten von neuroendokrinen Tumoren, stellt es für ebendiese einen recht zuverlässigen Tumormarker dar. Es wird in diesem Zusammenhang auch als Serummarker verwendet (LOUTHAN, 2011).

Das in der Skelettmuskulatur und in der glatten Muskulatur für Stabilität sorgende Intermediärfilament Desmin kann ebenfalls immunhistochemisch bestimmt werden, um maligne myogene Geschehen, wie z.B. das Rhabdomyosarkom oder den Desmoplastischen

klein-rundzelligen Tumor, von nicht tumorösen Erkrankungen, wie z.B. der fortschreitenden Muskeldystrophie, abzugrenzen (MIETTINEN, 2014).

S-100-Proteine bilden eine Gruppe kleiner, kalziumbindender Proteine, deren Mitglieder jeweils in bestimmten Zelltypen vorkommen, was sie für die medizinische Diagnostik interessant macht. In der Immunhistochemie wird S-100 schon seit vielen Jahren für die Diagnostik von Melanomen genutzt, aber es wird auch bei Brustkrebs und einigen anderen Krebsarten übermäßig exprimiert. S-100 kann auch im Serum z.B. zur Bewertung des Krankheitsverlaufes des malignen Melanoms bestimmt werden, oder auch im Liquor, um die Prognose nach einem Schlaganfall oder Schädel-Hirn-Trauma zu bewerten (MIETTINEN, 2014; BRESNICK et al., 2015).

Um die Tumorangiose histopathologisch zu beurteilen, kann z.B. das sogenannte Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1), auch als Cluster of Differentiation 31 (CD31) bezeichnet, immunhistologisch gemessen werden. Es ist physiologischerweise an der Angiogenese und Thrombozytenfunktion beteiligt, aber bei übermäßigem Auftreten kann es auf einen schnell proliferierenden Tumor wie u.a. Hämangioendotheliome, Angiosarkome und Kaposi-Sarkome hinweisen (MIETTINEN, 2014).

Eine Überexprimierung des im vorherigen Abschnitt „Organspezifische Tumor-Antigene“ bereits erwähnten Biomarkers HE4 wird immunhistochemisch häufig zur Diagnostik von Ovarialkarzinomen eingesetzt (JAMES et al., 2020) und auch das in den kommenden Abschnitten thematisierte Ki-67 wird routinemäßig im Gewebe bestimmt.

Bestimmung von Biomarkern im Urin

Auch im Urin können einige Biomarker gemessen werden, was eine sehr wenig invasive, kostengünstige Untersuchungsmethode darstellt, eine Liquid Biopsy (CHEN et al., 2020). Auch hierzu werden im Folgenden einige Beispiele aufgezeigt.

Das schwangerschaftserhaltende Peptidhormon humanes Choriongonadotropin (hCG) hält während der Schwangerschaft das Corpus luteum aufrecht und kann im Urin und im Blut gemessen werden. Es kann Auskunft geben über eine möglicherweise bestehende Schwangerschaft bzw. deren Verlauf, aber auch über potenziell vorliegende

Krebserkrankungen wie z.B. Ovarial-, Bronchial- oder Nierenzellkarzinome (DUFFY, 2013; SZCZERBA et al., 2016).

Metanephrine sind hormonell unwirksame Abbauprodukte von Adrenalin und Noradrenalin, die in erhöhten Konzentrationen im Urin oder im Blutplasma als Tumormarker für das Phäochromozytom eingesetzt werden (LENDERS et al., 2002).

Ein weiterer Tumormarker im Urin ist die Hydroxyindolessigsäure (5-HIES). Dabei handelt es sich um ein Stoffwechselprodukt des Serotonins, welches bei Karzinoiden, die von den enterochromaffinen Zellen des Dünndarmes ausgehen, in großen Mengen freigesetzt wird. Dieses kann auch bei verminderter Nierenfunktion und nach der Einnahme bestimmter Medikamente oder Nahrungsmittel erhöht sein (KEMA et al., 1992; BURKS und BAO, 2016).

Bestimmung von Biomarkern im Blut

Die Messung von Biomarkern im Blut ist ebenfalls einfach durchführbar, im Vergleich zur Untersuchung von Gewebeproben kostengünstiger und weniger invasiv, was sie zu einem gefragten Screeningtool für die Forschung und Diagnostik macht (CROWLEY et al., 2013). Einige Biomarker, die im Serum bestimmt werden können, werden im folgenden Abschnitt kurz vorgestellt.

Das Cytokeratin-Fragment 19 (CYFRA 21-1) ist ein Fragment des Zellstrukturproteins Cytokeratin und wird als Serumentumormarker für Erkrankungen der Lunge verwendet, um benigne Lungenerkrankungen von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, insbesondere Plattenepithelkarzinomen, abzugrenzen und die Prognose sowie den Therapieerfolg einzuschätzen (FU et al., 2019).

Ein weiterer Serumentumormarker ist das den Mucinen ähnelnde Glykoprotein Cancer-Antigen 72-4 (CA 72-4), es wird in der Medizin häufig für die Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen wie Magen-, Ovarial-, Ösophagus- und Pankreaskarzinomen eingesetzt (GUADAGNI et al., 1995).

Ebenfalls ein Glykoprotein, das u.a. im Serum als Tumormarker gemessen wird, ist das Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCC), welches in Plattenepithelzellen vorkommt und

dementsprechend für die Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen und auch anderen malignen Tumoren genutzt wird (ZHU, 2022).

Auch das CA 125 ist ein Glykoprotein und wird im Serum häufig in Kombination mit CA 72-4 ebenfalls für die Verlaufskontrolle von Ovarialkarzinomen verwendet (DUFFY, 2013; FELDER et al., 2014).

Die im oberen Abschnitt bereits beschriebene Proteingruppe S-100 kann in erhöhten Konzentrationen im Serum z.B. als Marker für mögliche Gehirnschäden im Zusammenhang mit Herzoperationen vorkommen (ALI et al., 2000).

In den folgenden beiden Abschnitten des Literaturteils dieser Doktorarbeit werden die zwei Biomarker Ki-67 und Survivin ausführlicher vorgestellt. Als potenzielle Serumtumormarker bei Hunden mit Tumoren bilden sie den Hauptfokus der im weiteren Verlauf vorgestellten Untersuchungen.

2. Survivin

Survivin ist ein 1997 von Ambrosini et al. in humanen B-Zell-Lymphomen entdecktes, Apoptose-hemmendes Protein und damit gehört es zur Familie der IAPs (inhibitors of apoptosis). Es wird auch als BIRC5 bezeichnet, dies steht für baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5. Auf der Genebene wird es vom sogenannten BIRC5 Gen codiert (AMBROSINI et al., 1997).

2.1 Struktur von Survivin

Survivin ist das kleinste der IAP-Proteine. Es umfasst 14,7 kb am telomeren Ende von Chromosom 17 und kodiert für das 16,5 kDa Wildtyp-Survivin-Protein mit einer Länge von 142 Aminosäuren. Den Wildtyp eingeschlossen sind aktuell fünf Spleiß-Varianten bekannt, welchen unterschiedliche Funktionen zugesprochen werden (MAHOTKA et al., 2002; CALDAS et al., 2005; LI, 2005). Survivin enthält im Vergleich zu anderen IAPs nur eine einzelne BIR-Domäne (= Baculovirus IAP Repeat), welche durch eine diese stabilisierende, vier Zink-Liganden beinhaltende Zinkfingerdomäne am N-Terminus des Proteins charakterisiert ist. Die Proteinstruktur ist beim Survivin-Monomer neben der BIR-Domäne durch drei α -Helices und ein dreisträngiges β -Faltblatt charakterisiert. Zwei Survivin-Monomere bilden gemeinsam über Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kräfte das charakteristische bow-tieshaped-Dimer, welches dem Survivin-Protein vermutlich eine einzigartige Adaptorfunktion verleiht (CHANTALAT et al., 2000; VERDECIA et al., 2000).

2.2 Funktion von Survivin

Survivin ist ein zum größten Teil embryonal exprimiertes Molekül (WHEATLEY und MCNEISH, 2005), das sich funktionell durch die Hemmung der Apoptose und Beeinflussung der Mitose und Zytokinese auszeichnet (ALTIERI und MARCHISIO, 1999; LI et al., 2008; WHEATLEY und ALTIERI, 2019). Der Zusammenhang zwischen der Expression von Survivin und der Hemmung der Apoptose in der fötalen Entwicklung wurde bei Mäuseembryonen nachgewiesen (ADIDA et al., 1998), in adulten Geweben wurde jedoch keine offensichtliche Funktion festgestellt, was durch die sehr niedrigen Serumkonzentrationen bei adulten Mäusen bestätigt wurde (ALTIERI und MARCHISIO,

1999). Die BIR-Domäne des Survivins von Mäusen und Menschen ist sehr ähnlich strukturiert (ALTIERI und MARCHISIO, 1999).

Es wird vermutet, dass der Schlüssel zur Wirkungsweise der IAP-Proteine, einschließlich Survivin, die Apoptose negativ zu beeinflussen, in den jeweiligen BIR-Domänen liegt. Tamm et al. konnte zeigen, dass das Ausschalten der BIR-Domänen die IAPs in ihrer Funktion, für die Apoptose erforderliche Caspasen zu blockieren, beeinträchtigt (TAMM et al., 1998). Die Apoptose, beziehungsweise der programmierte Zelltod, erfolgt, wenn eine Zelle Defekte oder eine unzureichende Funktion aufweist. Sie ist eine Grundvoraussetzung für die morphogenetische Homöostase während der Frühentwicklung und essentieller Bestandteil pathophysiologischer Vorgänge in jedem Lebensstadium eines Organismus (THOMPSON, 1995). Dadurch werden für den Organismus potentiell schädliche Zellen eliminiert, darunter fallen entartete, mutierte oder seneszente Zellen, beschädigte Gameten oder auch autoimmun reaktive Immunzellen.

Man unterscheidet zwischen intrinsischer und extrinsischer Apoptose, abhängig davon, ob intrinsische Faktoren wie z.B. DNS-Schäden und oxidativer Stress den programmierten Zelltod einleiten oder externe Faktoren wie z.B. Röntgenstrahlung, Zytotoxine oder Hitze dafür verantwortlich sind (KASHYAP et al., 2021). Beim intrinsischen apoptotischen Vorgang sorgt der die Apoptose auslösende intrinsische Faktor für eine vermehrte Produktion von proapoptotischen Proteinen, sodass diese gegenüber den antiapoptotischen Proteinen überwiegen.

Als proapoptotische Beispiele sind hier insbesondere Bax und Bcl-2 zu nennen, welche eine erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembranen verursachen, sodass Cytochrom C in das Cytoplasma übertreten kann, welches dann zusammen mit dem Protein Apaf-1 als Bestandteile des Proteinkomplexes Apoptosom die Initiatorcaspase-9 in den Arbeitsmodus versetzt. Diese wiederum aktiviert Effektorcaspasen wie die Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7, welche für den eigentlichen Vorgang der Apoptose verantwortlich sind. Je nachdem, welche Caspasen aktiviert werden, erfolgt ein Abbau verschiedener Zellorganellen oder eine Aktivierung von Enzymen, welche für den Abbau des Zytoskeletts der Zelle und der DNS zuständig sind. Mittels Phagozytose findet dann ein Abbau der zersetzten Zellbestandteile durch Makrophagen statt.

Die extrinsische Apoptose wird durch die Interaktion externer Faktoren zusammen mit den Tumornekrosefaktoren Fas-, TNFR1- und DR3-Rezeptoren auf der Zellmembran ausgelöst,

was in einer Kettenreaktion innerhalb der Zelle resultiert bis hin zur Aktivierung der Initiatorcaspasen Caspase-8 und Caspase-10. Caspase-8 wiederum spaltet Bid, welches in seiner aktiven Form an den Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrom C bedingt. Dies wiederum führt auch wieder dazu, dass Effektorcaspasen wie Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7 in Aktion treten und ihre Funktion, in der Zelle Proteine und Zellorganellen zu spalten und abzubauen und damit die eigentliche Apoptose durchzuführen, erfüllen. Wiederum erfolgt dann mittels Phagozytose der Abbau der zersetzten Zellbestandteile durch Makrophagen (KASHYAP et al., 2021). Die exakte funktionelle Art und Weise, mit welcher die IAPs auf molekularer Ebene die Apoptose inhibieren, ist noch nicht bekannt, da IAPs offenbar über mehrere Mechanismen den programmierten Zelltod beeinflussen können (DEVERAUX et al., 1998; O'RIORDAN et al., 2008).

Survivin scheint wie andere Proteine der IAP-Familie ebenfalls spezifisch durch direkte oder indirekte Bindung der BIR-Domäne an die terminalen Effektorcaspasen Caspase-3 und Caspase-7 zu binden und damit die Umwandlung von Procaspasen in ihre aktive Form zu inhibieren. Dadurch hemmt Survivin die Caspase-Aktivität und damit die Apoptose (TAMM et al., 1998; SHIN et al., 2001). Es gibt Hinweise, dass Survivin zudem den durch Bax oder Fas induzierten Zelltod inhibiert und auch die Initiatorcaspase-9 inaktiviert (TAMM et al., 1998; CHANDELE et al., 2004). Survivin scheint jedoch nicht an die Initiatorcaspase-8 zu binden (TAMM et al., 1998). Survivin spielt zudem eine essentielle Rolle in der Zellteilung. Im Jahr 1998 wurde erstmals beobachtet, dass die Survivin-Expression in der Zelle während der G₁- zur S-Phase ansteigt und in der G₂- und M-Phase hohe Konzentrationen erreicht. Im Zellkern tritt Survivin während der Mitose mit den Mikrotubuli in Verbindung und sorgt als Monomer für die Stabilisierung des Chromosomalen Passenger Complexes (CPC), welcher in der Metaphase der Mitose an die Zentromere der Chromosomen andockt und über die Spindelfasern die richtige Trennung der Schwesterchromatiden und damit die korrekte Zellteilung aufeinander abstimmt (LI et al., 1998).

2.3 Survivin im Zusammenhang mit nicht-tumorösen Erkrankungen in der Humanmedizin

Survivin wird in der Forschung und Medizin hauptsächlich in Verbindung mit Tumorerkrankungen untersucht, es spielt aber auch eine Rolle im Zusammenhang mit vielen verschiedenen, nicht-tumorösen Erkrankungen. Survivin begünstigt die Antigenpräsentation,

sowie die Erhaltung von autoreaktiven Zellen und die Produktion von Autoantikörpern. Dadurch unterstützt es das Voranschreiten von Autoimmunkrankheiten wie rheumatoider Arthritis, Psoriasis, systemischer Sklerose, multipler Sklerose, Myasthenia gravis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Orale Lichen Planus (GRAVINA et al., 2017). Bei der erosiven rheumatoiden Arthritis war die Survivin-Konzentration im Serum gegenüber der nicht-erosiven rheumatoiden Arthritis erhöht (BOKAREWA et al., 2005). Survivin war hier auch ein unabhängiger Indikator dafür, dass sich die Erkrankung nicht in Remission befand (SVENSSON et al., 2010). Patienten mit Multipler Sklerose zeigten erhöhte Serum-Survivin-Werte im Vergleich mit einer Kontrollgruppe und ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei Psoriasispatienten und bei Patienten mit Systemischer Sklerose, hier zeigten Betroffene zudem auch erhöhte Werte im Vergleich mit Patienten mit Lupus erythematoses (KOIKE et al., 2010; ALIZADEH-FANALOU et al., 2020; AKPINAR et al., 2022). Im Unterschied dazu wiesen Patienten mit Lupus nephritis erniedrigte Survivin-Konzentrationen im Serum im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe auf. Bei Nierentransplantationspatienten wurden hohe Serum-Survivin-Konzentrationen mit einer besseren Genesung in Verbindung gebracht (DANIELS et al., 2021; LISBOA et al., 2022).

Chronische, nicht-tumoröse Lebererkrankungen zeigten niedrigere, durch PCR bestimmte Survivin-mRNA-Level als hepatozelluläre Karzinome und die Survivin-Level korrelierten hier auch mit Tumorgrad und Gefäßinvasion (MONTORSI et al., 2007). Demgegenüber präsentierte die chronische virale Hepatitis und die Leberzirrhose wiederum erhöhte Serum-Survivin-Konzentrationen im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe (MATTEUCCI et al., 2014). In einer Studie zu Survivin bei Sepsispatienten wurden unterschiedliche Spleiß-Varianten und ihre Konzentrationen untersucht, dabei stellte sich heraus, dass die Spleißvarianten Wildtyp-Survivin, 2B-Survivin und Survivin- Δ Ex3 bei SIRS- und Sepsispatienten deutlich erhöhte Werte aufwiesen, wohingegen die Spleißvariante 3B-Survivin nur in reduziertem Maße vorhanden war (MILIARAKI et al., 2021). In einer etwas älteren Studie zu Sepsis und Survivin zeigten Sepsispatienten im Vergleich zur Gesundheitsgruppe erniedrigte Serum-Survivin-Werte, die Mortalität bei Sepsispatienten mit höheren Survivin-Konzentrationen war geringer und Survivin korrelierte mit einem Rückgang der Entzündung, einem geringeren Schweregrad der Erkrankung und einer günstigeren Prognose (ZHANG et al., 2020).

2.4 Survivin im Zusammenhang mit nicht-tumorösen Erkrankungen in der Veterinärmedizin

Für die Tiermedizin scheint es zum aktuellen Zeitpunkt keine Studien zu geben, die sich im Speziellen mit Zusammenhängen zwischen Survivin und nicht-tumorösen Erkrankungen beschäftigen.

2.5 Survivin im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen in der Humanmedizin

Da der Biomarker Survivin in der Humanmedizin in den meisten Tumorgeweben in hohem Maße exprimiert wird, in ausdifferenzierten Zellen von gesundem adulten Gewebe aber praktisch nicht nachgewiesen werden kann, gilt Survivin als tumorspezifisches Molekül und ist daher für die Tumordiagnostik interessant (VELCULESCU et al., 1999; FUKUDA und PELUS, 2006; SAH et al., 2006).

Seine Expression in neoplastischen Zellen wird durch die Aktivierung von Lymphozyten induziert, was eine Verbindung zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem aufzeigt (KORNACKER et al., 2001). Klinische Studien am Menschen haben hohe Survivin-Konzentrationen mit schlechterem Ansprechen auf zahlreiche Krebstherapien und einer schlechteren Prognose in Zusammenhang gebracht (TRAN et al., 2002; PAIK et al., 2004; MORGILLO et al., 2006).

Eine Gruppe von Patienten mit u.a. Brustkrebs, Darmkrebs und Ovarialkarzinom zeigte mit im Mittel 196,23 pg/ml signifikant höhere Serum-Survivin-Werte als die zu vergleichende Gesundgruppe mit im Mittel 117,73 pg/ml (GUNALDI et al., 2018). In einer anderen Studie, in der die Tumorgruppe ausschließlich Patienten mit Darmkrebs beinhaltete, wurde bei 38,2% der Darmkrebspatienten Survivin im Serum nachgewiesen, aber auch bei 81,8% der Menschen in der Gesundgruppe, sodass Serum-Survivin für die Diagnostik von Darmkrebs eher ungeeignet zu sein scheint (JAKUBOWSKA et al., 2016). Ovarialkarzinome, in wiederum einer anderen Studie für sich betrachtet, zeigten im Serum höhere Survivin-Konzentrationen als die zu vergleichenden gutartigen epithelialen Ovarialtumoren. Survivin korrelierte bei den Ovarialkarzinomen zudem positiv mit dem Alter, fortgeschrittenem Stadium und geringerem krankheitsfreien Überleben (NO et al., 2011).

Brustkrebspatientinnen haben im Vergleich zu ihrer jeweiligen Gesundgruppe ebenfalls erhöhte Serum-Survivin-Werte und Survivin-exprimierende Brustkrebszellen werden in

signifikantem Ausmaß mit einigen klinisch-pathologischen Charakteristika wie Blutgefäßinfiltration, histologischem Tumorgrad, Tumorgröße und Status der regionären Lymphknoten in Verbindung gebracht (YIE et al., 2006; KHAN et al., 2014). Bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen wurden in einer anderen Studie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe keine signifikant abweichenden Serum-Survivin-Werte festgestellt, aber ein Absinken der Survivin-Konzentration nach einer Chemotherapie konnte als Indikator für ein Ansprechen auf die Therapie dienen, nicht aber für das Überleben (DERIN et al., 2008). Magenkarzinompatienten zeigten mit einem medianen Survivin-Level von 147 IU/L (4,4 - 4936) ebenfalls signifikant höhere Werte als die zu vergleichende Kontrollgruppe mit 26 IU/L (3,8 - 1430) (BOZKAYA et al., 2018). Die signifikant höheren Serum-Survivin-Konzentrationen im Vergleich zur Gesundheitsgruppe wurden bei duktalem Adenokarzinom des Pankreas zudem mit perineuraler Streuung, Metastasierung in regionäre Lymphknoten, Zelldifferenzierung und Wiederauftreten des Tumors assoziiert (DONG et al., 2015). Auch bei Blasenkarzinomen und Nierenzellkarzinomen ist Survivin im Serum signifikant erhöht gegenüber einer Gesundheitsgruppe, in dieser Studie konnten mittels ELISA aber auch im Urin bei den Tumorpatienten signifikant erhöhte Survivin-Level gemessen werden, was in einer früheren Studie bei Brustkrebspatientinnen nicht gelungen ist (GUNEY et al., 2006; CHEN et al., 2018).

Diese Aufzählung dient dazu, einen kleinen Überblick über die bisherigen zahlreichen Untersuchungen zu Survivin bei malignen Tumoren zu verschaffen und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

2.6 Survivin im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen in der Veterinärmedizin

In der Tiermedizin wurde Survivin bei Tumorerkrankungen bisher hauptsächlich im Gewebe untersucht, es gibt aber auch schon vereinzelt Untersuchungen zu Survivin im Serum bei caninen Tumorerkrankungen. Dementsprechend wurden in einer Studie mit Hunden Autoantikörper gegen Survivin mittels ELISA im Serum bei 27,1% der Hunde in der Tumorgruppe mit verschiedenen Tumoren, insbesondere caninen Mammatumoren, Plattenepithelkarzinomen und Melanomen, gemessen und auch vereinzelt bei den nicht-tumorös erkrankten Hunden (12%) (TANGO et al., 2010). Eine weitere Studie hat die Serum-Survivin-Konzentrationen bei Hündinnen mit caninen Mammatumoren (110,02 +/- 9,77pg/ml) gemessen, welche signifikant höher im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit

gesunden Hunden (30,28 +/- 2,99pg/ml) war, bei einer Spezifität von 95% und einer Sensitivität von 73,33% (JENA et al., 2019).

Mittels Immunhistochemie wurde Survivin beispielsweise bei verschiedenen Subtypen des caninen Lymphoms und caninen Mammatumoren nachgewiesen (WIMMERSHOFF et al., 2010; BONGIOVANNI et al., 2015; SOKOLOWSKA et al., 2015). Bei verschiedenen kutanen und subkutanen Tumoren bei Hunden wurde eine signifikant höhere Survivin-Expression bei den malignen Tumoren im Vergleich zu den benignen Tumoren gemessen. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei einer Studie verzeichnet, die bei malignen Prostatakarzinomen des Hundes signifikant häufiger eine Survivin-Expression im Vergleich zu gutartigen Prostatahyperplasien des Hundes nachweisen konnte (KAVYA et al., 2017; BONGIOVANNI et al., 2019). Auch bei Plattenepithelkarzinomen bei Hunden ließ sich eine vermehrte nukleäre Survivin-Expression messen im Vergleich zu gesunder adulter caniner Epidermis (BONGIOVANNI et al., 2009). Bei Osteosarkomen des Hundes wurde eine verstärkte Survivin-Expression des Tumorgewebes mit einem fortgeschritteneren Stadium, erhöhtem Mitoseindex, sowie einer verkürzten krankheitsfreien Überlebenszeit assoziiert (SHOENEMAN et al., 2012).

3. Ki-67

Das Tumor-Antigen Ki-67, auch Antigen Ki-67 oder MKi67 (Marker of Proliferation Ki-67) genannt, wurde erstmals 1983 bei der Immunisierung von Mäusen mit Kernen der Hodgkin-Lymphomzelllinie L428 entdeckt und nach seinem Fundort Kiel und der Nummer des Originalklons auf einer 96-well Platte benannt (GERDES et al., 1983; SCHOLZEN und GERDES, 2000).

3.1 Struktur von Ki-67

Auf der Proteinebene sind zwei Ki-67-Protein-Isoformen mit einer jeweiligen Molekularmasse von 320 bzw. 359 kDa bekannt. Sie beinhalten eine große zentrale Region mit 16 sich wiederholenden Elementen, den sogenannten Ki-67 repeats. Auf der Genebene wird der auf dem Chromosom 10q25-ter befindliche Genlocus des Ki-67-Proteins durch 29965 Basenpaare kodiert (DUCHROW et al., 1996). Die Ki-67-Proteinstruktur weist eine hohe elektrische Nettoladung auf, scheint größtenteils entfaltet vorzuliegen und zeigt eine amphiphile Struktur, indem die kurze C-terminale LR-Domäne von Ki-67 eine hohe Anziehungskraft auf das Chromatin ausübt, während die lange N-terminale Domäne eine hohe Anziehungskraft auf das Zytoplasma ausübt. Diese Eigenschaft ist charakteristisch für oberflächenaktive Stoffe wie bei den Tensiden (CUYLEN et al., 2016). Die durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ermittelte zweifarbige Markierung beider Proteinen offenbart eine für polymere Tenside charakteristische ausgedehnte molekulare Struktur mit bürstenähnlichen Anordnungen (CUYLEN et al., 2016). Diese lässt auf eine biomechanische Funktion in der Chromosomenperipherie während der Mitose schließen und legt nahe, dass natürliche Proteine als Tenside bei der Zellkompartimentierung fungieren könnten (CUYLEN et al., 2016). Tenside setzen die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit oder die Grenzflächenspannung zwischen zwei Phasen herab und stabilisieren Dispersionen und Emulsionen durch sterische Hinderung und/oder elektrostatische Abstoßung (ROSEN und KUNJAPPU, 2012). Die Funktionsmechanismen von Ki-67 sind auf molekularer Ebene noch relativ unbekannt, die auffällige Ähnlichkeit mit Tensiden könnte aber hinweisend auf dessen nähere Funktion sein.

3.2 Funktion von Ki-67

Im Zellzyklus ist Ki-67 in allen aktiven Phasen, der G₁-, S-, G₂-Phase und der Mitose, präsent, in ruhenden Zellen, welche sich in der G₀-Phase befinden, kommt es jedoch nicht vor (BRUNO und DARZYNKIEWICZ, 1992). In der Interphase ist Ki-67 ausschließlich im Nukleus lokalisiert und während der Mitose verlagert es sich auf die Oberfläche der Chromosomen (CUYLEN et al., 2016). Es ist dann in der Prophase bis hin zur Telophase auf der Oberfläche der Chromosomen anzutreffen (SAIWAKI et al., 2005). Das Ki-67 Antigen scheint aber nicht zur eigentlichen Struktur der mitotischen Chromosomen beizutragen, die Dezimierung von Ki-67 führt allerdings zu Fehlern bei der Neuordnung des Zellkernes nach Ende der Mitose (BOOTH et al., 2014) und zu fehlerhaftem Interphase Heterochromatin (SOBECKI et al., 2016). In der Studie von Cuylen et al. konnte weiterhin mithilfe von Zeitraffermikroskopie herausgefunden werden, dass die Abwesenheit von Ki-67 während des Zerfalls der Zellkernmembran dazu führte, dass die Chromosomen zu einer einheitlichen kohärenten Chromatinmasse verschmelzen. Ki-67 verlagerte sich erst in einem sehr späten Stadium der Prophase vom Nucleolus zu den Chromosomenarmen und ist demnach nicht für die initiale Auftrennung der Chromosomen und Chromosomenkondensation während der Prophase erforderlich, sondern für die räumliche Trennung nach dem Zerfall der Zellkernmembran. Diese Fähigkeit wird Ki-67 wahrscheinlich durch seine Größe und elektrische Ladung ermöglicht. Ein verminderter räumlicher Abstand zwischen mitotischen Chromosomen durch eine reduzierte Ki-67-Konzentration behinderte einen adäquaten Zugang der Mikrotubuli des Spindelapparates zu den Chromosomen und verzögerte somit das Voranschreiten des Abbaus der Kernmembran bis zum Beginn der Anaphase erheblich (CUYLEN et al., 2016). Neben dem Einfluss, den Ki-67 auf die Zellteilung hat, hat das Antigen auch einen förderlichen Effekt auf die Polymerase-I abhängige ribosomale RNS-Synthese (SCHOLZEN und GERDES, 2000; RAHMANZADEH et al., 2007). Die genaue Wirkweise von Ki-67 ist in diesem Zusammenhang allerdings größtenteils noch nicht weiter bekannt.

3.3 Verwendung von Ki-67 in der Tumordiagnostik

Durch seine enge Assoziation mit der Zellproliferation wird Ki-67 bereits häufig in der Grundlagenforschung und Krebsprognose als Proliferationsmarker eingesetzt (WHITFIELD et al., 2006; YERUSHALMI et al., 2010). Definitionsgemäß ist ein Proliferationsmarker ein

Antigen, das in proliferierenden, also in schnellwachsenden, nicht aber in ruhenden Zellen exprimiert wird und mit monoklonalen Antikörpern darstellbar ist (VAN DIERENDONCK et al., 1989; SCHOLZEN und GERDES, 2000; WHITFIELD et al., 2006). Die selektive Expression nur in aktiven Phasen des Zellzyklus macht das Ki-67-Protein zu einem interessanten Ziel in der Krebsforschung. In der Immunhistochemie wird Ki-67 bereits häufig verwendet, um die sogenannte Wachstumsfraktion einer Zellpopulation zu bestimmen, also die Anzahl proliferierender und folglich Ki-67 positiver Zellen im Zellzyklus von physiologisch reaktivem Gewebe sowie neoplastischem Gewebe (SCHOLZEN und GERDES, 2000; ENDL et al., 2001). Dabei konnte der jeweilige Prozentsatz der Ki-67-positiven Tumorzellen häufig mit dem Therapieerfolg und der Prognose von Krebspatienten in Verbindung gebracht werden (SCHOLZEN und GERDES, 2000; YUAN et al., 2016; KAMMERER-JACQUET et al., 2019).

3.4 Ki-67 im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen in der Humanmedizin

Ki-67 wurde in der Humanmedizin bei einer Vielzahl von malignen Tumoren untersucht, unter anderem bei Prostatakarzinomen, hier ließen durch Nadelbiopsien gewonnene, immunhistochemisch auf Ki-67 untersuchte Prostatakarzinomgewebeprobe eine prognostische Aussage zu (KAMMERER-JACQUET et al., 2019). Ki-67 war bei kolorektalen Karzinomen in höherer Konzentration als in gesundem Gewebe vorhanden (SALEH et al., 2020). Mammakarzinome gehören zu den wenigen malignen Tumoren, bei denen Ki-67 nicht nur im Gewebe, sondern auch im Serum untersucht und in statistisch signifikant höheren Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe gefunden wurde. Bei Brustkrebs wurden die erhöhten Ki-67-Konzentrationen zudem unter anderem mit dem Ansprechen auf Therapien und mit der Prognose assoziiert (YUAN et al., 2016; PENAULT-LLORCA und RADOSEVIC-ROBIN, 2017). Untersucht man Ki-67 bei hepatozellulären Karzinomen, so zeigte sich bei dieser Tumorart häufig auch das umliegende Lebergewebe Ki-67-positiv, was auf eine hohe Proliferationsrate im gesamten erkrankten Organ hinweist (LEI et al., 2021). Auch bei Nierenzellkarzinomen ergab sich eine Korrelation zwischen Ki-67-Expression und Prognose sowie Metastasierungspotential (MENON et al., 2019). Darüber hinaus war die Bestimmung der Wachstumsfraktion eines Tumors mithilfe von Ki-67 auch für die Beurteilung des potentiell aggressiven Verhaltens verschiedener Neoplasien des Nervensystems aufschlussreich (BURGER et al., 1986; XU et al., 2021). Als Tumormarker

im Serum wiederum wurde Ki-67 in der Humanmedizin deutlich weniger untersucht. Es existieren Studien vor allem für Patientinnen mit Brustkrebs, welche zeigen, dass der Ki-67-Serumspiegel bei malignen Tumoren höher ist als bei nicht-malignen Kontrollgruppen (YUAN et al., 2016; RAGAB et al., 2018; REN et al., 2020).

3.5 Ki-67 im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen in der Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin wird Ki-67 ebenfalls routinemäßig in der Immunhistochemie für die Tumordiagnostik eingesetzt. Ki-67 zeigte insbesondere bei Hunden mit Mammatumoren erhöhte Konzentrationen gegenüber der jeweiligen gesunden Kontrollgruppe. Die erhöhten Ki-67-Konzentrationen konnten mit einer erhöhten Metastasierungswahrscheinlichkeit, einer schlechteren Prognose und kürzeren Überlebenszeit in Verbindung gebracht werden (QUEIROGA et al., 2011; NOWAK et al., 2015). Bei Tumorarten wie den Lymphomen (FOURNEL-FLEURY et al., 1997), Mastzelltumoren (SAKAI et al., 2002) und Gliomen (FRASER et al., 2016) konnte Ki-67 zudem bei der Einteilung in Tumorgrade unterstützen. Ein erhöhter Ki-67-Index wurde bei Schilddrüsenkarzinomen (CAMPOS et al., 2014) zusätzlich mit lokaler Invasivität assoziiert. Neoplasien der Perianaldrüsen (PEREIRA et al., 2013) wiesen ebenfalls einen statistisch signifikant erhöhten Ki-67-Index im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, was auch mit potentiellen Rezidiven koinzidierte. Wie auch in der Humanmedizin findet man in der Veterinärmedizin nur vereinzelt Studien, die den Biomarker Ki-67 im Serum untersuchen. In der hiergenannten Studie sind die Serumkonzentrationen von Ki-67 bei Hunden mit Tumoren statistisch signifikant höher als bei der begleitenden Gesundgruppe (NEUMANN et al., 2017).

3.6 Ki-67 im Zusammenhang mit nicht-tumorösen Erkrankungen in der Humanmedizin

Da eine erhöhte Zellproliferation nicht nur bei Tumorgeschehen auftritt, sondern unter anderem auch im Immunstoffwechsel, also auch bei nicht tumorbedingten Krankheitszuständen (ANDREJEVA und RATHMELL, 2017), sind auch diese eventuell interessant für die Verwendung von Ki-67. Die Studienlage ist hierbei weniger ausgeprägt als bei Ki-67 in der Tumordiagnostik, und es scheinen zudem wieder hauptsächlich Studien zu immunhistochemischen Untersuchungen zu Ki-67 zu existieren. Auch hier sind Untersuchungen zu Ki-67 im Serum rar. In einer Studie zeigte sich bei einer Helicobacter

pylori bedingten Gastritis ein erhöhter Ki-67-Index gegenüber der Kontrollgruppe und dieser scheint mit einem erhöhten Risiko für eine spätere Entwicklung von Magenkrebs einherzugehen (KIM et al., 2004). Weiterhin fand sich bei autoimmun bedingten Schilddrüsenerkrankungen wie zum Beispiel Hashimoto-Thyreoiditis ein Zusammenhang zwischen einer deutlichen immunhistochemischen Expression von Ki-67 und einer gewissen Tendenz zur späteren Entwicklung von Schilddrüsentumoren (MSEDDI et al., 2017). Bei entzündlichen Arthropathien wurde Ki-67 im Synovialgewebe überexprimiert und man kann zwischen verschiedenen entzündlichen Arthropathien unterscheiden. Darüber hinaus korreliert die Überexpression mit dem histologischen Schweregrad der Synovitis (PESSLER et al., 2008). Bei anderen Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematoses oder systemischer Sklerodermie spielte Ki-67 im Serum keine große Rolle (MURO et al., 1997).

3.7 Ki-67 im Zusammenhang mit nicht-malignen Erkrankungen in der Veterinärmedizin

In der Tiermedizin gibt es bisher nur wenige Studien zu immunhistochemischen Untersuchungen zu Ki-67 bei nicht-tumorösen Erkrankungen und zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine Literatur zu dem Thema Serumuntersuchungen von Ki-67 im Zusammenhang mit nicht-tumorösen Erkrankungen.

Mittels Immunfluoreszenz konnte im Gewebe bei chronisch entzündlicher Enteropathie Ki-67 in der Lamina propria des Dünndarms im Vergleich zur Gesundgruppe eine signifikante Erhöhung verzeichnet werden (KARLOVITS et al., 2020). Bei Hündinnen mit Pyometra wird Ki-67 vermehrt im entzündlichen Gewebe exprimiert (VEIGA et al., 2017).

4. Entzündungszellen im Zusammenhang mit der Tumormikroumgebung und Survivin und Ki-67

Die Tumorentwicklung und -progression wird von vielen Faktoren beeinflusst, darunter Tumormarker und Entzündungszellen, die eine wesentliche Rolle spielen und sich auch gegenseitig beeinflussen. Entzündungszellen wie z.B. Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten, nehmen Einfluss auf das Tumorwachstum und Fortschreiten einer Tumorerkrankung als rekrutierte Bestandteile in der krebsfördernden Mikroumgebung des Tumorgewebes oder indem sie in dieser Umgebung ein anderes Verhalten an den Tag legen als in einem gesunden Organismus (SOYSAL et al., 2015; KIM und BAE, 2016; LISIECKA et al., 2021; SOLAK et al., 2021; ONAGI et al., 2022). Hierzu gehören beispielsweise Monozyten bei Brustkrebs, die durch Chemotaxis in das den Tumor umgebende Gewebe rekrutiert werden. Unter dem Einfluss von Zytokinen und Antigenen differenzieren sich diese zu Tumor-assoziierten Makrophagen, fördern das Tumorwachstum, die Angiogenese und den Gewebeumbau und unterdrücken die adaptive Immunreaktion. Sie begünstigen zudem das Überleben von Tumorzellen, die Entstehung von Metastasen und die Invasion von Tumorzellen in das umliegende Gewebe und in die Blutgefäße. Zahlreiche Studien haben erhöhte Konzentrationen von Tumor-assoziierten Makrophagen mit einer schlechteren Prognose bei Brustkrebs in Verbindung gebracht (TSUTSUI et al., 2005; ZHANG et al., 2013; SOYSAL et al., 2015). Im Unterschied dazu konnten bei Hunden mit Mammatumoren keine erhöhten Monozyten-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden, bei den caninen Mammatumorpatienten trat aber vermehrt Phagozytose durch Monozyten und Neutrophile Granulozyten auf (LISIECKA et al., 2021).

Eine Untergruppe der Lymphozyten, die regulatorischen T-Zellen, unterdrücken dahingegen ein weites Spektrum von anderen Entzündungszellen, um unter physiologischen Bedingungen im Körper ein ausgewogenes Immunsystem aufrechtzuerhalten und u.a.

Autoimmunerkrankungen entgegenzuwirken. Unter pathologischen Bedingungen erfolgt eine Einschränkung des Immunoeditings, welche in einer Hemmung der Immunantwort eines Organismus z.B. auf ein Tumorgeschehen resultiert. Es wird somit eine immunsuppressive Tumor-Mikroumgebung kreiert, die das Voranschreiten eines Tumors fördert. Hohe Konzentrationen bestimmter T-Zellen werden mit einer schlechteren Prognose bei Brustkrebs assoziiert (BOHLING und ALLISON, 2008; OHARA et al., 2009). Auch bei Hunden mit Mammatumoren waren die Lymphozyten-Konzentrationen im Vergleich zu einer

Kontrollgruppe erhöht und die Infiltration von T-Lymphozyten in die Tumormikroumgebung scheint sowohl bei Brustkrebspatientinnen als auch bei Hündinnen mit Mammatumoren von großer Bedeutung zu sein (CARVALHO et al., 2014; LISIECKA et al., 2021).

Auch Neutrophile Granulozyten können im Zusammenhang mit Tumoren als immunsuppressive Zellen fungieren. Sie haben eventuell Einfluss auf die Differenzierung von Makrophagen zu pro- oder anti-entzündlichen Subtypen und auf die Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen zum Entzündungsherd hin. Es wird ihnen zudem eine Schlüsselrolle bei dem malignen Gewebeumbau, der Tumorprogression, der Antitumor-Immunität und der Angiogenese zugeschrieben (MANTOVANI et al., 2011; KIM und BAE, 2016). Setzt man die Neutrophilen zu den Lymphozyten ins Verhältnis, bildet also eine Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio (NLR), kann man diese für die Vorhersage des zukünftigen klinischen Verlaufes von Darmkrebs und Prostatakarzinomen einsetzen (ISHIZUKA et al., 2014; LANGSENLEHNER et al., 2015). Eine höhere NLR bei Patienten mit Nebennierenrindenzarzinom wirkt sich ungünstig auf die Überlebenszeit aus (SOLAK et al., 2021) und eine niedrige NLR zeigte bei Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs ein besseres Ansprechen auf eine bestimmte Behandlung, wohingegen eine hohe NLR und ein hohes Monozyten-Lymphozyten-Verhältnis eine kürzere Überlebenszeit bedeuteten (MYOJIN et al., 2020; SOLAK et al., 2021). Eine andere Studie konnte darstellen, dass die NLR in Kombination mit dem Tumormarker AFP dabei helfen kann, hepatozelluläre Karzinome von anderen, nicht-malignen Lebererkrankungen mit höherer Sensitivität und Spezifität zu differenzieren (HU et al., 2018).

Betrachtet man die in dieser Arbeit behandelten Tumormarker Ki-67 und Survivin jeweils in Wechselbeziehung mit Entzündungszellen, so findet sich eine signifikante Korrelation zwischen der NLR und der immunhistochemisch nachgewiesenen Expression von Ki-67, in Zusammenhang mit dem Pathologiegrad von Gliomen in der Humanmedizin. Der Nachweis beider Marker kann zu einer besseren Vorhersage der Prognose der Gliompatienten beitragen (XU et al., 2021). Bei Patienten mit einem Magenkarzinom, die mit einer spezifischen, neoadjuvanten Chemotherapie behandelt worden sind, hatte immunhistochemisch bestimmtes Ki-67 in Kombination mit dem Thrombozyten-Lymphozyten-Verhältnis eine prädiktive Aussagekraft und sowohl erhöhte Ki-67-Werte als auch ein erhöhtes Thrombozyten-Lymphozyten-Verhältnis wurden unabhängig voneinander mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert (YILMAZ et al., 2021). Es konnte weiter nachgewiesen werden, dass Survivin

selbst deutlich zur Proliferation von T-Lymphozyten beiträgt (ASSADIASL et al., 2018). Angesichts dieser Zusammenhänge rückt die Beziehung zwischen Tumormarkern wie Ki-67 oder Survivin und Entzündungszellen zunehmend in den Mittelpunkt einiger Forschungsansätze, um etwaige Wirkzusammenhänge zu entdecken und die Tumordiagnostik zu verbessern (XU et al., 2021; YILMAZ et al., 2021).

III. PUBLIKATION 1

1. Letter of acceptance zu dem Artikel "Investigation of serum survivin in dogs suffering from cancer: a multicenter study"

Betreff: Manuscript No. [JVS-21-142R1] Letter of decision

Gesendet: 23. August 2021 um 11:25

Von: em.jvetsci.0.75818b.e3f34935@editorialmanager.com **Im Auftrag von JVS**

An: a.estaller@..., sneuman@...

Ref.: Ms. No. **JVS-21-142R1**

Investigation of serum survivin in dogs suffering from cancer: a multicenter study

Journal of Veterinary Science

Dear Prof. Dr. Neumann, dear Ms. Estaller

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Journal of Veterinary Science.

It was accepted on Aug 17, 2021.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Professor Pan Dong Ryu
Editor-in-Chief
Journal of Veterinary Science

2. Artikel 1: “Investigation of serum survivin in dogs suffering from cancer: a multicenter study”

J Vet Sci. 2021 Nov;22(6):e79
<https://doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e79>
 pISSN 1229-845X-eISSN 1976-555X

Journal of Veterinary Science 

Original Article
 Internal Medicine



Investigation of serum survivin in dogs suffering from cancer: a multicenter study

Annkathrin Estaller ¹, Martin Kessler ², Axel Wehrend ³, Frank Gessler ⁴,
 Johannes Hirschberger ⁵, Stephan Neumann ^{1*}

¹Small Animal Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Georg-August University of Göttingen, Göttingen 37077, Germany

²Small Animal Clinic Hofheim, Hofheim am Taunus 65719, Germany

³Clinic of Obstetrics, Gynaecology and Andrology of Large and Small Animals of the Justus-Liebig-University Giessen, Giessen 35392, Germany

⁴Miprolab GmbH, Göttingen 37079, Germany

⁵Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University of Munich, Munich 80539, Germany

 OPEN ACCESS

Received: May 12, 2021
 Revised: Jul 25, 2021
 Accepted: Aug 24, 2021
 Published online: Sep 9, 2021

*Corresponding author:

Stephan Neumann
 Small Animal Clinic, Institute of Veterinary
 Medicine, Georg-August University of
 Göttingen, Burckhardtweg 2, Göttingen 37077,
 Germany.
 E-mail: sneuman@gwdg.de

© 2021 The Korean Society of Veterinary
 Science
 This is an Open Access article distributed
 under the terms of the Creative Commons
 Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>)
 which permits unrestricted non-commercial
 use, distribution, and reproduction in any
 medium, provided the original work is properly
 cited.

ORCID iDs

Annkathrin Estaller 
<https://orcid.org/0000-0003-0490-4819>
 Martin Kessler 
<https://orcid.org/0000-0003-2874-029X>
 Axel Wehrend 
<https://orcid.org/0000-0002-3313-4852>
 Frank Gessler 
<https://orcid.org/0000-0003-1917-277X>
 Johannes Hirschberger 
<https://orcid.org/0000-0002-1382-6114>
 Stephan Neumann 
<https://orcid.org/0000-0002-8392-0093>

<https://vetsci.org>

ABSTRACT

Background: In contrast to human medicine, only a small number of serum tumor markers are established in veterinary medicine even though they are a non-invasive diagnostic tool.

Objectives: This study examined whether survivin could be suitable as a potential canine serum tumor marker.

Methods: This study measured the serum survivin concentrations of dogs with mammary tumors (n = 33), squamous cell carcinoma (n = 9), soft-tissue sarcoma (n = 18) and multicentric lymphoma (n = 22), using a commercially available, competitive immunoassay kit (BlueGene). The serum survivin concentrations were compared with those of a healthy control group (n = 20) and a control group of dogs with non-neoplastic diseases (n = 17).

Results: Dogs with malignant tumors had serum survivin concentrations between 15 and 5,906 pg/mL (median, 72 pg/mL), those in the healthy group ranged from 7 to 99 pg/mL (median, 21 pg/mL) and those in the group of dogs suffering from non-neoplastic diseases from 15 to 93 pg/mL (median, 42 pg/mL). The differences in the survivin concentrations between the healthy dogs and dogs with malignant tumors and between the dogs with non-neoplastic diseases and those with malignant tumors were significant ($p < 0.001$ and $p = 0.006$, respectively).

Conclusions: The serum survivin concentrations in dogs with malignant tumors, with some exceptions, are higher than in dogs with benign tumors and dogs that do not suffer from a malignancy. Therefore, survivin can provide information on the presence of malignant tumors and be used as a tumor marker in dogs.

Keywords: Biomarker; dog; malignancy; serum; survivin

INTRODUCTION

The existence of embryonic molecules in an adult organism most likely indicates tumor tissue [1]. Therefore, molecules expressed during embryonic development, such as carcinoembryonic antigen (CEA) or alpha-fetoprotein (AFP), are used as serum tumor markers [2-4].

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Author Contributions

Conceptualization: Estaller A, Neumann S;
Data curation: Estaller A; Formal analysis:
Estaller A; Funding acquisition: Neumann
S; Investigation: Estaller A; Methodology:
Estaller A, Neumann S; Project administration:
Hirschberger J, Neumann S; Resources:
Estaller A, Kessler M, Wehrend A, Gessler
F, Neumann S; Supervision: Hirschberger J,
Neumann S; Validation: Estaller A, Neumann
S; Visualization: Estaller A, Neumann S;
Writing - original draft: Estaller A; Writing
- review & editing: Kessler M, Wehrend A,
Gessler F, Hirschberger J, Neumann S.

Another embryonically expressed molecule is survivin [5], which plays an essential role in regulating mitosis and cytokinesis by inhibiting apoptosis [6-8]. The association of survivin expression with the inhibition of apoptosis in fetal development has been demonstrated in mouse embryos [9], but no apparent function has been detected in adult tissues, as corroborated by the very low serum concentrations in adults [7]. Survivin expression in adulthood occurs mainly in the presence of malignant neoplasms because the inhibition of apoptosis is a driving factor in the survival of neoplastic cells [10]. Survivin expression has been investigated in humans, with elevated expression found in various malignancies, such as breast, lung, esophageal, stomach, pancreatic, liver, bladder, and hematological cancers [10,11]. Therefore, survivin is considered a tumor-specific molecule [12]. Its expression in neoplastic cells is induced by lymphocyte activation, revealing a link between tumor cells and the immune system [13]. Clinical studies in humans have linked high survivin concentrations to poor responses to numerous cancer treatments and poor prognosis [14-16].

Compared to humans, only a small number of diagnostic tumor markers have been established in veterinary patients. Research into biomarkers in veterinary medicine has become a focus and could have the potential for veterinary oncology. Most studies examined the appearance of survivin in tissues, which usually requires invasive investigatory methods [17,18]. Only a few studies have evaluated the survivin concentrations in the sera of tumor-bearing dogs [19,20]. Thus, this study compared the serum concentrations of survivin in tumor-bearing dogs with those of healthy controls and dogs with non-tumorous diseases to determine if survivin could serve as a serum tumor marker in dogs.

MATERIALS AND METHODS

Animals

One hundred and nineteen dogs were classified into 7 groups: healthy, non-neoplastic diseased, mammary adenocarcinoma, mammary adenoma, squamous cell carcinoma, soft-tissue sarcoma, and lymphoma. All dogs were diagnosed between January 2018 and December 2019.

The dogs in the healthy control group (n = 20) had been presented to the veterinary clinic for small animals at the University of Göttingen (Germany) for a general examination. The dogs in this group were free of any signs of illness for a minimum of 2 months before the clinical examination and 4 weeks afterward. A complete blood count was performed. All blood work parameters had to be within the laboratory reference interval to be eligible for the control group. All dogs in the control group were subjected to abdominal ultrasonography and thoracic radiography and did not show any signs of disease.

The dogs of the non-neoplastic diseased group (n = 17) were presented to the veterinary clinic for small animals at the University of Göttingen (Germany) because of various diseases. All dogs underwent a clinical examination, diagnostic imaging (thoracic radiography and abdominal ultrasonography), and laboratory work. All dogs had confirmed non-neoplastic systemic diseases.

The dogs in the tumor groups had been presented by their owners to the veterinary clinic for small animals at the University of Göttingen (Germany), the veterinary clinic for small animals in Hofheim (Germany), or the veterinary clinic for gynecology and obstetrics at the

University of Gießen (Germany) because of symptoms caused by their respective tumor-causing diseases. All the dogs underwent the required diagnostic procedures, such as thoracic radiography, abdominal ultrasonography, lymph node evaluation, and laboratory work to confirm their cancer diagnoses and exclude other diseases. The tumor volume was estimated by multiplying the height × width × depth. The histopathological diagnoses were established by Board-certified pathologists based on the incisional or excisional biopsy samples of the respective tumor. The tumor diagnoses were mammary tumor (adenocarcinoma n = 26; adenoma n = 7), squamous cell carcinoma of the skin and mucosa (n = 9), soft-tissue sarcoma (n = 18) of different locations like the skin and the spleen, and multicentric lymphoma (n = 22).

This study also documented which of the tumor group dogs were still alive after an observation period of 1 year after the cancer diagnosis. The experimental procedures were approved by the regional authorities for Consumer Protection and Food Safety Acts in Niedersachsen, Germany (reference No. 33.9-42502-05-17A148).

Blood sample collection and processing

The blood samples used for all measurements were collected from the cephalic veins before any treatment. The serum for survivin measurements was left to clot for 2 h at room temperature. After centrifugation at 1,000 × g for 15 min the serum was pipetted into Eppendorf tubes, frozen, and stored at -80°C until the measurement.

Immunoassay

The survivin concentrations were measured using a commercially available immunoassay kit (Canine Survivin enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA] kit; BlueGene, China [Art. Nr.: E08S0218], competitive enzyme immunoassay technique) with non-diluted serum in duplicate, adhering to the manufacturer's instructions.

Briefly, the serum samples were added to the wells of a precoated 96-well microtiter plate, then covered and incubated for 1 h at 37°C. This was followed by a series of 5 manual washing steps to remove all the unbound antibodies. A solution containing an enzyme-conjugated detection antibody, which binds specifically to the antigen, was applied, followed by another incubation with coverage for approximately 15 min at 37°C. The substrate formed a colored solution when catalyzed by the addition of an acid solution, stopping the antigen-antibody reaction. The absorbances were measured spectrophotometrically in a Magellan optical emission spectrometer at 450 nm. A standard curve was determined using the program CurveExpert Professional (Hyams Development, <https://www.curveexpert.net/>) to calculate the serum survivin concentrations in pg/mL. The detection range of the ELISA in the serum samples, as per the manufacturer, was 25–1,000 pg/mL. The manufacturer reported mean intra- and inter-assay coefficients of variation of 4.4% and 6.6%, respectively.

Histopathology

The histology was performed using routinely embedded paraffin sections after hematoxylin and eosin staining. The diagnoses were made by board-certified pathologists.

Cell culture

For this procedure, 2 tumor cell lines were investigated: CMT-U309 (mesenchymal tumor; Eva Hellmén, Universität Uppsala) and P114 (anaplastic carcinoma; Gerard Rutteman, Universität Utrecht). The tumor cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium (Biochrom/

Millipore, Bestell-Nr. FG0445) over 144 h. Dichloroacetic acid (DCA), an apoptosis inducer, was added to a one-cell culture preparation. As a negative control, a second preparation was free of additives. As a second positive control, cisplatin, a cancer medication that interferes with the growth of cancer cells, was added to a third preparation. Survivin was measured in the supernatants of all the preparations after 24, 48, 72, 120, and 144 h of incubation, and its concentration in each cell was calculated.

Leucocyte correlations

The link between survivin expression and leucocytes was investigated by calculating the following: the ratio between the serum survivin concentrations and the leucocyte counts, the counts of the different leucocyte subtypes, and the ratio between neutrophils and lymphocytes.

Statistical analysis

The statistical evaluation was performed using Prism 8 (GraphPad Software, USA). The data were tested for normal distributions using the Pearson's, the Shapiro-Wilk and the Kolmogorov-Smirnov tests. The non-normally distributed data were compared using the Mann-Whitney (2 groups) or the Kruskal-Wallis (multiple groups) tests. Linear regression analyses were performed to analyze the dependency of survivin on the tumor volume. The receiver operation characteristic (ROC) curves were calculated to discriminate healthy dogs from dogs with tumors. A *p* value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

There was no predominance of any breed in the dog population in this study. **Table 1** lists the sex distribution and the age distribution in the different groups. The healthy control group consisted of 20 dogs. Dogs with non-neoplastic diseases (*n* = 17) suffered from hypoadrenocorticism (*n* = 1), chronic renal failure (*n* = 1), an allergy (*n* = 2), gastroenteritis (*n* = 6), cystitis (*n* = 4), and endometritis (*n* = 3). The mammary tumor group consisted of 26 adenocarcinomas and 7 adenomas. Dogs with mixed mammary tumors were not included in this study. The squamous cell sarcoma group consisted of nine dogs, and the tumors originated from the mandible, oral mucosa, tonsils, nasal septum, and toes.

In total, 18 dogs suffered from mesenchymal tumors. The tumors were classified as fibrosarcoma of the hypoderm and mucosa (*n* = 7), hemangiopericytoma of the skin and hypoderm (*n* = 5), and hemangiosarcoma of the spleen (*n* = 6). Finally, the lymphoma group consisted of 22 dogs, mostly suffering from multicentric lymphoma, and in some isolated cases, from gastrointestinal lymphoma and cutaneous lymphoma.

Table 1. Number, sex, and age of all dogs investigated in this study

| Category | No. (f/m) | Age (yr) min | Max | Mean |
|-------------------------|-----------|--------------|------|------|
| Controls | 20 (11/9) | 0.5 | 10 | 4.3 |
| Non-neoplastic | 17 (9/8) | 0.5 | 13 | 6.2 |
| Adenocarcinoma | 26 (26/0) | 6.5 | 15.5 | 11 |
| Adenoma | 7 (7/0) | 5 | 12 | 8.5 |
| Squamous cell carcinoma | 9 (5/4) | 6 | 15 | 10.5 |
| Mesenchymal tumors | 18 (9/9) | 5 | 11.5 | 9.8 |
| Lymphoma | 22 (13/9) | 5 | 14 | 9.2 |

Serum survivin in dogs with cancer

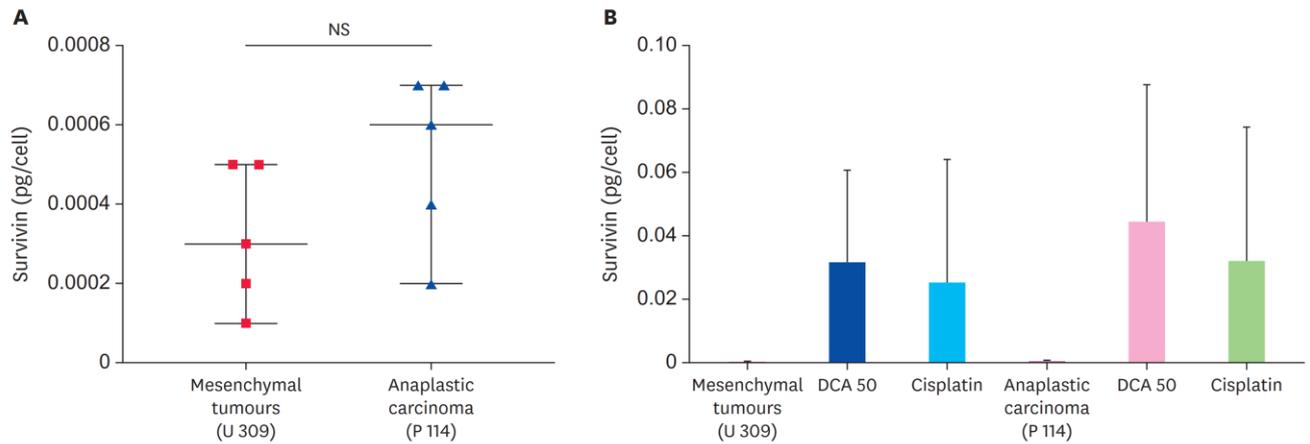


Fig. 1. Survivin concentration of different tumor cell cultures. (A) Survivin concentration in the supernatant was measured, and the concentration per cell was calculated. There is no significant difference in the cell concentration of survivin between the mesenchymal and carcinoma cells ($p = 0.152$). (B) Survivin concentration in different tumor cell cultures in the supernatant 12 h after DCA 50 or cisplatin (10%) addition. The concentration in the supernatant increased significantly after DCA 50 and after cisplatin (10%) exposure. NS, not significant; DCA, dichloroacetic acid.

The survivin concentrations were measured in 2 cell cultures: one of a mesenchymal origin and the other of an epithelial origin, both of which produced survivin. The average survivin concentration per mesenchymal and epithelial cell was 0.0003 pg/cell and 0.006 pg/cell, respectively. There was no significant difference between the 2 cell cultures ($p = 0.152$; **Fig. 1A**). An approximate 10-fold increase in survivin concentration per cell was measured 12 h after adding DCA 50, resulting in average cell concentrations of 0.035 and 0.042 pg/cell for the mesenchymal and epithelial cell lines, respectively (**Fig. 1B**). At 12 h after the addition of cisplatin, the increases in the concentrations of survivin in the supernatants were measured. There were no differences in the survivin concentrations between the DCA and cisplatin groups.

The serum survivin concentrations in the group of healthy dogs ($n = 20$) ranged between 7 and 99 pg/mL (median, 21 pg/mL). The serum survivin concentrations were measured in the healthy group depending on age to exclude the possibility that the increased serum survivin concentrations in dogs with tumor diseases were due to their advanced age. No significant correlation was observed between the survivin concentrations of dogs aged 0.5–5 yr and older dogs aged 9–10 yr ($p = 0.4$; **Fig. 2A**). Furthermore, the serum survivin concentrations were similar regardless of the gender of a dog in this group ($p = 0.92$; **Fig. 2B**). In the group of dogs suffering from non-neoplastic diseases ($n = 17$) the serum survivin concentrations were between 15 and 93 pg/mL (median, 42 pg/mL). A significant difference in the serum survivin concentrations was observed between the healthy dogs and those that suffered from non-neoplastic diseases ($p = 0.018$).

Dogs with malignant tumors ($n = 75$) had serum survivin concentrations ranging from 15 to 5,906 pg/mL (median, 72 pg/mL). The differences in the survivin concentrations between healthy dogs and dogs with malignant tumors and between dogs with non-neoplastic diseases and those with malignant tumors were significant ($p < 0.001$ and $p = 0.006$, respectively; **Fig. 2C**). Dogs with mammary gland adenocarcinoma ($n = 26$) had serum survivin concentrations between 25 and 1,113 pg/mL (median, 104 pg/mL). They differed significantly from the healthy control group and the group of dogs with non-neoplastic diseases ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively). The serum survivin concentrations in dogs with mammary adenoma were between 28 and 76 pg/mL (median, 45 pg/mL) and distributed

Serum survivin in dogs with cancer

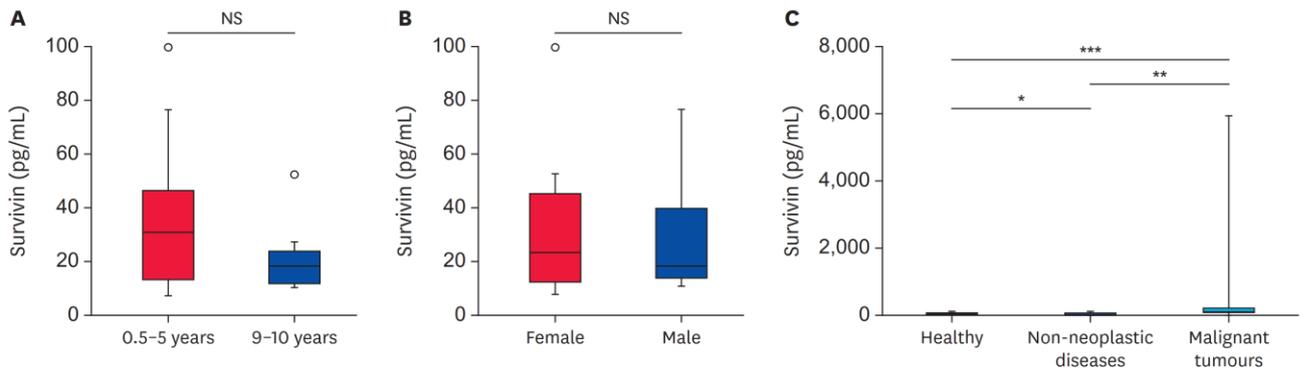


Fig. 2. Serum survivin concentrations in healthy dogs, dogs with non-neoplastic diseases, and dogs with malignant tumors. (A) Comparison of the serum survivin concentrations of healthy dogs depending on their age. The healthy control group ($n = 20$) consisted of 15 dogs aged 0.5–5 yr and 5 dogs aged 9–10 yr, serum survivin concentrations of healthy dogs were between 7 and 99 pg/mL with a median of 21 pg/mL. There was no statistically significant correlation between the survivin concentrations of the dogs aged 0.5–5 yr and older dogs aged 9–10 yr ($p = 0.4$). (B) Comparison of the serum survivin concentrations of healthy dogs depending on the gender of a dog in this group ($p = 0.92$). (C) The serum survivin concentrations of healthy dogs ($n = 20$) were between 7 and 99 pg/mL with a median of 21 pg/mL. Non-neoplastic diseased dogs ($n = 17$) had serum survivin concentrations between 15 and 93 pg/mL with a median of 42 pg/mL. There was a significant difference between healthy dogs and those suffering from non-neoplastic diseases ($p = 0.018$). The dogs with malignant tumors ($n = 75$) had serum survivin concentrations between 15 and 5,906 pg/mL with a median of 72 pg/mL, significantly higher than the healthy group ($p < 0.001$) than the group of dogs with non-neoplastic diseases ($p = 0.006$).

NS, not significant.
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

normally. The comparison between dogs with adenocarcinoma and adenoma revealed a significant difference ($p = 0.03$; **Fig. 3A and B**).

Nine dogs in this study suffered from squamous cell carcinoma with serum survivin concentrations between 17 pg/mL and 658 pg/mL (median, 45 pg/mL). Compared to the healthy controls, there was a significant difference in the serum survivin concentrations ($p = 0.006$). The difference compared with the non-neoplastic diseased dogs was not significant ($p = 0.163$; **Fig. 4**).

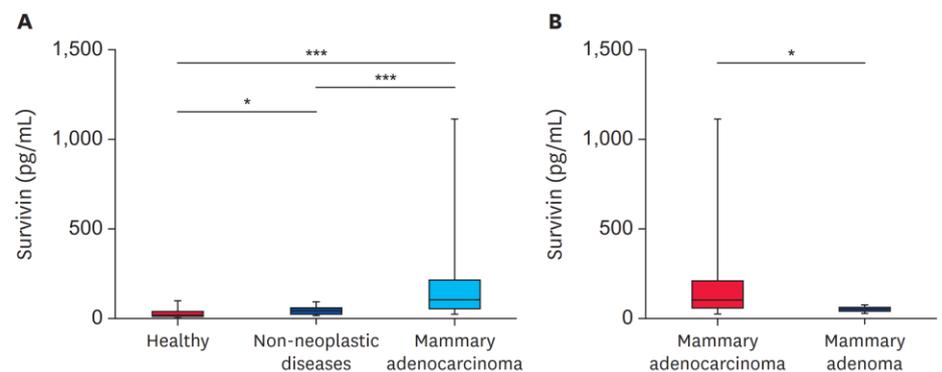


Fig. 3. Serum survivin concentrations in dogs with mammary adenocarcinoma. (A) The serum survivin concentrations in dogs with mammary adenocarcinoma were between 25 and 1113 pg/mL (median, 104 pg/mL) and differ significantly from those of the healthy control group ($p < 0.001$) and those of the non-neoplastic diseased dogs ($p < 0.001$). (B) Comparison of the serum survivin concentrations of dogs with mammary adenocarcinoma and dogs with mammary adenoma. Twenty-six dogs with adenocarcinoma and 17 dogs with adenoma of the mammary gland were included with concentrations between 28 and 76 pg/mL (median, 45 pg/mL). The serum survivin concentrations differ significantly ($p = 0.03$).
* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

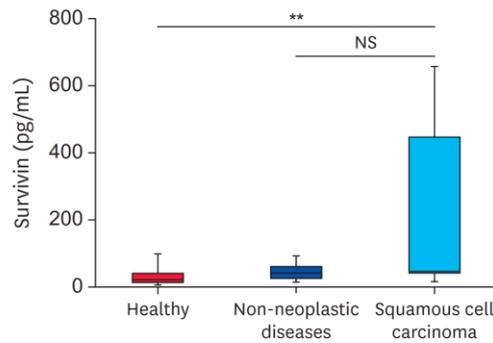


Fig. 4. Comparison of the serum survivin concentrations of healthy dogs, dogs with non-neoplastic diseases, and dogs with squamous cell carcinoma. Nine dogs with squamous cell carcinoma could be included in this study. The survivin concentrations were between 17 and 658 pg/mL (median, 45 pg/mL). They differed significantly compared to the healthy control group ($p = 0.006$), but the levels were similar to the group of dogs with non-neoplastic diseases ($p = 0.163$). NS, not significant. ** $p < 0.01$.

In total, 18 dogs in this study suffered from mesenchymal tumors (soft-tissue sarcoma). The serum survivin concentrations were between 18 and 5,960 pg/mL (median, 93 pg/mL). A significant difference was observed between the dogs with soft tissue sarcoma and the healthy control group and the dogs with non-neoplastic diseases ($p < 0.001$ and $p = 0.018$, respectively; **Fig. 5**). The survivin concentrations in dogs with lymphoma were between 15 and 2,349 pg/mL (median, 38 pg/mL). Compared to the healthy group, dogs with lymphoma had significantly higher serum survivin concentrations ($p = 0.005$), but there was no significant change in concentration compared to dogs with non-neoplastic diseases ($p = 0.46$; **Fig. 6**).

The serum survivin concentrations in the different groups were not distributed normally, except for the group of dogs with mammary adenoma. The serum survivin concentrations between the different groups of veterinary tumor patients did not differ significantly ($p = 0.118$; **Fig. 7**). The tumor volume had no influence on survivin concentrations according to linear regression analysis ($p = 0.85$; $r = 0.0008$; **Fig. 8A**), but there was an association in the 7 dogs suffering from mammary adenoma ($p = 0.022$; $r = 0.78$). The influence of the serum survivin concentrations on the survival time of the canine patients was also examined using

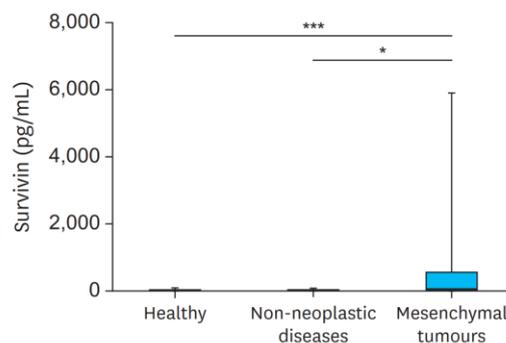


Fig. 5. Comparison of the serum survivin concentrations of healthy dogs, dogs with non-neoplastic diseases, and dogs with mesenchymal tumors. Eighteen dogs in this study suffered from mesenchymal tumors. The serum survivin concentrations were between 18 and 5,960 pg/mL (median, 93 pg/mL). There was a significant difference between the healthy group and the group of dogs with non-neoplastic diseases ($p < 0.001$ and $p = 0.018$). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

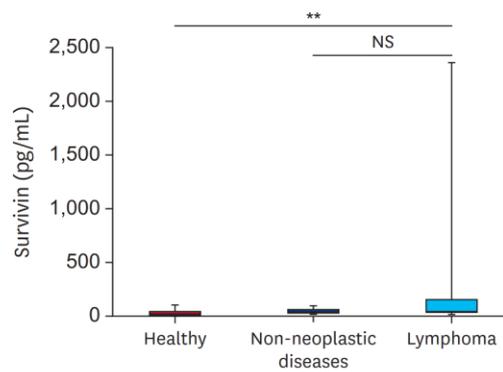


Fig. 6. Comparison of the serum survivin concentrations of healthy dogs, dogs with non-neoplastic diseases, and dogs with lymphoma. The serum survivin concentrations in lymphoma patients were between 15 and 2,364 pg/mL (median, 38 pg/mL). Dogs with lymphoma showed significantly higher serum survivin concentrations than the healthy control group ($p = 0.005$), but there was no significant difference compared to the dogs with non-neoplastic diseases ($p = 0.46$). NS, not significant. ** $p < 0.01$.

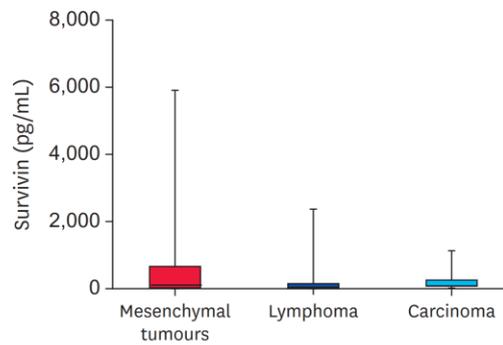


Fig. 7. Comparison of the serum survivin concentrations of dogs with epithelial tumors, mesenchymal tumors, and lymphoma. Comparing all 3 groups of tumors, no significant differences could be found ($p = 0.118$).

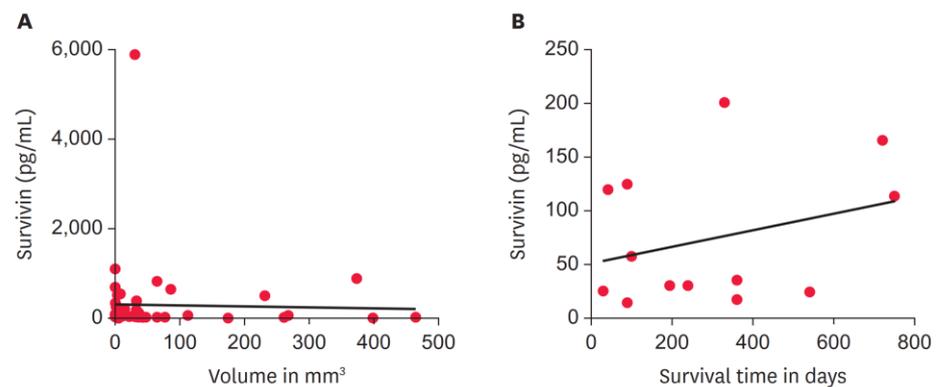


Fig. 8. Linear regression analysis. (A) The influence of the tumor volume (mm^3) on the serum survivin concentrations was measured by linear regression analysis for epithelial and mesenchymal tumors. No significant relationship could be found ($p = 0.85$; $r = 0.0008$). (B) The influence of the serum survivin concentration on the survival time was calculated based on the data of 13 dogs with a linear regression analysis. No significant relation could be found ($p = 0.31$; $r = 0.09$).

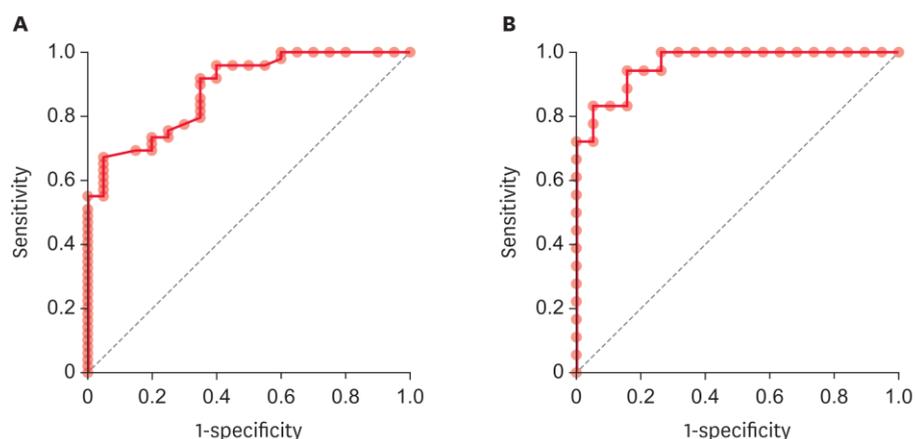


Fig. 9. ROC curve analysis for discriminating healthy dogs from tumor patients. (A) The AUC was 0.88 ($p < 0.001$; 95% CI, 0.80–0.96). Using a cutoff value of 53 pg/mL, the sensitivity and specificity were 67% (CI, 0.53–0.78) and 95% (CI, 0.76–0.99), respectively. (B) The survivin-lymphocyte-ratio revealed an AUC of 0.96 ($p < 0.001$; 95% CI, 0.91–1.0). Using a cutoff value of 36, the sensitivity and specificity was 83% (CI, 0.6–0.94) and 95% (CI, 0.76–0.99), respectively. AUC, area under the curve; CI, confidence interval.

linear regression analysis. No significant correlation was found based on 13 dogs, in which follow up information on the survival time was available ($p = 0.31$; $r = 0.09$; **Fig. 8B**).

Finally, a ROC curve was calculated to discriminate the healthy dogs from those with malignant tumors. The area under the curve (AUC) was 0.88 ($p < 0.001$; 95% confidence interval [CI], 0.80–0.96). Using a cut-off value of 53 pg/mL, the sensitivity and specificity were 67% (CI, 0.53–0.78) and 95% (CI, 0.76–0.99; **Fig. 9A**), respectively. The ROC curve was recalculated using the quotient of survivin and the lymphocyte count, which improved the ability to discriminate healthy dogs from those with malignancy. Using the survivin/lymphocyte ratio, the AUC was 0.96 ($p < 0.001$; 95% CI, 0.91–1.0). With a cut-off value of 36 pg/mL, the sensitivity and specificity were 83% (CI, 0.6–0.94) and 95% (CI, 0.76–0.99; **Fig. 9B**), respectively.

DISCUSSION

Serum tumor markers in human and veterinary medicine play an increasing role because of their advantages, including easy sampling and measurement, as well as rapid results [21,22].

This study focused in survivin because it is a known inhibitor of apoptosis, which is especially important for malignant tumor development [23]. Hence, this study investigated whether survivin provides information on the existence of a tumor in general, its tissue origin, and whether it is a malignant or benign tumor. This study also investigated whether the survivin concentrations may be used as a prognostic parameter by observing the survival time of the canine patients [24,25].

The survivin level was measured in the culture supernatants of epithelial and mesenchymal tumor cell lines. This corroborates the results of other studies, in which survivin production was also found in different tumor cell lines [23]. In these studies, the effects of survivin inhibition on the biological activities of canine histiocytic sarcoma cells were investigated. The addition of DCA, which is an inducer of apoptosis [26], increased the survivin

concentrations in the supernatants dramatically. Elevation of the survivin concentrations may be a consequence of the increased production by tumor cells, triggered by DCA, to protect themselves from apoptosis. The addition of cisplatin, a chemotherapeutic drug that binds to DNA, inhibits its replication, and induces cell necrosis, also led to an increase in the survivin concentrations in the supernatants. This may be a consequence of cell membrane destruction, cell death, and increased production. Furthermore, during the cisplatin treatment, the survivin concentrations decreased, suggesting that the drug sooner or later inhibits survivin expression [27].

All dogs in this study that suffered from a malignancy had measurable serum survivin concentrations. A study examining the diagnostic value of survivin in human breast cancer showed that 95% of the patients had moderate to high serum survivin concentrations of 50–200 pg/mL [28]. A veterinary study in dogs with mammary tumors reported a mean survivin concentration of 109 pg/mL [20].

In the healthy control group, low serum survivin concentrations were also found. The baseline production in adults was also described in humans [29]. Why healthy adult humans and animals produce survivin is unclear, but it is often found in tissues with high proliferation rates, such as mucosa [30]. Survivin is also found in animals suffering from non-neoplastic conditions, including inflammatory and non-inflammatory diseases. The survivin concentrations in humans and dogs with non-neoplastic diseases are significantly lower than those of individuals with tumors [20,31,32]. These results showed significant differences between the survivin concentrations of the malignancies groups compared to those of healthy dogs and dogs with non-neoplastic diseases, which confirmed the earlier findings. The non-significant difference between the dogs with squamous cell carcinoma and dogs with non-neoplastic diseases revealed the limitation of using survivin as a general tumor marker.

Compared with the other commercially available veterinary tumor markers like the plasma protein AFP and the glycoprotein CEA, survivin detects a greater variety of tumors, while AFP occurs at high levels only in hepatocellular carcinoma [33] and multicentric lymphoma [34], and CEA is a promising marker of canine mammary tumors [22].

Histopathology remains the gold standard for differentiating benign and malignant tumors and the malignancy grades [35]. A perfect tumor marker should differentiate between malignant tumors and benign processes [22]. This study only investigated a small group of dogs with adenoma. They had significantly lower serum survivin concentrations than the dogs with malignant tumors. This is in accordance with the results in humans, where the survivin concentrations were significantly higher in patients in the later stages of breast cancer (II–IV) [28]. These results demonstrate that survivin may potentially be a non-invasive tool to differentiate between malignant and benign canine mammary tumors.

Furthermore, in benign mammary adenomas, a correlation was noted between the serum survivin concentrations and the tumor volumes. The lack of a correlation between the serum survivin concentration and tumor volume in malignant mammary tumors may be explained by the different production levels in the tissue caused by different mechanisms, such as an enhanced number of mitotic tumor cells and an increased resistance to apoptosis [8].

According to the present study, survivin cannot be used to differentiate between different types of cancer because the concentrations in the different tumor entities do not differ

significantly. Similar results have been obtained in humans [36], in which high serum survivin concentrations occurred in patients with breast, colon, ovarian, and other cancers, but it was not possible to distinguish between the different tumor entities. To the best of the authors' knowledge, no veterinary studies have compared the survivin concentrations of different tumor entities. From these studies, survivin may be used to indicate the presence of a malignant tumor, but it is unable to differentiate between the tumor entities.

Tumor markers may provide relevant information concerning the outcome of a tumor disease for a patient. The prognostic relevance of survivin has been investigated in humans, associated higher survivin concentrations with a poor prognosis and lower survival rates [1,8,28]. In veterinary medicine, the prognostic relevance of survivin was investigated primarily for osteosarcoma and cutaneous and subcutaneous tissue tumors, showing mixed results depending on the tumor entity [17,18]. Based on the follow-up information in approximately 16% of the dogs in the present study, there was no correlation between the serum survivin concentration and the outcome of the disease. On the other hand, larger studies concerning this question are warranted.

According to the data, serum survivin concentrations above 53 pg/mL were associated with a malignant tumor with a sensitivity of 0.67 and a specificity of 0.95. The ROC curve is used in clinical biochemistry to determine the most appropriate cut-off for tests and distinguish between diseased and healthy patients. In addition, the AUC estimates the usefulness of the test in question [37]. Here, the AUC was calculated to be 0.88. A study examining serum survivin concentrations in human patients with different tumors produced an AUC of 0.66 [36]. In a human study on colorectal cancer, CEA had an AUC of 0.88 [3]. In a recent veterinary study, the ROC curve was also determined for CEA [38].

An increase in the AUC, as well as the sensitivity and specificity of the survivin concentrations was observed by calculating the ratio between survivin and the lymphocyte count, similar to other studies [39]. The basis for these calculations is the observation that inflammatory mediators in the tumor microenvironment, such as lymphocytes and other immune cells, support tumor cell proliferation, angiogenesis, invasion, and progression [40]. This can be used to develop a correlation between the tumor markers and immune cell numbers [39,40].

Some limitations of this study must be addressed. The differences in survivin concentrations among the malignant forms could not be determined because of the small number of dogs in the malignant tumor group. In addition, there were outliers in the lymphoma group (2,364 pg/mL) and in the mesenchymal tumor group (5,906 pg/mL), which cannot be explained. Therefore, further studies using larger numbers of dogs will be needed.

In conclusion, the serum survivin concentrations in dogs with malignant tumors are higher than those of dogs with benign tumors and dogs that do not suffer from any tumor. Using a cut-off value of 53 pg/mL, survivin may be used to differentiate dogs with malignancies from healthy dogs with a sensitivity and specificity of 0.67 and 0.95, respectively. The sensitivity and specificity of the test were increased using a survivin/lymphocyte ratio. On the other hand, survivin could not differentiate between tumor entities nor provide prognostic information.

REFERENCES

1. Veiga GLD, Silva RDMD, Pereira EC, Azzalis LA, Alves BDCA, Gehrke FS, et al. The role of survivin as a biomarker and potential prognostic factor for breast cancer. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2019;65(6):893-901. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
2. Thriveni K, Krishnamoorthy L, Ramaswamy G. Correlation study of Carcino Embryonic Antigen & Cancer Antigen 15.3 in pretreated female breast cancer patients. *Indian J Clin Biochem*. 2007;22(1):57-60. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
3. Wang YR, Yan JX, Wang LN. The diagnostic value of serum carcino-embryonic antigen, alpha fetoprotein and carbohydrate antigen 19-9 for colorectal cancer. *J Cancer Res Ther*. 2014;10 Suppl:307-309. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
4. Soltani K. Alpha-fetoprotein: a review. *J Invest Dermatol*. 1979;72(5):211-213. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
5. Wheatley SP, McNeish IA. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol*. 2005;247:35-88. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
6. Li C, Wu Z, Liu M, Pazgier M, Lu W. Chemically synthesized human survivin does not inhibit caspase-3. *Protein Sci*. 2008;17(9):1624-1629. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
7. Altieri DC, Marchisio PC. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest*. 1999;79(11):1327-1333. [PUBMED](#)
8. Wheatley SP, Altieri DC. Survivin at a glance. *J Cell Sci*. 2019;132(7):jcs223826. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
9. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol*. 1998;152(1):43-49. [PUBMED](#)
10. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(5):1087-1098. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
11. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997;3(8):917-921. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
12. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, et al. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet*. 1999;23(4):387-388. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
13. Kornacker M, Verneris MR, Kornacker B, Scheffold C, Negrin RS. Survivin expression correlates with apoptosis resistance after lymphocyte activation and is found preferentially in memory T cells. *Immunol Lett*. 2001;76(3):169-173. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
14. Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4349-4354. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
15. Morgillo F, Woo JK, Kim ES, Hong WK, Lee HY. Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res*. 2006;66(20):10100-10111. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
16. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817-2826. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
17. Kavaya N, Rao S, Sathyanarayana ML, Narayanaswamy HD, Byregowda SM, Ranganath L, et al. Survivin expression in canine spontaneous cutaneous and subcutaneous tumors and its prognostic importance. *Vet World*. 2017;10(10):1286-1291. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
18. Shoeneman JK, Ehrhart EJ 3rd, Eickhoff JC, Charles JB, Powers BE, Thamm DH. Expression and function of survivin in canine osteosarcoma. *Cancer Res*. 2012;72(1):249-259. [PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

19. Tango Y, Kano R, Maruyama H, Asano K, Tanaka S, Hasegawa A, et al. Detection of autoantibodies against survivin in sera from cancer dogs. *J Vet Med Sci.* 2010;72(7):917-920.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
20. Jena SC, Shrivastava S, Saxena S, Kumar N, Maiti SK, Mishra BP, et al. Surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of BIRC5 biomarker in spontaneously occurring canine mammary tumours. *Sci Rep.* 2019;9(1):13485.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
21. Sharma S. Tumor markers in clinical practice: general principles and guidelines. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2009;30(1):1-8.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
22. Kaszak I, Ruszczak A, Kanafa S, Kacprzak K, Król M, Jurka P. Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Vet Scand.* 2018;60(1):66.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
23. Yamazaki H, Takagi S, Hoshino Y, Hosoya K, Okumura M. Inhibition of survivin influences the biological activities of canine histiocytic sarcoma cell lines. *PLoS One.* 2013;8(11):e79810.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
24. Mobasheri A, Cassidy JP. Biomarkers in veterinary medicine: Towards targeted, individualised therapies for companion animals. *Vet J.* 2010;185(1):1-3.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
25. Henry CJ. Biomarkers in veterinary cancer screening: Applications, limitations and expectations. *Vet J.* 2010;185(1):10-14.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
26. Harting T, Stubbendorff M, Willenbrock S, Wagner S, Schadzek P, Ngezahayo A, et al. The effect of dichloroacetate in canine prostate adenocarcinomas and transitional cell carcinomas *in vitro*. *Int J Oncol.* 2016;49(6):2341-2350.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
27. Chen G. The relationship between the expression of TAM, survivin and the degree of necrosis of the tumor after cisplatin treatment in osteosarcoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(3):490-497.
[PUBMED](#)
28. Khan S, Bennit HF, Turay D, Perez M, Mirshahidi S, Yuan Y, et al. Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. *BMC Cancer.* 2014;14(1):176.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
29. Lodi G, Franchini R, Bez C, Sardella A, Moneghini L, Pellegrini C, et al. Detection of survivin mRNA in healthy oral mucosa, oral leucoplakia and oral cancer. *Oral Dis.* 2010;16(1):61-67.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
30. Lechler P, Wu X, Bernhardt W, Campean V, Gastiger S, Hackenbeck T, et al. The tumor gene survivin is highly expressed in adult renal tubular cells: implications for a pathophysiological role in the kidney. *Am J Pathol.* 2007;171(5):1483-1498.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
31. Gravina G, Wasén C, Garcia-Bonete MJ, Turkila M, Erlandsson MC, Töyrä Silfverswärd S, et al. Survivin in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2017;16(8):845-855.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
32. Montorsi M, Maggioni M, Falleni M, Pellegrini C, Donadon M, Torzilli G, et al. Survivin gene expression in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2007;54(79):2040-2044.
[PUBMED](#)
33. Yamada T, Fujita M, Kitao S, Ashida Y, Nishizono K, Tsuchiya R, et al. Serum alpha-fetoprotein values in dogs with various hepatic diseases. *J Vet Med Sci.* 1999;61(6):657-659.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
34. Lechowski R, Jagielski D, Hoffmann-Jagielska M, Zmudzka M, Winnicka A. Alpha-fetoprotein in canine multicentric lymphoma. *Vet Res Commun.* 2002;26(4):285-296.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
35. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011;48(1):117-131.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
36. Gunaldi M, Isiksacan N, Kocoglu H, Okuturlar Y, Gunaldi O, Topcu TO, et al. The value of serum survivin level in early diagnosis of cancer. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(3):570-573.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
37. Hoo ZH, Candlish J, Teare D. What is an ROC curve? *Emerg Med J.* 2017;34(6):357-359.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

38. Senhorello ILS, Terra EM, Sueiro FAR, Firmo BF, Anai LA, Goloni C, et al. Clinical value of carcinoembryonic antigen in mammary neoplasms of bitches. *Vet Comp Oncol*. 2020;18(3):315-323.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
39. Hu J, Wang N, Yang Y, Ma L, Han R, Zhang W, et al. Diagnostic value of alpha-fetoprotein combined with neutrophil-to-lymphocyte ratio for hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol*. 2018;18(1):186.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
40. Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL. A role for T-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors. *BioMed Res Int*. 2014;2014:130894.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

IV. PUBLIKATION 2

1. Letter of acceptance zu dem Artikel “Utility of Serum Ki-67 as a Marker for Malignancy in Dogs”

Betreff: [Animals] Manuscript ID: animals-1698090; doi: 10.3390/ani12101263. Paper has been published.

Gesendet: 14. Mai 2022 um 09:14

Von: animals@mdpi.com

An: a.estaller@..., m.kessler@..., axel.wehrend@..., j.hirschberger@..., sneuman@...

Dear Authors,

We are pleased to inform you that your article "Utility of Serum Ki-67 as a Marker for Malignancy in Dogs" has been published in *Animals* as part of the Special Issue *Advances in Veterinary Oncology* and is available online:

Abstract: <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/10/1263>

PDF Version: <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/10/1263/pdf>

The meta data of your article, the manuscript files and a publication certificate are available here (only available to corresponding authors after login):

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/c5dbb2a20b4353ac551fa5261b8e35a2

Special Issue:

https://www.mdpi.com/journal/animals/special_issues/advances_in_veterinary_oncology

Please take a moment to check that everything is correct. You can reply to this email if there is a problem. If any errors are noticed, please note that all authors must follow MDPI's policy on updating published papers, found here: <https://www.mdpi.com/ethics#16>.

We would be happy to keep you updated about new issue releases of *Animals*.

Please enter your e-mail address in the box at

<https://www.mdpi.com/journal/animals/toc-alert/> to receive notifications.

After issue release, a version of your paper including the issue cover will be available to download from the article abstract page.

Thank you for choosing *Animals* to publish your work, we look forward to receiving further contributions from your research group in the future.

Kind regards,

MDPI

Postfach, CH - 4020 Basel, Switzerland

Office: St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel, Switzerland

Tel. +41 61 683 77 34

E-mail: website@mdpi.com

<https://www.mdpi.com/>

2. Artikel 2: “Utility of Serum Ki-67 as a Marker for Malignancy in Dogs”



animals



Article

Utility of Serum Ki-67 as a Marker for Malignancy in Dogs

Annkathrin Estaller ¹, Martin Kessler ², Axel Wehrend ³, Johannes Hirschberger ⁴ and Stephan Neumann ^{1,*}

¹ Small Animal Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Georg-August University of Göttingen, 37077 Göttingen, Germany; a.estaller@googlemail.com

² Small Animal Clinic Hofheim, 65719 Hofheim am Taunus, Germany; m.kessler@tierklinik-hofheim.de

³ Clinic of Obstetrics, Gynaecology and Andrology of Large and Small Animals of the Justus-Liebig-University Giessen, 35392 Giessen, Germany; axel.wehrend@vetmed.uni-giessen.de

⁴ Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University of Munich, 80539 Munich, Germany; j.hirschberger@medizinische-kleintierklinik.de

* Correspondence: sneuman@gwdg.de

Simple Summary: Although serum tumour markers offer an uncomplicated, non-invasive examination method and possible therapeutic options, they are still rarely used in veterinary medicine. Our marker of interest, the Ki-67 protein, can only be detected in the active phases of the cell cycle. Therefore, it is a suitable marker for assessing the proliferating cell fraction of an organism and can thus provide information about potentially present, rapid-growing tumour tissue. The purpose of our study was to determine whether Ki-67 could be considered as a possible tumour marker in canine serum for veterinary medicine. We measured serum concentrations of Ki-67 in dogs with various malignant tumours, such as carcinomas, sarcomas, and lymphomas. In the dogs with malignant tumours we determined significantly higher serum Ki-67 concentrations compared with healthy dogs and dogs with non-malignant diseases. No significant difference in serum Ki-67 concentration was observed between the different types of cancer or between benign and malignant mammary tumours. Our investigations also included some inflammatory parameters measured in blood, such as neutrophils, lymphocytes, and monocytes, with mixed results. The results of our study suggest that Ki-67 may be useful as a potential serum tumour marker, providing information about the presence of malignant diseases in a dog.



Citation: Estaller, A.; Kessler, M.; Wehrend, A.; Hirschberger, J.; Neumann, S. Utility of Serum Ki-67 as a Marker for Malignancy in Dogs. *Animals* **2022**, *12*, 1263. <https://doi.org/10.3390/ani12101263>
Academic Editor: Stefano Ciccarelli

Received: 9 April 2022
Accepted: 12 May 2022
Published: 14 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Tumour markers are scarcely used in veterinary medicine, although they are non-invasive, contribute to a faster diagnosis and new therapeutic options. The nuclear protein Ki-67 is absent in G₀-phase but is detectable throughout all active phases of the cell cycle. Consequently, it is used as a marker for the proliferating cell fraction of a cell population and thus could indicate neoplastic tissue present. Our study is designed to show whether Ki-67 can be considered as a potential canine serum tumour marker for veterinary medicine. We measured serum concentrations of Ki-67 in dogs with various malignant tumours (carcinomas (*n* = 35); sarcomas (*n* = 26); lymphomas (*n* = 21)) using a commercially available quantitative sandwich ELISA from mybiosource. Dogs with malignant tumours showed significantly higher serum Ki-67 concentrations compared to healthy dogs (*n* = 19) and non-neoplastic diseased dogs (*n* = 26). No significant difference in serum Ki-67 concentration was detected between carcinoma, sarcoma, and lymphoma, nor between mammary adenocarcinoma and adenoma. In our investigations we also included some inflammatory parameters measured in blood, such as neutrophils, lymphocytes, and monocytes, and gained mixed results. The results of our study suggest that Ki-67 may be useful as a potential serum tumour marker, providing information about the presence of malignancies in a dog.

Keywords: biomarker; cancer immunology; dog; Ki-67; malignancy; serum; veterinary oncology

1. Introduction

The identification of tumour markers is a valuable investigative method in oncology. It differs from other investigative methods, such as imaging and histology, as it is less invasive,

non-complex, and inexpensive to perform [1,2]. In humans, numerous tumour markers have been described that are indicative for the potential presence of tumour tissue, the course and prognosis of the disease, and the detection of recurrences [2,3]. In veterinary medicine, only a few tumour markers are used in clinical practice so far [4,5]. It has been shown that their diagnostic utility is limited due to low sensitivity and specificity [5,6]. Malignant tumour tissue differs from other tissues particularly due to its higher proliferation rate [7,8].

Therefore, molecules that are increasingly expressed in the context of cell proliferation are very appealing for their use as tumour markers.

A promising biomarker strictly associated with cell proliferation is the nuclear Ki-67 protein, found in 1983 in a Hodgkin lymphoma cell line [9,10]. The function of the Ki-67 protein is not yet fully understood [11]. Functioning as a surfactant, it stabilizes the chromosomes after the dismantling of the nuclear membrane during mitosis and thus ensures smooth separation of the chromosomes and successful interaction with the mitotic spindle [12].

As a proliferation marker, Ki-67 protein is absent in resting cells, but can be identified during all active phases of the cell cycle. Throughout the interphase it can solely be detected within the nucleus, although in mitosis the majority of the Ki-67 antigen is relocated onto the surface of the chromosomes [10,11].

During interphase and mitosis, Ki-67 is also found to some extent in the domain of rRNA transcription, where it is considered to play an important role, one reason being that its removal inhibits ribosomal RNA synthesis [11,13,14].

Its selective expression in active phases during the cell cycle makes the Ki-67 protein an interesting target in cancer research. Ki-67 is already widely used in immunohistochemistry to determine the growth fraction of the cell population in question [15,16]. The percentage of Ki-67-positive tumour cells is often correlated with therapeutic success and prognosis of patients suffering from cancer.

Another contributor to tumour growth and progression are inflammatory cells, for example neutrophils, lymphocytes, and monocytes play an important role in the cancer microenvironment of tumour tissue or behave differently in it compared to a healthy organism [17–20].

Consequently, the relationship between tumour markers, such as Ki-67, and inflammatory cells are increasingly becoming the focus of some research approaches to discover possible correlations and improve tumour diagnostics [21,22].

Ki-67 in itself has been investigated in humans in a variety of malignancies, especially prostate and breast carcinomas, brain tumours, nephroblastoma and neuroendocrine neoplasms [16,23–26].

There are significantly less studies investigating Ki-67 as a serum tumour marker, it has been shown however, that women with malignant breast cancer have higher serum Ki-67 levels compared to control groups with non-malignant diseases [27,28].

To the authors' knowledge there are no studies investigating Ki-67 in serum as cancer biomarker in veterinary medicine. In a pilot study, our group evaluated serum Ki-67 levels in a small cohort of 20 dogs with malignant tumours and compared them to serum Ki-67 levels in clinically healthy dogs and dogs with non-malignant diseases [29].

Based on the promising results of this pilot study the aim of the present retrospective study was to investigate serum Ki-67 in larger groups of dogs with malignant tumours, to detect differences in regard to tumour entity, whether there is a correlation between Ki-67 and certain inflammatory cells measured in the blood and whether serum Ki-67 could be a potential pan tumour marker for future screening tests for canine malignancies.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

A total of 140 dogs were examined and classified into four different groups dependent on their health status: healthy, non-neoplastic diseased, benign tumours (mammary adenoma), and malignant tumours (mammary adenocarcinoma, squamous cell carcinoma of the oral and nasal mucosa and the dermis, soft-tissue sarcoma, such as sub-

cutaneous spindle cell sarcoma, oral fibrosarcoma and splenic hemangiosarcoma, and multicentric, cutaneous and gastrointestinal lymphoma). All dogs were diagnosed between January 2018 and December 2019.

The dogs in the healthy control group ($n = 19$) had been brought to the University of Göttingen's veterinary clinic for small animals (Göttingen, Germany) for a general examination. This group of dogs had to be free of any indications of disease for at least two months prior to the clinical assessment and for four weeks thereafter. A complete blood count was performed on the respective patient and all the blood parameters had to be within the laboratory reference interval to be considered for the control group.

The experimental procedures for blood sampling in healthy dogs were approved by the regional authorities for Consumer Protection and Food Safety Acts in Niedersachsen, Germany (reference n° 33.9-42502-05-17A148).

The non-neoplastic diseased dogs ($n = 26$) were brought to the veterinary clinic for small animals at the University of Göttingen (Göttingen, Germany) due to various illnesses. A clinical examination, diagnostic imaging (thoracic radiography and abdominal ultrasonography), and lab work were performed on all dogs. The dogs in this group were each affected by a non-neoplastic systemic disease, such as diabetes, canine idiopathic epilepsy, chronic renal or heart failure, gastroenteritis, endometritis, urinary tract diseases, hepatitis, food poisoning, or a cervical abscess.

The owners admitted the dogs of the tumour groups to the veterinary clinic for small animals at the University of Göttingen (Göttingen, Germany), the oncology service of the veterinary clinic for small animals in Hofheim (Hofheim, Germany), or the veterinary clinic for gynaecology and obstetrics at the University of Gießen (Gießen, Germany) due to the symptoms brought on by their particular tumour diseases. To confirm their cancer diagnoses, those dogs were subjected to all the necessary diagnostic procedures.

Specialized veterinary pathologists generated histopathologic diagnoses utilizing incisional or excisional biopsy specimens of the tumours in question. Tumour volume was determined by multiplying width by height and by depth, except for lymphoma, since it is a systemic disease.

The malignant tumour group consisted of 82 dogs with different malignant tumour diseases (carcinomas $n = 35$; soft tissue sarcomas $n = 26$; malignant lymphomas $n = 21$).

A minimum follow-up time of 2 years following the cancer diagnosis was documented for all dogs with malignant tumours. Cause of death was recorded as tumour-related or non-tumour related in all cases that died during the observation period.

The group of dogs with histopathologically confirmed benign masses consisted of 13 dogs with mammary adenomas. Other diseases, especially malignant tumour diseases, were ruled out in these cases by multiple follow-up examinations.

The group of dogs with mammary adenomas was compared to the group of dogs with mammary adenocarcinomas.

2.2. Histopathology

Histology was performed using routinely embedded paraffin sections after hematoxylin and eosin staining. The tumour entity, as well as the histologic grade was evaluated. Diagnoses were made by veterinary pathologists according to the WHO guidelines [30].

In case of mammary tumours in particular, malignancy was graded according to the classification system established by Peña et al. 2012 [31].

2.3. Blood Sample Collection and Processing

Blood samples used for all measurements were collected from the cephalic veins prior to any treatments. Blood samples for complete blood counts were collected in polypropylene tubes containing 1.6 mg ethylenediamine tetraacetic acid/mL blood (Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) and analysed using a ProCyt Dx Hematology Analyzer (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA), which counted red blood cells, white blood cells, haemoglobin and platelets, among other things. Some of these values

were also used for subsequent analyses related to our measured serum Ki-67 concentrations, which are discussed in more detail below.

Standard serum tubes (Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) were used to take serum samples for serum chemistry and then centrifuged in an Eppendorf centrifuge 5424 (Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at $3000\times g$ for 5 min. The serum was then removed from the tube and analysed using the clinical chemistry analyser (Konelab 20i; Fa. Thermo Fischer Scientific Inc., Dreieich, Germany) and commercial kits according to standard procedures.

The serum for Ki-67 measurements was allowed to rest at room temperature for 2 h and then centrifuged at $1000\times g$ for 15 min. It was then pipetted into Eppendorf tubes, frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stored under these conditions until processed within the next 3 months.

2.4. Immunoassay

The Ki-67 concentrations were measured using a commercially available immunoassay kit [Canine Ki-67 Protein (Ki67P) ELISA kit; MyBioSource, San Diego, CA, USA (Cat.No: MBS089640), quantitative Sandwich ELISA] with non-diluted serum in duplicate, adhering to the manufacturer's instructions.

First, serum samples and standards were pipetted into the appropriate wells of the microtiter plate. HRP conjugate reagent was then added and the microtiter plate was incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h. The Ki-67 protein present in the samples bound to the immobilized Ki-67 antibodies on the microtiter plate, and at the same time, the detection antibody against Ki-67 contained in the HRP conjugate reagent in turn bound to the Ki-67 antigens from the samples. To remove all unbound antibodies, four manual washing steps were then performed. Subsequently, an enzymatic reaction was induced by adding chromogen solution and incubating again at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min, which became visible in the form of a blue colour complex. The resulting colour intensity is directly proportional to the amount of Ki-67 protein bound. In the final step, a stop solution was added to terminate the enzyme-substrate reaction, resulting in a colour change to yellow. The optical density (O.D.) of each well was then measured spectrophotometrically at a wavelength of 450 nm. Ki-67 concentrations in ng/mL were then calculated using the standard curve generated by the CurveExpert Professional program (Hyams Development, <https://www.curveexpert.net/> (accessed on 17 May 2018)). According to the manufacturer, the detection range of the ELISA in serum samples is 0.625–20.0 ng/mL. The mean intra- and inter-assay coefficients are reported to be less than 15% each [32].

2.5. Ratios

To distinguish between the group of benign mammary adenomas and the malignant mammary adenocarcinomas, ratios were formed in order to compare those two groups.

Ratios were calculated by dividing the serum Ki-67 concentrations by the neutrophil granulocyte, the lymphocyte and the monocyte counts, respectively. Similarly, for completeness, blood concentrations of neutrophil granulocytes, lymphocytes, and monocytes of all the various groups were compared with each other. As mentioned above, apart from the Ki-67 concentrations measured by ELISA, the cell counts used were obtained from the accompanying routine blood count.

2.6. Statistical Analysis

Statistical examination was performed using the program Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk and the Kolmogorov–Smirnov tests, the Pearson's correlation coefficient was used to test for linear correlation between the datasets. Non-normally distributed data were compared using the Mann–Whitney (two groups) or the Kruskal–Wallis (multiple groups) tests. Linear regression analyses were performed to examine dependency of Ki-67 on tumour volume. Receiver operation characteristic (ROC) curves were calculated for discriminating healthy dogs from tumour patients. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

A wide variety of dog breeds and mixed breeds were represented and no dog breed was predominant (Table 1). Information on age and sex distribution in the different groups is summarized in Table 2.

Table 1. Dog breeds of all dogs investigated in this study.

| Groups | No. | Dog Breed |
|-------------------|-----|--|
| Controls | 19 | Mixed breed ($n = 6$), Small Münsterländer ($n = 2$), Australian Shepherd ($n = 1$), Bodeguero Andaluz ($n = 1$), Border Collie ($n = 1$), Collie ($n = 1$), Dogue de Bordeaux ($n = 1$), German Shepherd ($n = 1$), Golden Doodle ($n = 1$), Irish Wolfhound ($n = 1$), Lagotto Romagnolo ($n = 1$), wire-haired dachshund ($n = 1$), Yorkshire Terrier ($n = 1$) |
| Non-neoplastic | 26 | Mixed breed ($n = 6$), Jack Russel Terrier ($n = 2$), Labrador Retriever ($n = 2$), Airedale Terrier ($n = 1$), Austrian Black and Tan Hound ($n = 1$), Beagle ($n = 1$), Bichon Frise ($n = 1$), Curly Coated Retriever ($n = 1$), Dutch Shepherd ($n = 1$), Flat Coated Retriever ($n = 1$), Golden Retriever ($n = 1$), Greater Swiss Mountain Dog ($n = 1$), long-haired dachshund ($n = 1$), Plott Hound ($n = 1$), Ratonero Mallorquín ($n = 1$), Sealyham Terrier ($n = 1$), Small Münsterländer ($n = 1$), West Highland White Terrier ($n = 1$), White Swiss Shepherd Dog ($n = 1$) |
| Malignant Tumours | 35 | Mixed breed ($n = 7$), Labrador Retriever ($n = 3$), Bavarian Mountain Hound ($n = 2$), Beagle ($n = 2$), Collie ($n = 2$), German Shepherd ($n = 2$), Boxer ($n = 1$), Cocker Spaniel ($n = 1$), Entlebucher Mountain Dog ($n = 1$), Golden Retriever ($n = 1$), Harz fox ($n = 1$), Havanese ($n = 1$), Hovawart ($n = 1$), Magyar Vizsla ($n = 1$), Miniature Schnauzer ($n = 1$), Old German shepherd dog ($n = 1$), Pitbull ($n = 1$), Rhodesian Ridgeback ($n = 1$), Samoyed dog ($n = 1$), Schnauzer ($n = 1$), Shetland Sheepdog ($n = 1$), Welsh Terrier ($n = 1$), wire-haired dachshund ($n = 1$) |
| | 26 | Mixed breed ($n = 9$), Jack Russel Terrier ($n = 3$), Labrador Retriever ($n = 3$), Bernese Mountain Dog ($n = 2$), German Shepherd ($n = 2$), Australian Shepherd ($n = 1$), Beagle ($n = 1$), Boxer ($n = 1$), Golden Retriever ($n = 1$), Kooikerhondje ($n = 1$), Podenco ($n = 1$), Rottweiler ($n = 1$) |
| | 21 | Mixed breed ($n = 8$), Alaskan Malamute ($n = 1$), Cocker Spaniel ($n = 1$), Dandie Dinmont Terrier ($n = 1$), Galgo Español ($n = 1$), German Shepherd ($n = 1$), Golden Retriever ($n = 1$), Gordon Setter ($n = 1$), Great Dane ($n = 1$), Irish Terrier ($n = 1$), Jack Russel Terrier ($n = 1$), Miniature Schnauzer ($n = 1$), Rhodesian Ridgeback ($n = 1$), Rottweiler ($n = 1$) |
| Benign Tumours | 13 | Rhodesian Ridgeback ($n = 2$), Yorkshire Terrier ($n = 2$), Australian Shepherd ($n = 1$), Bichon Frise ($n = 1$), German Shepherd ($n = 1$), German Wirehaired Pointer ($n = 1$), Golden Retriever ($n = 1$), Hovawart ($n = 1$), Miniature Bull Terrier ($n = 1$), Pomeranian ($n = 1$), Russian Toy ($n = 1$) |

The healthy control group ($n = 19$) had serum Ki-67 concentrations between 0 and 1.88 ng/mL (median of 0.29 ng/mL). The dogs in the group with non-neoplastic diseases ($n = 26$) suffered from metabolic diseases (diabetes $n = 2$; hypoadrenocorticism $n = 1$), neurological disorders (canine idiopathic epilepsy $n = 2$; geriatric vestibular syndrome $n = 1$), chronic organ failure (chronic renal failure $n = 3$; chronic heart failure $n = 1$) and inflammatory conditions (gastroenteritis $n = 6$; endometritis $n = 3$; other inflammatory diseases $n = 7$). In this group Ki-67 concentrations ranged from 0.51 to 3.6 ng/mL (median 1.79 ng/mL). There was no significant difference between Ki-67 levels in dogs with metabolic disorders, neurological disorders, inflammatory conditions, or organ failure ($p = 0.11$), with the exception of a significantly higher Ki-67 concentration in dogs with inflammatory diseases compared to dogs with neurological disorders ($p = 0.02$, Figure 1A). There was a highly significant difference in the serum Ki-67 concentrations between healthy dogs and dogs with non-neoplastic diseases ($p < 0.0001$, Figure 2).

Table 2. Number, sex, and age of all dogs investigated in this study.

| Groups | | No. (f/m) | Age (yr) Min | Max | Mean |
|-------------------------|-----------------------------------|------------|--------------|------|------|
| Controls | | 19 (9/10) | 0.5 | 10 | 5.0 |
| Non-neoplastic | | 26 (12/14) | 1.3 | 17.3 | 8.4 |
| Malignant tumours | Total | 82 (57/25) | 4.5 | 16 | 10.1 |
| Carcinoma (1) | Mammary Adenocarcinoma | 26 (26/0) | 6.5 | 15.5 | 11 |
| Carcinoma (2) | Squamous cell carcinoma | 9 (5/4) | 6 | 16 | 10.5 |
| Mesenchymal tumours (1) | Subcutaneous spindle cell sarcoma | 17 (9/8) | 5 | 14 | 9.8 |
| Mesenchymal tumours (2) | Splenic hemangiosarcoma | 9 (4/5) | 5 | 15 | 10.3 |
| Benign tumours | | 21 (13/8) | 4.5 | 14 | 9.2 |
| Mammary Adenoma | | 13 (13/0) | 6 | 12 | 9.3 |

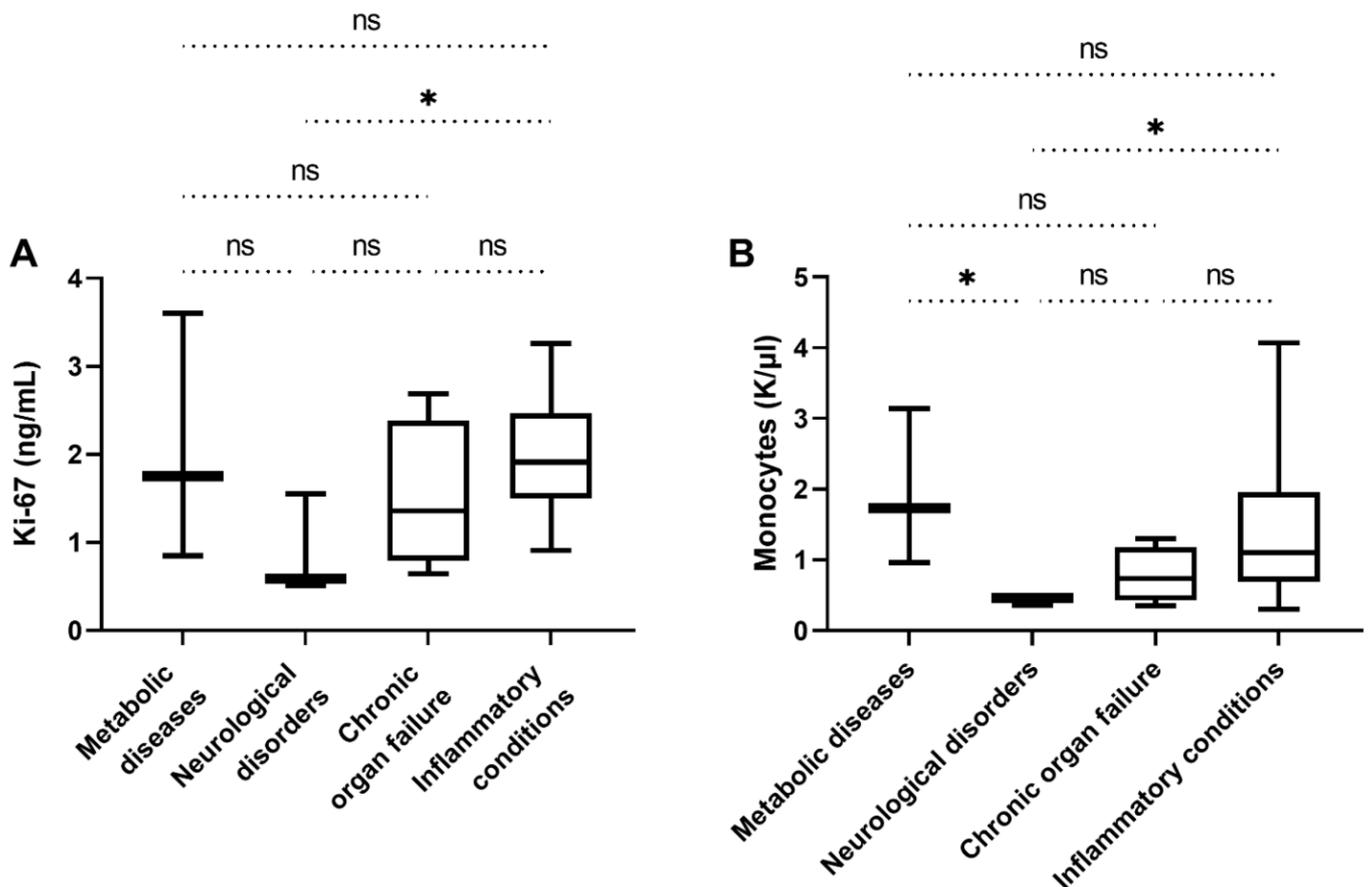


Figure 1. Serum Ki-67 concentrations and monocyte blood counts within the group of dogs with non-neoplastic diseases. (A) Comparing the Ki-67 levels, no significant difference between dogs with metabolic disorders, neurological disorders, inflammatory conditions, or organ failure could be found ($p = 0.11$), apart from significantly higher Ki-67 concentration in dogs with inflammatory diseases in comparison to dogs with neurological disorders ($p = 0.02$). (B) Monocyte blood counts were significantly lower in the neurologic disorder subgroup compared with the metabolic and inflammatory disease subgroups ($p = 0.025$ and $p = 0.03$). There was no significant difference between the other subgroups of the non-neoplastic diseased dogs. (ns) not significant; (*) $p < 0.05$.

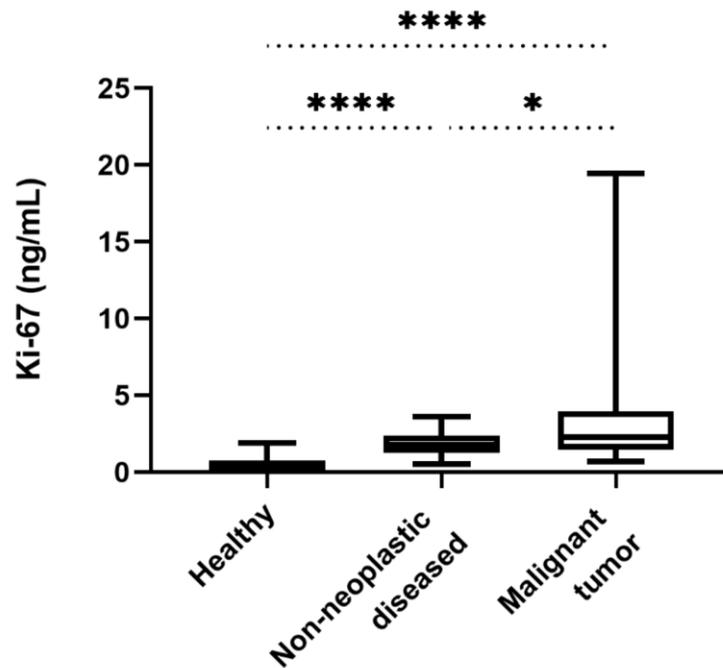


Figure 2. Comparison of the serum Ki-67 concentrations in healthy dogs, dogs with non-neoplastic diseases, and dogs with malignant tumours. Concentrations between healthy dogs and those suffering from non-neoplastic diseases differed significantly ($p < 0.0001$). The dogs with malignant tumours had significantly higher Ki-67 concentrations than healthy dogs ($p < 0.0001$) and those with non-neoplastic diseases ($p = 0.027$). (*) $p < 0.05$; (****) $p < 0.0001$.

The group of dogs with malignant tumours consisted of 82 dogs with different malignant tumour diseases that were subclassified into three groups. The carcinoma group included malignant subtypes of mammary tumours classified by the grading system established by Peña et al. 2012 (adenocarcinomas $n = 26$) and nine squamous cell carcinomas of the dermis ($n = 4$), oral mucosa ($n = 3$), and nasal mucosa ($n = 2$).

The mesenchymal tumour group ($n = 26$) included soft-tissue sarcomas of different anatomic locations, including subcutaneous spindle cell sarcomas ($n = 17$) and splenic hemangiosarcomas ($n = 9$). In the lymphoma group dogs with various subtypes of high-grade lymphomas were included (multicentric lymphoma ($n = 18$); cutaneous epitheliotropic lymphoma ($n = 2$), and gastrointestinal lymphoma ($n = 1$)).

Serum Ki-67 concentrations in dogs with malignant tumours ranged between 0.69 and 19.46 ng/mL (median 2.26 ng/mL).

In the carcinoma group, dogs with mammary gland adenocarcinomas ($n = 26$) had serum Ki-67 concentrations between 0.83 and 14.04 ng/mL (median 2.48 ng/mL). Dogs with squamous cell carcinomas ($n = 9$) had serum Ki-67 concentrations between 1.06 and 13.63 ng/mL (median 2.68 ng/mL). Dogs with mesenchymal tumours ($n = 26$) had serum Ki-67 concentrations between 0.69 and 8.27 ng/mL (median 2.35 ng/mL). Of these, subcutaneous spindle cell sarcoma ($n = 17$) and splenic hemangiosarcoma ($n = 9$) had serum Ki-67 levels between 0.69 and 8.27 ng/mL (median 2.42 ng/mL) and between 0.99 and 7.19 ng/mL (median 2.27 ng/mL), respectively. Ki-67 concentrations in dogs with high grade lymphomas ($n = 21$) were between 1.01 and 19.46 ng/mL (median 2.0 ng/mL). There were no statistically significant differences in Ki-67 levels between carcinoma, sarcoma, and lymphoma subgroups ($p = 0.37$; Figure 3A).

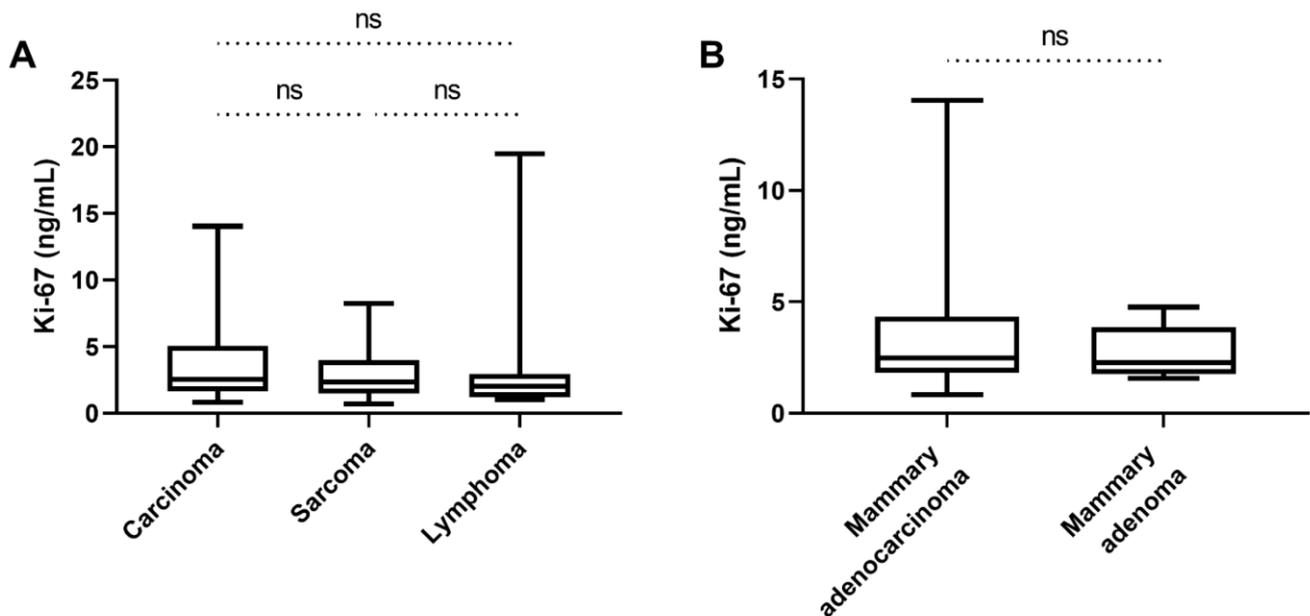


Figure 3. Serum Ki-67 concentrations within the group of dogs with tumour diseases. (A) Comparison of the serum Ki-67 concentrations of the different malignant tumour groups (epithelial tumours, mesenchymal tumours, and lymphoma). No significant difference could be found comparing these 3 groups of tumours ($p = 0.37$). (B) When comparing the serum Ki-67 concentrations of dogs with mammary adenocarcinoma with those of the dogs with mammary adenoma, the tumour serum Ki-67 concentrations did not differ significantly ($p = 0.42$). (ns) not significant.

In the dogs with benign masses (mammary adenoma, $n = 13$) serum Ki-67 concentrations ranged between 1.55 and 4.75 ng/mL (median 2.28 ng/mL).

There was a significant difference in the Ki-67 serum concentrations of dogs with malignant tumours compared to healthy dogs and to dogs with non-neoplastic diseases ($p < 0.0001$ and $p = 0.027$, respectively; Figure 2). If the individual groups of the malignant tumour group are considered separately and compared with the healthy group and the non-neoplastic diseased group, significantly higher values were found in each case compared with the healthy group ($p < 0.0001$ in each case; Figure 4A–C). In comparison with the non-neoplastic diseased group, however, only the carcinoma group showed significantly higher values ($p = 0.02$; Figure 4A); there was no significant difference in the sarcoma group and the lymphoma group ($p = 0.10$ and $p = 0.44$, respectively; Figure 4A–C).

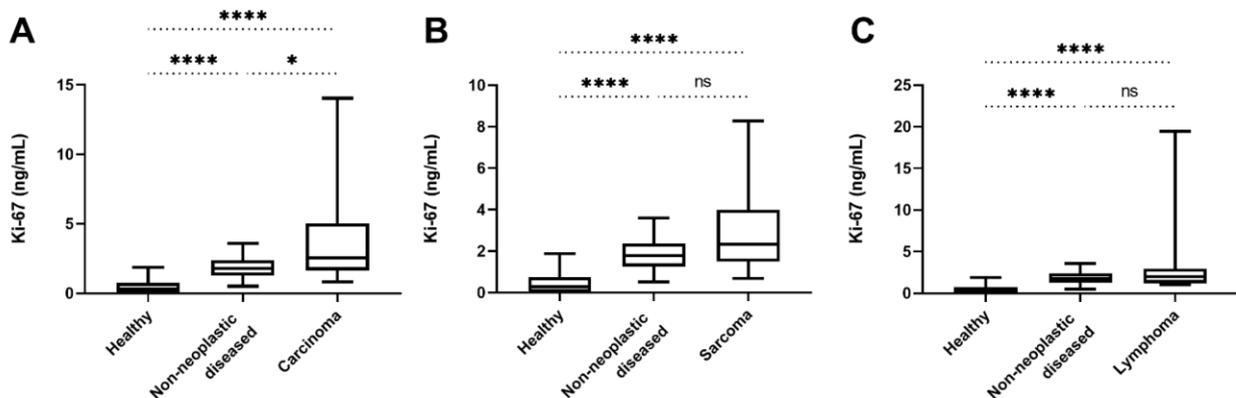


Figure 4. Serum Ki-67 concentrations of the different malignant tumour groups were also compared individually with the healthy group, and the non-neoplastic diseased group. (A) The Ki-67 concentrations

of the carcinoma group differed significantly compared to the healthy control group ($p < 0.0001$) and compared to the group of dogs with non-neoplastic diseases ($p = 0.0198$). (B) A comparison of the Ki-67 concentrations of the sarcoma group revealed significantly higher concentrations than the ones in the healthy control group ($p < 0.0001$), whereas concentrations in the group with non-neoplastic diseases did not differ significantly compared to the sarcoma group ($p = 0.102$). (C) The Ki-67 concentrations of the lymphoma group were significantly higher than the ones of the healthy dogs ($p < 0.0001$), however, compared to the group with non-neoplastic diseases, there was no significant difference ($p = 0.439$). (ns) not significant; (*) $p < 0.05$; (****) $p < 0.0001$.

No significant differences in serum Ki-67 concentrations between mammary adenocarcinoma and mammary adenoma were present ($p = 0.42$; Figure 3B).

The calculated tumour volumes of the tumours in the carcinoma group and in the sarcoma group are presented in Table 3. Tumour volume of neither carcinomas nor sarcomas showed a noticeable influence on serum Ki-67 concentrations when tested by linear regression ($p = 0.28$ and $p = 0.955$, respectively; Figure 5A,B).

Table 3. Tumour volume.

| Groups | | Min (cm ³) | Max (cm ³) | Mean (cm ³) | Median (cm ³) |
|--------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Malignant Tumours | | | | | |
| Carcinoma (1) | Mammary Adenocarcinoma | 0.07 | 321.0 | 42.79 | 14.0 |
| Carcinoma (2) | Squamous cell carcinoma | 1.7 | 86.5 | 26.6 | 8.1 |
| Mesenchymal tumours (1) | Subcutaneous spindle cell sarcoma | 0.26 | 465.92 | 100.87 | 40.87 |
| Mesenchymal tumours (2) | Splenic hemangiosarcoma | 1.17 | 399.36 | 147.86 | 134.55 |
| Benign Tumours | | | | | |
| | Mammary Adenoma | 0.1 | 22.4 | 2.38 | 0.5 |

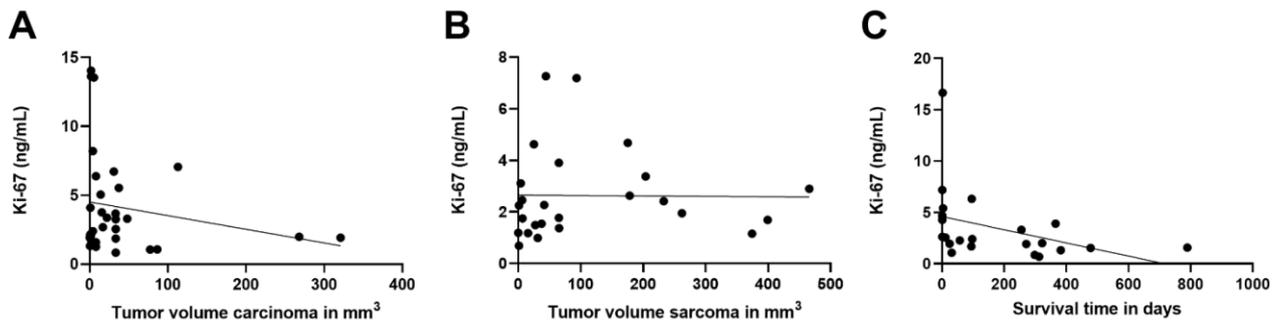


Figure 5. Linear regression analysis. (A) The influence of the tumour volume (mm³) on the serum Ki-67 concentrations was measured by linear regression analysis for carcinoma. No significant relationship could be found ($p = 0.28$; $r^2 = 0.038$). (B) Neither did the measured tumour volume (mm³) of the sarcomas affect their Ki-67 concentrations also measured by linear regression analysis ($p = 0.955$; $r^2 = 0.0001$). (C) The influence of the serum Ki-67 concentration on the survival time calculated with a linear regression analysis revealed no significant relation ($p = 0.075$; $r^2 = 0.15$).

Within the 2 years follow-up period, 22 of the patients with malignant tumours died as a result of their disease with survival times from 1 to 789 days (mean 168 days). No statistically significant correlation between serum Ki-67 concentrations and survival times was found ($p = 0.075$; Figure 5C).

The concentrations of inflammatory cells such as neutrophils, lymphocytes, and monocytes measured in the concomitant blood test are summarized in Table 4. When comparing the inflammation levels between the healthy control group, the non-neoplastic diseased

group and the malignant tumour group, the following correlations were found. The non-neoplastic diseased group showed significantly higher concentrations of neutrophils than the healthy group and the malignant tumour group ($p = 0.031$ and $p = 0.023$, respectively; Figure 6A). Additionally, the non-neoplastic diseased group of dogs showed significantly higher lymphocyte counts compared to the malignant tumour group ($p = 0.011$; Figure 6B), the difference to the healthy control group is not significant here. The monocyte concentrations of the non-neoplastic diseased group were also significantly higher compared to both the healthy group and the malignant tumour group ($p = 0.006$ and $p = 0.011$, respectively; Figure 6C). Within the group of non-neoplastic diseased dogs, there was no significant difference in inflammatory parameters, with the exception of significantly lower monocyte counts in the neurologic disorder subgroup compared with the metabolic and inflammatory disease subgroups ($p = 0.025$ and $p = 0.03$, respectively; Figure 1B). If one compares the individual malignant tumour groups with one another, there is no significant difference in the aforementioned inflammatory parameters between the carcinoma group, the mesenchymal tumour group, and the lymphoma group. Looking specifically at the inflammatory parameters of malignant mammary adenocarcinomas compared with benign mammary adenomas, there is no statistical difference here either ($p = 0.52$, $p = 0.39$, and $p = 0.43$, respectively).

Table 4. Neutrophils, lymphocytes, and monocytes of dogs in this study.

| Groups | | Min (K/ μ L) | Max (K/ μ L) | Mean (K/ μ L) | Median (K/ μ L) |
|--|-------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------|
| Controls | Neutrophils | 3.24 | 10.27 | 6.07 | 6.51 |
| | Lymphocytes | 1.06 | 4.1 | 2.17 | 2.1 |
| | Monocytes | 0.25 | 1.18 | 0.58 | 0.49 |
| Non-neoplastic | Neutrophils | 3.57 | 31.55 | 10.87 | 7.19 |
| | Lymphocytes | 0.77 | 5.6 | 2.5 | 2.17 |
| | Monocytes | 0.3 | 4.07 | 1.3 | 1.0 |
| Malignant Tumours | | | | | |
| Carcinoma (1): Mammary Adenocarcinoma | Neutrophils | 3.05 | 27.66 | 7.92 | 5.79 |
| | Lymphocytes | 0.77 | 4.73 | 1.80 | 1.72 |
| | Monocytes | 0.28 | 3.61 | 0.72 | 0.58 |
| Carcinoma (2): Squamous cell carcinoma | Neutrophils | 5.0 | 10.99 | 7.2 | 6.56 |
| | Lymphocytes | 1.56 | 2.59 | 1.84 | 1.67 |
| | Monocytes | 0.4 | 1.24 | 0.71 | 0.58 |
| Mesenchymal tumours (1): Subcutaneous spindle cell sarcoma | Neutrophils | 3.75 | 19.54 | 6.67 | 5.92 |
| | Lymphocytes | 0.8 | 2.63 | 1.86 | 1.97 |
| | Monocytes | 0.13 | 2.87 | 0.65 | 0.5 |
| Mesenchymal tumours (2): Splenic hemangiosarcoma | Neutrophils | 3.9 | 19.56 | 11.0 | 10.94 |
| | Lymphocytes | 0.58 | 7.63 | 2.17 | 1.62 |
| | Monocytes | 0.1 | 5.66 | 1.65 | 1.25 |
| Lymphoma | Neutrophils | 0.57 | 38.66 | 7.76 | 5.19 |
| | Lymphocytes | 0.43 | 7.96 | 2.02 | 1.44 |
| | Monocytes | 0.19 | 4.18 | 1.17 | 0.68 |
| Benign tumours | | | | | |
| Mammary Adenoma | Neutrophils | 0.34 | 15.53 | 7.35 | 7.18 |
| | Lymphocytes | 1.06 | 4.49 | 2.15 | 1.9 |
| | Monocytes | 0.36 | 4.15 | 0.98 | 0.58 |

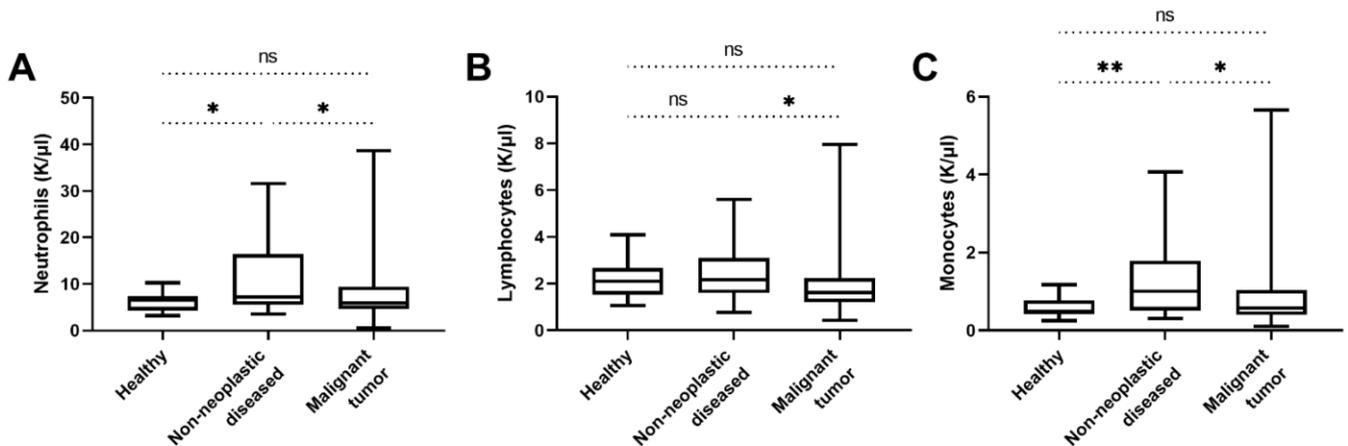


Figure 6. Comparison of different inflammatory parameters of healthy dogs, dogs with non-neoplastic diseases, and the different malignant tumour groups. **(A)** The neutrophil counts of the non-neoplastic diseased dogs were significantly higher than those of the healthy and the malignant tumour group ($p = 0.031$ and $p = 0.023$, respectively). The neutrophil counts between the healthy and the malignant tumour group did not differ significantly ($p = 0.59$). **(B)** The group of non-neoplastic diseased dogs had significantly higher lymphocyte counts than the malignant tumour group ($p = 0.011$). No significant difference between the lymphocyte counts of the healthy and the non-neoplastic diseased dogs and between the healthy and the malignant tumour group was found ($p = 0.77$ and $p = 0.056$, respectively). **(C)** The monocyte counts of the non-neoplastic diseased dogs were significantly higher than those of the healthy and the malignant tumour group ($p = 0.006$ and $p = 0.011$, respectively). The monocyte counts between the healthy and the malignant tumour group did not differ significantly ($p = 0.34$). ns, not significant. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$.

Similarly, establishing ratios between serum Ki-67 concentrations and neutrophil, lymphocyte, and monocyte counts as indicators of inflammation, as well as components of the tumour microenvironment, was unable to distinguish mammary adenocarcinomas from adenomas ($p = 0.83$, $p = 0.50$ and $p = 0.45$, respectively; Table 5). However, comparing ratios of serum Ki-67 concentrations and neutrophils, lymphocytes, or monocytes of the sarcoma group with the non-neoplastic diseased group, a statistically significant difference was found in all three cases, with the diseased group showing lower values than the sarcoma group ($p = 0.04$, $p = 0.03$ and $p = 0.02$, respectively; Table 5; Figure 7A–C). This observation cannot be reproduced when comparing ratios of serum Ki-67 concentrations and neutrophils, lymphocytes, or monocytes of the lymphoma group with the non-neoplastic diseased group ($p = 0.076$, $p = 0.104$ and $p = 0.16$, respectively; Table 5; Figure 8A–C).

Table 5. Ratios of Ki-67 and neutrophil, lymphocyte and monocyte counts of all dogs examined in this study.

| Groups | | Min | Max | Mean | Median | |
|-------------------|--|------------------------|-------|------|--------|------|
| Controls | Ki-67-neutrophil-ratio | 0.0 | 0.57 | 0.09 | 0.06 | |
| | Ki-67-lymphocyte-ratio | 0.0 | 1.01 | 0.25 | 0.13 | |
| | Ki-67-monocyte-ratio | 0.0 | 7.52 | 1.16 | 0.58 | |
| Non-neoplastic | Ki-67-neutrophil-ratio | 0.03 | 0.71 | 0.23 | 0.17 | |
| | Ki-67-lymphocyte-ratio | 0.16 | 1.96 | 0.89 | 0.82 | |
| Malignant Tumours | Ki-67-monocyte-ratio | 0.44 | 6.12 | 2.12 | 1.44 | |
| | Carcinoma (1): Mammary Adenocarcinoma | Ki-67-neutrophil-ratio | 0.05 | 4.60 | 0.62 | 0.39 |
| | | Ki-67-lymphocyte-ratio | 0.31 | 7.46 | 2.13 | 1.59 |
| | Ki-67-monocyte-ratio | 1.05 | 50.14 | 6.91 | 4.09 | |

Table 5. Cont.

| Groups | | Min | Max | Mean | Median |
|---|------------------------|------|-------|------|--------|
| Carcinoma (2): Squamous cell carcinoma | Ki-67-neutrophil-ratio | 0.09 | 2.92 | 0.9 | 0.37 |
| | Ki-67-lymphocyte-ratio | 0.45 | 8.11 | 2.57 | 1.49 |
| | Ki-67-monocyte-ratio | 0.86 | 34.08 | 8.73 | 4.99 |
| Mesenchymal tumours (1): Subcutaneous spindle cell sarcoma | Ki-67-neutrophil-ratio | 0.08 | 1.71 | 0.52 | 0.37 |
| | Ki-67-lymphocyte-ratio | 0.45 | 6.21 | 1.65 | 1.09 |
| | Ki-67-monocyte-ratio | 0.54 | 16.54 | 6.94 | 7.61 |
| Mesenchymal tumours (2): Splenic hemangiosarcoma | Ki-67-neutrophil-ratio | 0.1 | 0.66 | 0.33 | 0.26 |
| | Ki-67-lymphocyte-ratio | 0.61 | 4.53 | 2.0 | 1.55 |
| | Ki-67-monocyte-ratio | 0.66 | 9.9 | 3.85 | 3.42 |
| Lymphoma | Ki-67-neutrophil-ratio | 0.03 | 29.23 | 2.15 | 0.34 |
| | Ki-67-lymphocyte-ratio | 0.13 | 20.83 | 3.42 | 1.45 |
| | Ki-67-monocyte-ratio | 0.30 | 84.61 | 7.84 | 2.91 |
| Benign Tumours | | | | | |
| Mammary Adenoma | Ki-67-neutrophil-ratio | 0.11 | 5.68 | 0.89 | 0.35 |
| | Ki-67-lymphocyte-ratio | 0.42 | 4.11 | 1.61 | 1.21 |
| | Ki-67-monocyte-ratio | 0.47 | 9.67 | 4.29 | 3.96 |

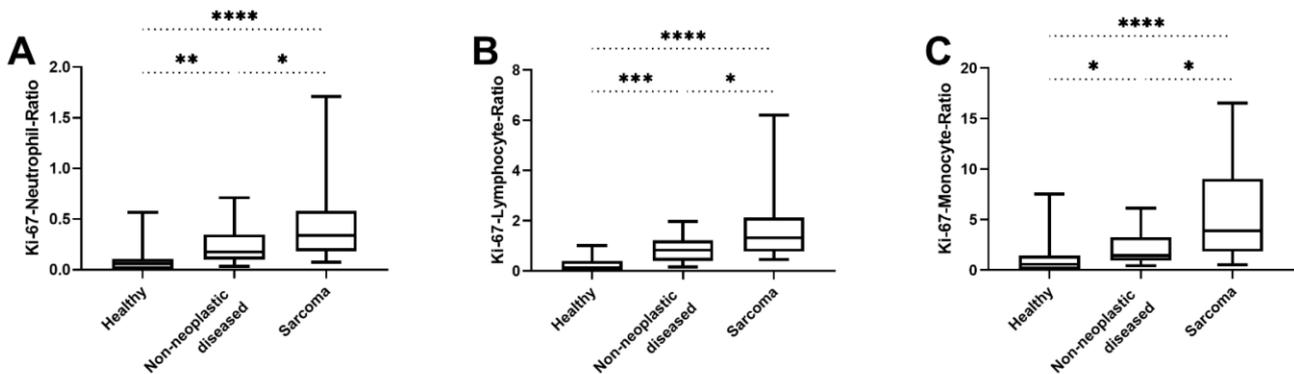


Figure 7. Comparison of ratios between Ki-67 and different inflammatory parameters of healthy dogs, dogs with non-neoplastic diseases, and the sarcoma group. (A) The Ki-67–neutrophil ratios of the non-neoplastic diseased group were significantly lower than those of the sarcoma group ($p = 0.04$). The healthy dogs also had significantly lower values than both the non-neoplastic diseased and the sarcoma group ($p = 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively). (B) The Ki-67-lymphocyte-ratios of the non-neoplastic diseased group also were significantly lower than those of the sarcoma group ($p = 0.03$). The healthy dogs had significantly lower Ki-67–lymphocyte ratios than both the non-neoplastic diseased and the sarcoma group ($p = 0.0002$ and $p < 0.0001$, respectively). (C) The Ki-67–monocyte ratios of the non-neoplastic diseased group were significantly lower than those of the sarcoma group ($p = 0.02$). The healthy dogs also had significantly lower values than both the non-neoplastic diseased and the sarcoma group ($p = 0.019$ and $p < 0.0001$, respectively). (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$; (****) $p < 0.0001$.

A receiver operating characteristic (ROC) curve was calculated to discriminate dogs with benign mammary adenoma from those with malignant mammary adenocarcinoma. The area under the curve (AUC) was 0.52 ($p = 0.83$; 95% confidence interval, 0.34–0.70). Using a cut-off value of 2.34 ng/mL, the sensitivity was 53.9% (confidence interval, 0.35–0.71) and the specificity 53.9% (confidence interval, 0.29–0.77; Figure 9A). Comparison of the ratios of Ki-67 to the inflammatory parameters neutrophils, lymphocytes, and monocytes of mammary adenoma and mammary adenocarcinoma did not result in a notable improvement in the AUC value. The area under the curve to discriminate healthy dogs from those with malignant tumours was 0.97 ($p < 0.0001$; 95% confidence interval, 0.93–1.0). Using a cut-off value of 1.15 ng/mL, the sensitivity was 89.0% (confidence interval, 0.80–0.94) and the specificity 94.7% (confidence interval, 0.75–0.99; Figure 9B). The ROC curve to sepa-

rate non-neoplastic diseased dogs from the group of dogs with malignancies resulted in an AUC of 0.66 ($p = 0.014$; 95% confidence interval, 0.55–0.77). A cut-off value of 1.9 ng/mL resulted in a sensitivity of 63.4% (confidence interval, 0.53–0.73) and a specificity of 61.5% (confidence interval, 0.43–0.78; Figure 9C).

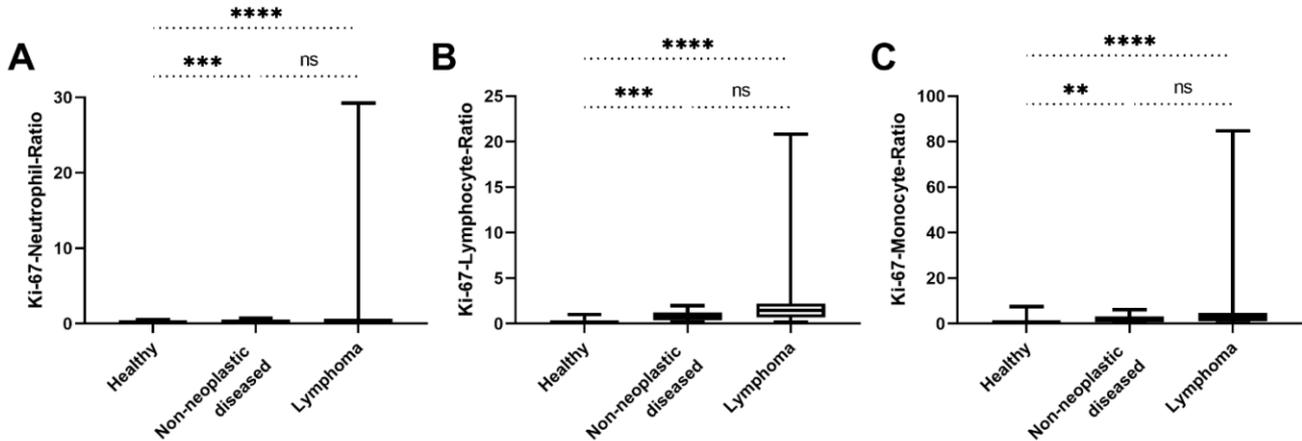


Figure 8. Comparison of ratios between Ki-67 and different inflammatory parameters of healthy dogs, dogs with non-neoplastic diseases, and the dogs with lymphoma. (A) The Ki-67–neutrophil ratios of the healthy dogs were significantly lower than those of the non-neoplastic diseased and the lymphoma group ($p = 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively). The Ki-67–neutrophil ratios between the non-neoplastic diseased and the malignant tumour group did not differ significantly ($p = 0.076$). (B) The Ki-67–lymphocyte ratios of the healthy dogs were also significantly lower than those of the non-neoplastic diseased and the lymphoma group ($p = 0.0002$ and $p < 0.0001$, respectively). Additionally, the Ki-67–lymphocyte ratios between the non-neoplastic diseased and the lymphoma group did not differ significantly ($p = 0.104$). (C) The Ki-67–monocyte ratios of the non-neoplastic diseased dogs were significantly higher than those of the healthy group and the healthy group had significantly lower values than the lymphoma group ($p = 0.005$ and $p < 0.0001$, respectively). The Ki-67–monocyte ratios between the non-neoplastic diseased and the lymphoma group did not differ significantly ($p = 0.16$). (ns) not significant; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$; (****) $p < 0.0001$.

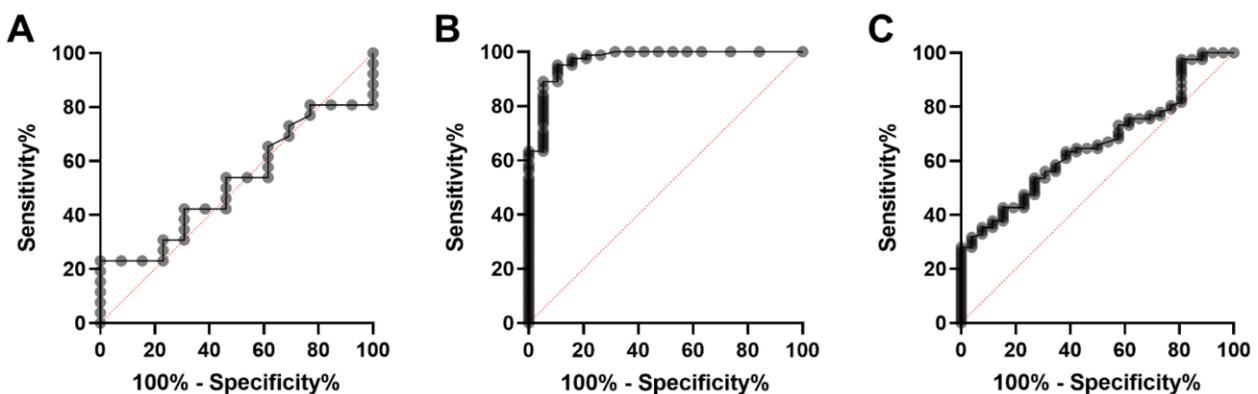


Figure 9. ROC curve analysis of serum Ki-67 concentration. (A) ROC curve for discriminating mammary adenocarcinoma from mammary adenoma. (B) ROC curve shown to distinguish healthy dogs from patient with tumour diseases. (C) ROC curve for discriminating non-malignant diseased dogs from tumour patients.

Using ratios of serum Ki-67 concentrations and the aforementioned inflammatory parameters for the ROC curve to distinguish non-neoplastic diseased dogs from tumour-diseased dogs, the AUC improves as follows: the comparison of the Ki-67–neutrophil ratio

provides an AUC of 0.73 ($p = 0.0005$; 95% confidence interval, 0.63–0.83), with a sensitivity of 68.8% (confidence interval, 0.58–0.78) and a specificity of 61.5% (confidence interval, 0.43–0.78), when using a cut-off value of 0.24 (Figure 10A). Applying the Ki-67–lymphocyte ratio results in an AUC of 0.73 ($p = 0.0006$; 95% confidence interval, 0.62–0.83) and, with a cut-off of 1.05, a sensitivity of 61.0% (confidence interval, 0.50–0.71) and a specificity of 61.5% (confidence interval, 0.43–0.78; Figure 10B). The application of the Ki-67–monocyte ratio leads to an AUC of 0.74 ($p = 0.0002$; 95% confidence interval, 0.64–0.84). Using a cut-off value of 2.15, the sensitivity and specificity was 71.4% (confidence interval, 0.61–0.80) and 61.5% (confidence interval, 0.43–0.78), respectively (Figure 10C).

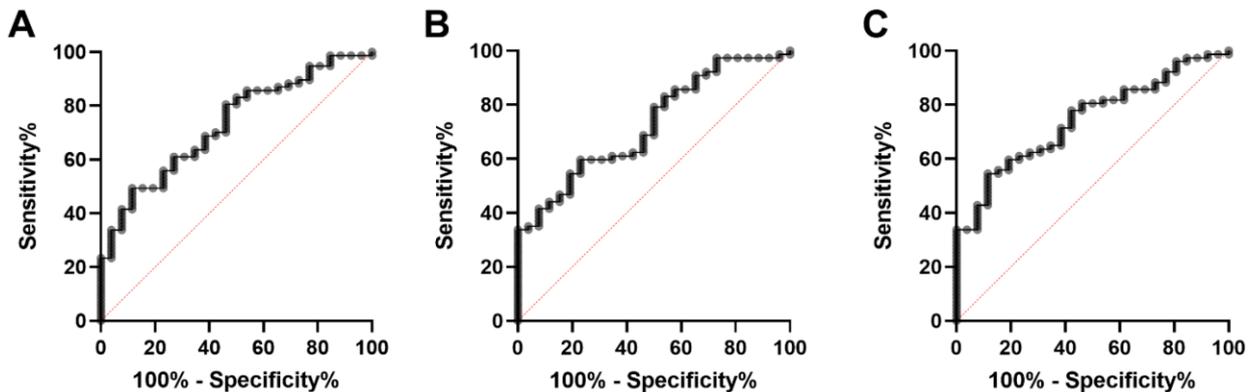


Figure 10. ROC curve analysis for discriminating non-neoplastic diseased dogs from tumour patients. (A) Ki-67-neutrophil ratio. (B) Ki-67-lymphocyte ratio. (C) Ki-67-monocyte ratio.

4. Discussion

Based on the WHO definition of biomarkers, a tumour marker is a measurable substance that provides information about the existence of tumour tissue in a body [1]. In order to allow for a good differentiation between healthy and tumour bearing dogs, tumour marker must be specific for tumour tissue.

Ki-67 is a specific biomarker for tumour proliferation, expressed in cells during the G phase of mitosis [11,33]. Many tumour tissues have a relatively high mitotic rate [34] and, therefore, show increased levels of Ki-67 that can be measured by immunohistochemistry [23]. Ki-67 immunohistochemistry is also frequently associated with the biologic behaviour of malignancies, as has been demonstrated, for example, in canine mast cell tumours [35].

In a pilot study investigating the expression of Ki-67 in cell cultures, to be precise cultured fibrosarcoma tumour cells, increased amounts of Ki-67 were found in culture supernatants during the proliferation phase of the cells [29]. In another study on canine mammary tumour cells, Ki-67 protein expression decreased after treatment with the tyrosine kinase inhibitor Masitinib mesylate [36].

Ki-67 concentrations were also evaluated in serum, showing comparable results, although a different immunoassay kit was used than in our study [29]. Further, a group of healthy dogs with nondetectable serum Ki-67 concentrations was compared to groups of dogs with different non-malignant diseases and with malignant tumours. Serum Ki-67 concentrations were between 0 and 69 pg/mL (median 0 pg/mL) and 0 and 7500 pg/mL (median 243 pg/mL), respectively, demonstrating a highly significant difference in the serum Ki-67 concentrations between all three groups [29]. The results of the current study are quite similar, although the serum Ki-67 concentrations differ slightly, probably due to the use of different ELISA kits. When establishing Ki-67 as a serum tumour marker, it is therefore recommended to always use the same ELISA kit or to work with individual cut-offs for the respective test kit used.

Based on these observations, we consider Ki-67 to be a valuable tumour marker indicating the presence of tumour tissue in the body. All 19 healthy patients in our study

had serum Ki-67 concentrations in the lower detection range of the ELISA. Since there were no outliers in this particular group, we consider a Ki-67 serum concentration in the low picogram range to be biological for healthy dogs.

The very low baseline concentrations measurable in the serum of healthy dogs is to be expected, since as a proliferation marker, a certain level of Ki-67 will also be present from rapidly proliferating normal tissues in a healthy organism, e.g., from dividing normal mucosal or bone marrow cells [11].

In a study in human breast cancer patients, a baseline serum Ki-67 concentration was also present in the serum of the healthy control group. Similarly to our study, the level in tumour-free individuals was significantly lower than in the tumour group [37].

The control group of diseased dogs without malignancies in this study were affected by various inflammatory, metabolic, or degenerative processes. The serum Ki-67 concentrations in this group were also significantly lower than in the group of dogs with malignancies, but were significantly higher compared to the healthy dogs. This may be explained by a proliferation of immune cells in inflammatory processes [38]. Likewise, a higher expression of Ki-67 has been demonstrated in immune-mediated diseases in both humans and dogs [39,40].

Acute inflammatory diseases in the group of dogs suffering from non-neoplastic diseases, such as, for example, pyometra, were frequently associated with neutrophilia and monocytophilia.

In case of inflammation monocyte-derived macrophages can become reinforcements for the tissue-resident macrophages [18,41].

Macrophages show increased proliferation in the context of inflammatory diseases and, thus, elevated Ki-67 expression, which can lead to higher serum Ki-67 concentrations [42]. Monocytes and lymphocytes, previously mentioned in the context of inflammation, also play an important role in the cancer microenvironment, influencing tumour growth and progression [17,18,20].

To account for inflammation as part of the relationship between tumour tissue and the immune defence mechanisms, we calculated a ratio between the Ki-67 concentrations and the number of immune cells in peripheral blood measured in the accompanying diagnostic routine blood count. This was intended to improve the predictive value of the Ki-67 serum concentration. For example, ratios of lymphocytes to neutrophils were associated with immunohistochemically determined Ki-67 index in the following two recent human medical studies on glioma and on adrenocortical carcinoma, and elevated ratios and elevated Ki-67 indices were associated with higher pathologic grades or increased risk of tumour recurrence [19,21]. To this end, we related and compared serum Ki-67 concentrations and neutrophil, lymphocyte and monocyte counts of mammary adenocarcinoma versus mammary adenoma. However, differentiation between benign and malignant mammary tumours was not possible when using this method in this case. One possible theory for this result would be that the tumour microenvironment was not particularly active at the time of the blood draw or that the corresponding inflammatory cells were more abundant in the surrounding tumour tissue rather than in the peripheral blood.

The immunohistochemical detection of Ki-67 might be superior here [43]. To draw more precise conclusions about this, Ki-67 and optionally inflammatory parameters of interest would have to be measured comparatively in the blood of canine tumour patients and immunohistochemically in the actual tumour tissue in that same study.

In our study, dogs with malignant tumours clearly differed from the comparison groups of healthy dogs and those with non-neoplastic diseases. This fact confirms our hypothesis that Ki-67 is elevated in patients with malignancies and, thus, can be used as a tumour marker. Furthermore, there was no correlation between serum Ki-67 concentration and tumour size. In the literature, tumour size was variably associated with Ki-67 index levels. Although two studies found no correlation with size in pituitary adenomas and soft tissue sarcomas [44,45], others reported Ki-67 expression dependent on tumour size in

If Ki-67 elevation in malignancy is independent of tumour size, it may be useful to detect small tumours that may not yet be detectable by imaging modalities. Classical imaging modalities for tumour search reportedly require a minimum mass of 10^9 cells for visualization [46]. Further studies are needed to elucidate the minimum tumour size required to reliably elevate Ki-67 serum concentrations above the background levels. If used as a screening tool for malignancy, an elevated serum Ki-67 may prompt intensification of tumour search or the use of more sensitive imaging techniques.

In humans with soft tissue sarcomas, a correlation has been found between higher Ki-67 concentrations and poorer prognosis [45,47]. Similarly, in our study some patients with soft tissue sarcomas and high Ki-67 concentrations had short survival times, but these observations were not statistically significant. This might be related to the heterogeneity of the tumours in this group and the small number of cases. In veterinary medicine, different results are found, depending on the tumour type: in hemangiosarcomas of the spleen and mammary adenocarcinomas of the breast, higher Ki-67 indices are associated with a poorer prognosis, whereas in canine apocrine gland anal sac adenocarcinomas no correlation was found regarding survival time [4,48,49].

Lymphomas are a heterogeneous group of tumours with markedly varying but generally high Ki-67 expressions [50]. Not surprisingly, some lymphoma cases in our study had very high serum Ki-67 concentrations.

It should be mentioned that we did not further classify our dogs with malignant lymphoma [51]. We do not expect there to be major differences in serum Ki-67 concentrations between T cell and B cell lymphomas, as high-grade lymphomas usually show a high proliferation rate, independent of immunophenotype. Differences would rather be expected between low-grade and high-grade lymphomas [52].

In immunohistochemistry the Ki-67 expression is mostly evaluated within a respective tumour group, and results can vary here as well. [53].

This restricts the utility of Ki-67 to distinguish between different tumour entities.

The presence of Ki-67 only provides information about the possibility that certain cells might divide, but not about the actual proliferation rate. Therefore, additional tests are recommended, for example another marker [11].

Our results suggest that serum Ki-67 may be useful as a non-selective screening tool for malignancy in health-checks especially in older dogs or in those with increased breed-specific cancer risk [54,55]. Especially in animals presented for a routine check-up lacking history or physical exam findings indicative of inflammation or infection, elevated serum Ki-67 levels should initiate an intensive search for malignant disease using diagnostic imaging and other modalities [56]. The clinical usefulness of any test is based on its sensitivity and specificity [57]. The ROC curve is used in clinical biochemistry to determine the best cut-off for tests and to distinguish between diseased and healthy patients. In addition, the AUC provides an estimate of a test's usefulness (7). ROC analysis to distinguish between healthy dogs and dogs with malignant tumours revealed that serum Ki-67 concentrations above 1.15 ng/mL were associated with the presence of a malignant tumour with a sensitivity of 0.89 and a specificity of 0.95. Based on our data the AUC was calculated as 0.97. The use of ROC analysis to distinguish between non-neoplastic diseased dogs and dogs with malignant tumours revealed that serum Ki-67 concentrations above 1.9 ng/mL indicate a malignant tumour in the organism, and are associated with a sensitivity of 0.63 and a specificity of 0.62, with an AUC of 0.66. Decreasing the cut-off to 1.26 increases the sensitivity to 0.81 and, thus, the true positive results, but at the same time decreases the specificity to 0.23. Similarly, if the cut-off is set at 2.52, the specificity is increased to 0.81 and the true negative rate is increased, while the sensitivity is decreased to 0.43 [58].

Based on our data, the AUC was calculated as 0.97. Applying the Ki-67-monocyte ratio for ROC analysis to differentiate between non-neoplastic diseased dogs and dogs with malignant tumours improves the AUC up to a number of 0.74 and values above the cut-off

2.15 indicate a malignant tumour in the organism with a sensitivity of 0.71 and a specificity of 0.62.

Some limitations of the present study must be addressed: We did not perform comparative measurements of Ki-67 and inflammatory parameters directly in the tumour tissue of the respective tumour patients, however this would be recommended for future follow-up studies to achieve even more informative results. As long as the direct comparative studies on Ki-67 release from the tumour tissue and the accompanying micro-tumour environment with the corresponding Ki-67 serum levels and inflammatory parameters in the blood are not yet available, we would like to label our results preliminary for the time being. Furthermore, it would be interesting to measure Ki-67 levels again after tumour therapy, and to compare these follow-up levels with the results at the time of diagnosis. To obtain even more conclusive results, follow-up studies with larger numbers of cases, more homogeneous groups, additional benign tumour types, and age-matched control animals would be recommended. This could also help to make a statement about the prognostic value of Ki-67 as a serum tumour marker.

5. Conclusions

In summary, Ki-67 may be suitable as a general tumour marker to provide early indication of malignant tumour tissue present in the body during a routine examination, suggesting the need for further diagnostic testing for tumour disease, and it is recommended to also include inflammatory parameters, such as neutrophils, lymphocytes, and monocytes in these examinations.

Author Contributions: Conceptualization, S.N.; methodology, A.E. and S.N.; validation, A.E. and S.N.; formal analysis, A.E.; investigation, A.E.; resources, S.N., M.K. and A.W.; data curation, A.E.; writing—original draft preparation, A.E.; writing—review and editing, S.N., M.K., J.H. and A.W.; visualization, A.E. and S.N.; supervision, S.N. and J.H.; project administration, S.N. and J.H.; funding acquisition, S.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the regional authorities for Consumer Protection and Food Safety Acts in Niedersachsen, Germany (reference n° 33.9-42502-05-17A148).

Informed Consent Statement: Dog owners were informed about the aim of the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding author. The data are not publicly accessible due to data protection.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. Cancer Control: Early Detection: Who Guide for Effective Programmes. Available online: https://www.who.int/cancer/publications/cancer_control_detection/en/ (accessed on 15 January 2021).
2. Borrebaeck, C.A. Precision Diagnostics: Moving Towards Protein Biomarker Signatures of Clinical Utility in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 199–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Amayo, A.A.; Kuria, J.G. Clinical Application of Tumour Markers: A Review. *East. Afr. Med. J.* **2009**, *86*, S76–S83. [[PubMed](#)]
4. Kaszak, I.; Ruszczak, A.; Kanafa, S.; Kacprzak, K.; Król, M.; Jurka, P. Current Biomarkers of Canine Mammary Tumours. *Acta Vet. Scand.* **2018**, *60*, 66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bryan, J.N. The Current State of Clinical Application of Serum Biomarkers for Canine Lymphoma. *Front. Veter. Sci.* **2016**, *3*, 87. [[CrossRef](#)]
6. Fukumoto, S.; Miyasho, T.; Hanazono, K.; Saida, K.; Kadosawa, T.; Iwano, H.; Uchide, T. Big endothelin-1 as a tumour marker for canine haemangiosarcoma. *Veter J.* **2015**, *204*, 269–274. [[CrossRef](#)]
7. Ross, T.D.; Scherf, U.; Eisen, M.B.; Perou, C.M.; Rees, C.; Spellman, P.; Iyer, V.; Jeffrey, S.S.; van de Rijn, M.; Waltham, M.; et al. Systematic Variation in Gene Expression Patterns in Human Cancer Cell Lines. *Nat. Genet.* **2000**, *24*, 227–235. [[CrossRef](#)]
8. Kroemer, G.; Pouyssegur, J. Tumour Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell* **2008**, *13*, 472–482. [[CrossRef](#)]
9. Gerdes, J.; Schwab, U.; Lemke, H.; Stein, H. Production of a Mouse Monoclonal Antibody Reactive with a Human Nuclear Antigen Associated with Cell Proliferation. *Int. J. Cancer* **1983**, *31*, 13–20. [[CrossRef](#)]

10. Gerdes, J.; Li, L.; Schlueter, C.; Duchrow, M.; Wohlenberg, C.; Gerlach, C.; Stahmer, I.; Kloth, S.; Brandt, E.; Flad, H.D. Immunobiochemical and Molecular Biologic Characterization of the Cell Proliferation-Associated Nuclear Antigen That Is Defined by Monoclonal Antibody Ki-67. *Am. J. Pathol.* **1991**, *138*, 867–873.
11. Scholzen, T.; Gerdes, J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J. Cell Physiol.* **2000**, *182*, 311–322. [[CrossRef](#)]
12. Cuylen, S.; Blaukopf, C.; Politi, A.Z.; Müller-Reichert, T.; Neumann, B.; Poser, I.; Ellenberg, J.; Hyman, A.A.; Gerlich, D.W. Gerlich, D.W. Ki-67 Acts as a Biological Surfactant to Disperse Mitotic Chromosomes. *Nature* **2016**, *535*, 308–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bullwinkel, J.; Baron-Lühr, B.; Lüdemann, A.; Wohlenberg, C.; Gerdes, J.; Scholzen, T. Ki-67 Protein Is Associated with Ribosomal Rna Transcription in Quiescent and Proliferating Cells. *J. Cell Physiol.* **2006**, *206*, 624–635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rahmzadeh, R.; Hüttmann, G.; Gerdes, J.; Scholzen, T. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif.* **2007**, *40*, 422–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Endl, E.; Hollmann, C.; Gerdes, J. Chapter 18 Antibodies against the Ki-67 protein: Assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. *Methods Cell Biol.* **2001**, *63*, 399–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Yuan, P.; Xu, B.; Wang, C.; Zhang, C.; Sun, M.; Yuan, L. Ki-67 expression in luminal type breast cancer and its association with the clinicopathology of the cancer. *Oncol. Lett.* **2016**, *11*, 2101–2105. [[CrossRef](#)]
17. Soysal, D.S.; Tzankov, A.; Muenst, E.S. Role of the Tumour Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology* **2015**, *82*, 142–152. [[CrossRef](#)]
18. Kim, J.; Bae, J.S. Tumour-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumour Microenvironment. *Mediat. Inflamm* **2016**, *2016*, 6058147. [[CrossRef](#)]
19. Solak, M.; Kraljević, I.; Tomšić, K.Z.; Kaštelan, M.; Kakarigi, L. Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Prognostic Marker in Adrenocortical Carcinoma. *Endocr. Res.* **2021**, *46*, 74–79. [[CrossRef](#)]
20. Lisiecka, U.; Brodzki, P.; Smiech, A.; Kocki, J.; Czop, M.; Adaszek, L.; Winiarczyk, S. Comparative Expression Analysis of Innate Immune Markers and Phagocytic Activity in Peripheral Blood of Dogs with Mammary Tumours. *Animals* **2021**, *11*, 2398. [[CrossRef](#)]
21. Xu, G.; Li, C.; Wang, Y.; Ma, J.; Zhang, J. Correlation between Preoperative Inflammatory Markers, Ki-67 and the Pathological Grade of Glioma. *Medicine* **2021**, *100*, e26750. [[CrossRef](#)]
22. Yilmaz, H.; Demirag, G.; Sullu, Y.; Yilmaz, A. Predictive Significance of Ki-67 and Platelet Lymphocyte Ratio in Patients with Gastric Cancer Receiving Neoadjuvant Flot Chemotherapy. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* **2021**, *30*, 546–552. [[PubMed](#)]
23. Burger, P.C.; Shibata, T.; Kleihues, P. The Use of the Monoclonal Antibody Ki-67 in the Identification of Proliferating Cells: Application to Surgical Neuropathology. *Am. J. Surg. Pathol.* **1986**, *10*, 611–617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kammerer-Jacquet, S.-F.; Ahmad, A.; Möller, H.; Sandu, H.; Scardino, P.; Soosay, G.; Beltran, L.; Cuzick, J.; Berney, D.M. Ki-67 Is an Independent Predictor of Prostate Cancer Death in Routine Needle Biopsy Samples: Proving Utility for Routine Assessments. *Mod. Pathol.* **2019**, *32*, 1303–1309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lellé, R.J. [in Situ Determination of the Ki-67 Growth Fraction (Ki-67 Gf) in Human Tumours (Studies in Breast Cancer)]. *Acta Histochem. Suppl.* **1990**, *39*, 109–124.
26. Menon, S.S.; Guruvayoorappan, C.; Sakthivel, K.M.; Rasmi, R.R. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin. Chim. Acta* **2019**, *491*, 39–45. [[CrossRef](#)]
27. Ragab, H.M.; Samy, N.; Afify, M.; El Maksoud, N.A.; Shaaban, H.M. Assessment of Ki-67 as a potential biomarker in patients with breast cancer. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2018**, *16*, 479–484. [[CrossRef](#)]
28. Ren, A.; Wei, M.; Yang, Y.; Yang, L.; Yang, J. [Detection and value of serum antigen KI-67 (ki67) in clinical diagnosis of breast cancer patients]. *Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* **2020**, *36*, 1124–1128.
29. Neumann, S.; Schuettler, J.; Frenz, M.; Kaup, F.J.; Gessler, F. Investigation of Serum Ki-67 as a Biomarker in Tumour-Bearing Dogs. *Res. Vet. Sci.* **2017**, *110*, 16–21. [[CrossRef](#)]
30. World Health Organization. Tnm Classification of Tumours in Domestic Animals/ Edited by L.N. Owen. Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68618> (accessed on 23 March 2022).
31. Peña, L.; de Andrés, P.J.; Clemente, M.; Cuesta, P.; Pérez-Alenza, M.D. 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* **2013**, *50*, 94–105. [[CrossRef](#)]
32. MyBioSource, Inc. Ki-67 Protein (Ki67p), Elisa Kit. Available online: <https://www.mybiosource.com/ki67p-canine-elisa-kits/ki-67-protein/89640> (accessed on 17 February 2022).
33. Sobocki, M.; Mrourj, K.; Colinge, J.; Gerbe, F.; Jay, P.; Krasinska, L.; Dulic, V.; Fisher, D. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2722–2734. [[CrossRef](#)]
34. Ha, S.Y.; Choi, M.; Lee, T.; Park, C.-K. The Prognostic Role of Mitotic Index in Hepatocellular Carcinoma Patients after Curative Hepatectomy. *Cancer Res. Treat.* **2016**, *48*, 180–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Sledge, D.G.; Webster, J.; Kiupel, M. Canine Cutaneous Mast Cell Tumours: A Combined Clinical and Pathologic Approach to Diagnosis, Prognosis, and Treatment Selection. *Vet. J.* **2016**, *215*, 43–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ustun-Alkan, F.; Bakirel, T.; Üstüner, O.; Anlas, C.; Cinar, S.; Yıldırım, F.; Gürel, A. Effects of tyrosine kinase inhibitor-masitinib mesylate on canine mammary tumour cell lines. *J. Veter. Res.* **2021**, *65*, 351–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Chen, C.; Lu, X. The Expression of Ki-67 and Lef-1 in Patients after Breast Cancer Resection and Its Effects on Patients' Prognosis.

38. Korniluk, A.; Koper, O.; Kemon, H.; Dymicka-Piekarska, V. Dymicka-Piekarska. From Inflammation to Cancer. *Ir. J. Med. Sci.* **2017**, *186*, 57–62. [[CrossRef](#)]
39. Dalkilic, E.; Filiz, G.; Yavuz, M.; Dilek, K.; Ersoy, A.; Yurtkuran, M.; Oruc, A.; Gul, C.B.; Gullulu, M. Ki-67 Proliferation Index in Renal Biopsy Samples of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Its Correlation with Clinical Findings. *Iran. J. Kidney Dis.* **2013**, *7*, 198–203.
40. Karlovits, S.; Manz, A.; Allenspach, K.; Walter, I.; Kummer, S.; Tichy, A.; Richter, B.; Burgener, I.A.; Luckschander-Zeller, N. Ki-67/Cd3 Ratio in the Diagnosis of Chronic Inflammatory Enteropathy in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2020**, *34*, 92–97. [[CrossRef](#)]
41. Kratofil, R.M.; Kubes, P.; Deniset, J.F. Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, *37*, 35–42. [[CrossRef](#)]
42. Herwig, M.C.; Holz, F.G.; Loeffler, K.U. Distribution and Presumed Proliferation of Macrophages in Inflammatory Diseases of the Ocular Adnexae. *Curr. Eye Res.* **2014**, *40*, 604–610. [[CrossRef](#)]
43. Rodrigues, H.; Carvalho, M.I.; Pires, I.; Prada, J.; Queiroga, F.L.; Information, R. Clinicopathological significance of caspase-3 and Ki-67 expression in canine mammary gland tumours. *Acta Veter- Hung.* **2016**, *64*, 78–89. [[CrossRef](#)]
44. Mohseni, S.; Aboerad, M.; Sharifi, F.; Tavangar, S.M.; Mohajeri-Tehrani, M. Associations of Ki-67 Labeling Index with Clinical and Paraclinical Features of Growth Hormone-Secreting Pituitary Adenomas: A Single Center Report from Iran. *Int. J. Endocrinol. Metab.* **2019**, *17*, e81983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Huuhtanen, R.L.; Blomqvist, C.; Wiklund, T.; Böhling, T.; Virolainen, M.J.; Tukiainen, E.J.; Tribukait, B.; Andersson, L.C. Comparison of the Ki-67 score and S-phase fraction as prognostic variables in soft-tissue sarcoma. *Br. J. Cancer* **1999**, *79*, 945–951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Frangioni, J.V. New Technologies for Human Cancer Imaging. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 4012–4021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Tomita, Y.; Morooka, T.; Hoshida, Y.; Zhang, B.; Qiu, Y.; Nakamichi, I.; Hamada, K.; Ueda, T.; Naka, N.; Kudawara, I.; et al. Reassessment of the 1993 Osaka Grading System for Localized Soft Tissue Sarcoma in Japan. *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 4665–4669.
48. Rozolen, J.M.; Teodoro, T.G.W.; Sobral, R.A.; Sueiro, F.A.R.; Laufer-Amorim, R.; Elias, F.; Fonseca-Alves, C.E. Investigation of Prognostic Value of Claudin-5, PSMA, and Ki67 Expression in Canine Splenic Hemangiosarcoma. *Animals* **2021**, *11*, 2406. [[CrossRef](#)]
49. Morello, E.; Cino, M.; Giacobino, D.; Nicoletti, A.; Iussich, S.; Buracco, P.; Martano, M. Prognostic Value of Ki67 and Other Clinical and Histopathological Factors in Canine Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma. *Animals* **2021**, *11*, 1649. [[CrossRef](#)]
50. Gerdes, J.; Dallenbach, F.; Lennert, K.; Lemke, H.; Stein, H. Growth Fractions in Malignant Non-Hodgkin's Lymphomas (Nhl) as Determined in Situ with the Monoclonal Antibody Ki-67. *Hematol. Oncol.* **1984**, *2*, 365–371. [[CrossRef](#)]
51. Valli, V.E.; Myint, M.S.; Barthel, A.; Bienzle, D.; Caswell, J.; Colbatzky, F.; Durham, A.; Ehrhart, E.J.; Johnson, Y.; Jones, C.; et al. Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. *Veter- Pathol.* **2010**, *48*, 198–211. [[CrossRef](#)]
52. Zandvliet, M. Canine lymphoma: A review. *Veter- Q.* **2016**, *36*, 76–104. [[CrossRef](#)]
53. Brown, C.D.; Gatter, K.C. Ki67 Protein: The Immaculate Deception? *Histopathology* **2002**, *40*, 2–11. [[CrossRef](#)]
54. Diez, M.; Picavet, P.; Ricci, R.; Dequenue, M.; Renard, M.; Bongartz, A.; Farnir, F. Health screening to identify opportunities to improve preventive medicine in cats and dogs. *J. Small Anim. Pr.* **2015**, *56*, 463–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kent, M.S.; Burton, J.; Dank, G.; Bannasch, D.; Rebhun, R.B. Association of cancer-related mortality, age and gonadectomy in golden retriever dogs at a veterinary academic center (1989-2016). *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kycko, A.; Reichert, M. Proteomics in the Search for Biomarkers of Animal Cancer. *Curr Protein Pept Sci.* **2014**, *15*, 36–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Simon, R. Sensitivity, Specificity, PPV, and NPV for Predictive Biomarkers. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107*, 8. [[CrossRef](#)]
58. Parikh, R.A.; Mathai, S.; Parikh, G.; Sekhar, C.; Thomas, R. Understanding and Using Sensitivity, Specificity and Predictive Values. *Indian J. Ophthalmol.* **2008**, *56*, 45–50. [[CrossRef](#)]

V. DISKUSSION

Ein Tumormarker ist definitionsgemäß eine messbare Substanz, die Auskunft über das Vorhandensein von Tumorgewebe in einem Organismus gibt (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). Ein Seruntumormarker im Speziellen wird von Tumorzellen selbst oder von anderen Körperzellen als Reaktion auf Tumorgewebe im Organismus in das Blut abgegeben. Erhöhte Konzentrationen von Tumormarkern gelten als ein mögliches Anzeichen für eine Krebserkrankung (TERMS, 2021). Seruntumormarker haben in der Human- und Veterinärmedizin eine zunehmend größere Bedeutung, da sie unter anderem eine weniger invasive Probenentnahme und eine unkomplizierte Messung ermöglichen und schnelle Ergebnisse bereitstellen (SHARMA, 2009; KASZAK et al., 2018). Um in der Veterinärmedizin eine gute Unterscheidung zwischen gesunden und an einem malignen Tumor erkrankten Hunden zu ermöglichen, muss der Tumormarker spezifisch für Tumorgewebe sein. Ki-67 ist ein solcher, spezifischer Biomarker für die Tumorphiliferation, der im Zellzyklus in allen aktiven Phasen, der G₁-, S-, G₂-Phase und der Mitose, exprimiert wird, aber in ruhenden Zellen in der G₀-Phase abwesend ist (BRUNO und DARZYNKIEWICZ, 1992; SCHOLZEN und GERDES, 2000; SOBECKI et al., 2017). Viele Tumorgewebe haben eine relativ hohe Mitoserate (HA et al., 2016) und weisen folglich auch erhöhte Ki-67-Werte auf, die durch Immunhistochemie bestimmt werden können (BURGER et al., 1986). Mittels Immunhistochemie gemessenes Ki-67 kann Auskunft über das biologische Verhalten von Krebserkrankungen geben, wie z. B. bei caninen Mastzelltumoren gezeigt wurde (SLEDGE et al., 2016).

Als Apoptose-Inhibitor, welche für die Entwicklung von malignen Tumoren eine entscheidende Rolle spielen, ist auch Survivin ein spezifischer Marker für Tumorgewebe (YAMAZAKI et al., 2013). Von Interesse für die vorliegenden Untersuchungen von Serumkonzentrationen der Tumormarker Survivin und Ki-67 bei Hunden waren demnach, ob diese Tumormarker Informationen über das Vorhandensein eines Tumors im Allgemeinen, die Herkunft des Tumorgewebes im Speziellen und darüber, ob es sich um einen malignen oder benignen Tumor handelt, liefern kann. Es wurde zudem untersucht, ob die Serumkonzentration eines oder beider Tumormarker Aufschluss über die Prognose der Tumorerkrankungen der Patienten geben kann, indem die Überlebenszeit der Hunde beobachtet wurde (HENRY, 2010; MOBASHERI und CASSIDY, 2010).

Survivin-Konzentrationen im Serum

Alle Hunde in dieser Studie, die an einem bösartigen Tumor litten, wiesen messbare Survivin-Konzentrationen im Serum auf. Ein vergleichbares Ergebnis liefert hierzu eine humanmedizinische Studie, in der die diagnostische Aussagekraft von Survivin bei Brustkrebspatientinnen untersucht wurde, darin wiesen 95% der Patientinnen mäßige bis hohe Serum-Survivin-Konzentrationen von 50-200 pg/ml auf (KHAN et al., 2014). Eine veterinärmedizinische Studie an Hunden mit Mammatumoren ergab eine durchschnittliche erhöhte Serum-Survivin-Konzentration von 110 pg/ml (JENA et al., 2019). In der gesunden Kontrollgruppe der oben genannten Studie wurden analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit niedrige Survivin-Konzentrationen von im Durchschnitt 30,3 pg/ml im Serum festgestellt. Eine gewisse physiologische Basisproduktion bei erwachsenen Individuen wurde auch in der Humanmedizin beschrieben, wobei bisher noch unbekannt ist, warum gesunde erwachsene Menschen und Tiere Survivin produzieren. Es wird dabei häufig in Geweben mit hoher Proliferationsrate gefunden, wie beispielsweise in der Mukosa (LECHLER et al., 2007; LODI et al., 2010). Survivin tritt auch bei Tieren, die an nicht-neoplastischen Erkrankungen leiden, auf und zwar sowohl bei entzündlichen, als auch bei nicht-entzündlichen Erkrankungen. Die Survivin-Konzentrationen bei Menschen und Hunden mit nicht-neoplastischen Erkrankungen sind jedoch deutlich niedriger als bei Individuen mit malignen Tumoren (MONTORSI et al., 2007; GRAVINA et al., 2017; JENA et al., 2019). Die gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wiesen signifikante Unterschiede zwischen den Survivin-Konzentrationen der Gruppen mit malignen Tumoren im Vergleich zu denen von gesunden Hunden und Hunden mit nicht-neoplastischen Erkrankungen auf, was die oben angeführten Studienergebnisse bestätigt. Der nicht signifikante Unterschied zwischen den Hunden mit Plattenepithelkarzinomen und den Hunden mit nicht-neoplastischen Erkrankungen zeigt aber mögliche Einschränkungen für die Verwendung von Survivin als allgemeinen Tumormarker.

Ein ausgezeichneter Tumormarker sollte zudem auch zwischen malignen Tumoren und benignen Prozessen unterscheiden können (KASZAK et al., 2018). Die Histopathologie ist nach wie vor der Goldstandard für die Unterscheidung zwischen gutartigen und bösartigen Tumoren und den Malignitätsgraden (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die Survivin-Konzentrationen von benignen und malignen Mammatumoren unterscheiden, die Studie beinhaltete aber nur eine kleine Gruppe von Hunden mit Adenomen der Mamma. Diese hatten deutlich niedrigere Serum-

Survivin-Konzentrationen als die Hunde mit malignen Tumoren. Dies stimmt mit den Ergebnissen beim Menschen überein, bei denen die Survivin-Konzentrationen bei Patientinnen in den späteren Stadien von Brustkrebs (II-IV) deutlich höher waren (KHAN et al., 2014). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Messung von Survivin im Serum möglicherweise ein wenig invasiver Indikator zur Unterscheidung zwischen malignen und benignen Mammatumoren bei Hunden sein kann.

Ki-67-Konzentrationen im Serum

Auch zur Untersuchung von Ki-67 im Serum liegen bereits Studien vor. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde die Ki-67-Konzentration im caninen Serum untersucht und zeigte vergleichbare Ergebnisse (NEUMANN et al., 2017). Des Weiteren wurde darin eine Gruppe gesunder Hunde mit nicht nachweisbaren Ki-67-Serumkonzentrationen mit Gruppen von Hunden mit verschiedenen nicht-malignen Erkrankungen und mit malignen Tumoren verglichen. Die Ki-67-Konzentrationen im Serum lagen in der Kontrollgruppe der Hunde mit nicht-malignen Erkrankungen zwischen 0 und 69 pg/ml (Median 0 pg/ml) bzw. in der Gruppe der malignen Tumoren zwischen 0 und 7500 pg/ml (Median 243 pg/ml), was einen hochsignifikanten Unterschied in den Ki-67-Konzentrationen im Serum zwischen allen drei Gruppen ergab (NEUMANN et al., 2017). Die Ergebnisse der aktuellen Studie sind vergleichbar, obwohl die Ki-67-Konzentrationen im Serum leicht voneinander abweichen. Eine mögliche Ursache für diese Abweichung stellt die Verwendung unterschiedlicher ELISA-Kits dar. Bei der Bestimmung von Ki-67 als Serumtumormarker wird daher empfohlen, immer das gleiche ELISA-Kit zu verwenden oder mit individuellen Cut-offs für das jeweils verwendete Testkit zu arbeiten. Aufgrund dieser Beobachtungen ist anzunehmen, dass Ki-67 ein wertvoller Tumormarker sein kann, der auf das potentielle Vorhandensein von Tumorgewebe im Körper hinweist. Alle gesunden Patienten in der vorliegenden Studie hatten Ki-67-Konzentrationen im Serum, die im unteren Nachweisbereich des ELISA lagen. Da es in dieser Gruppe keine Ausreißer gab, ist eine Ki-67-Serumkonzentration im niedrigen Pikogramm-Bereich als physiologisch für gesunde Hunde zu betrachten. Die sehr niedrigen Ausgangskonzentrationen, die im Serum gesunder Hunde messbar sind, sind zu erwarten, da Ki-67 als Proliferationsmarker in gewissem Maße auch von schnell proliferierenden normalen Geweben in einem gesunden Organismus, z. B. von sich teilenden normalen Schleimhaut- oder Knochenmarkzellen, produziert wird (SCHOLZEN und GERDES, 2000). In einer Studie an menschlichen Brustkrebspatientinnen war auch im Serum der gesunden Kontrollgruppe

eine Ki-67-Basiskonzentration vorhanden. Ähnlich wie in dieser Studie war der Wert bei tumorfreien Personen deutlich niedriger als in der Tumorgruppe (CHEN und LU, 2020). Die Kontrollgruppe der erkrankten Hunde ohne Malignität in dieser Studie war von verschiedenen entzündlichen, metabolischen oder degenerativen Prozessen betroffen. Die Ki-67-Serumkonzentrationen waren in dieser Gruppe ebenfalls deutlich niedriger als in der Gruppe der Hunde mit bösartigen Tumoren, aber deutlich höher als bei den gesunden Hunden. Dies könnte durch eine Proliferation von Immunzellen bei entzündlichen Prozessen erklärt werden (KORNILUK et al., 2017). Ebenso wurde eine höhere Expression von Ki-67 bei immunmedierten Krankheiten sowohl bei Menschen als auch bei Hunden nachgewiesen (DALIKILIC et al., 2013; KARLOVITS et al., 2020). Akute entzündliche Erkrankungen in der Gruppe der Hunde mit nicht-neoplastischen Erkrankungen, wie z. B. Pyometra, waren häufig mit Neutrophilie und Monozytose verbunden. Im Falle einer Entzündung können aus Monozyten hervorgegangene Makrophagen zur Verstärkung der gewebeeigenen Makrophagen rekrutiert werden (KIM und BAE, 2016; KRATOFIL et al., 2017). Makrophagen zeigen im Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen eine erhöhte Proliferation und damit eine erhöhte Ki-67-Expression, was zu höheren Ki-67-Konzentrationen im Serum führen kann (HERWIG et al., 2015). Monozyten und Lymphozyten, die bereits im Zusammenhang mit Entzündungen erwähnt wurden, spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Tumormikroumgebung und beeinflussen das Tumorstadium und das Fortschreiten der Erkrankung (SOYSAL et al., 2015; KIM und BAE, 2016; LISIECKA et al., 2021). Um die Entzündung als Teil der Wechselbeziehung zwischen Tumorgewebe und Immunabwehrmechanismen zu berücksichtigen, wurden Quotienten aus den Ki-67-Konzentrationen und der gemessenen Konzentration der Immunzellen im peripheren Blut des begleitenden diagnostischen Routine-Blutbildes berechnet. Damit sollte die Aussagefähigkeit der Ki-67-Serumkonzentration verbessert werden. In den folgenden zwei aktuellen humanmedizinischen Studien zum Gliom und zum Nebennierenrindenzellkarzinom wurde beispielsweise die Ratio von Lymphozyten zu Neutrophilen mit dem immunhistochemisch bestimmten Ki-67-Index in Verbindung gebracht, und erhöhte Quotienten und erhöhte Ki-67-Indizes konnten mit höheren pathologischen Graden oder einem erhöhten Risiko eines Tumorzurückfalls in Verbindung gebracht werden (SOLAK et al., 2021; XU et al., 2021). Zu diesem Zweck wurden die Ki-67-Konzentrationen im Serum und die Anzahl der Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten im Blut von Hündinnen mit Adenokarzinomen der Mamma mit denen von Adenomen der Mamma

verglichen. Eine Unterscheidung zwischen benignen und malignen Mammatumoren war mit dieser Methode im vorliegenden Fall jedoch nicht möglich. Eine denkbare Theorie für dieses Ergebnis wäre, dass die Mikroumgebung des Tumors zum Zeitpunkt der Blutabnahme nicht besonders aktiv war oder dass die entsprechenden Entzündungszellen eher im umgebenden Tumorgewebe als im peripheren Blut vorhanden waren. Der immunhistochemische Nachweis von Ki-67 könnte hier überlegen sein (RODRIGUES et al., 2016). Um hierüber genauere Aussagen treffen zu können, müssten in der gleichen Studie Ki-67 und ggf. Entzündungsparameter, die von Interesse sind, vergleichend im Blut von Hunden mit Tumoren und immunhistochemisch im jeweiligen Tumorgewebe gemessen werden.

Korrelation Tumormarker/ Tumorzellen

Gemäß der vorliegenden Serumkonzentrationen der beiden Tumormarker Survivin und Ki-67 unterschieden sich Hunde mit malignen Tumoren deutlich von den Vergleichsgruppen der gesunden Hunde und den Hunden mit nicht-neoplastischen Erkrankungen. Diese Tatsache bestätigt die zugrundeliegende Hypothese, dass Survivin und Ki-67 bei Patienten mit bösartigen Tumoren erhöht ist und somit als Tumormarker eingesetzt werden kann. Im Hinblick auf eine mögliche Differenzierung zwischen benignen und malignen Tumoren wurde auch das Tumorzellen in Relation zu den Tumormarkern in Augenschein genommen. Hierbei wurde bei den benignen Mammatumoren zwischen der Survivin-Konzentration im Serum und dem Tumorzellen eine Korrelation festgestellt. Das Fehlen eines messbaren Zusammenhanges zwischen der Survivin-Konzentration im Serum und dem Tumorzellen bei malignen Mammatumoren könnte auf die unterschiedlichen Produktionsmengen im Gewebe zurückzuführen sein, die durch verschiedene Mechanismen verursacht werden, wie z.B. eine erhöhte Anzahl mitotischer Tumorzellen und eine erhöhte Apoptoseresistenz (WHEATLEY und ALTIERI, 2019).

Setzt man gemäß den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen das Tumorzellen mit der Serumkonzentration von Ki-67 ins Verhältnis, so ergibt sich weder bei den malignen noch bei den benignen Mammatumoren eine Korrelation zwischen der Ki-67-Konzentration im Serum und dem Tumorzellen. In der Literatur wurden unterschiedliche Zusammenhänge zwischen der Tumorzellen und der Höhe des Ki-67-Index festgestellt. Während zwei Studien bei Hypophysenadenomen und Weichteilsarkomen keinen Zusammenhang mit der Größe feststellten (HUUHTANEN et al., 1999; MOHSENI et al., 2019), berichteten andere über eine

von der Tumorgröße abhängige Ki-67-Expression bei Patientinnen mit Brustkrebs (RAGAB et al., 2018). Wenn die Erhöhung der Tumormarker im Blut bei bösartigen Tumoren unabhängig vom Tumolvolumen ist, könnte dies nützlich sein, um kleine Tumoren zu erkennen, die mit bildgebenden Verfahren noch nicht nachweisbar sind. Klassische bildgebende Verfahren zur Tumorsuche erfordern den Angaben zufolge für die Visualisierung eine Masse von mindestens 10⁹ Zellen (FRANGIONI, 2008). Weitere Studien sind erforderlich, um die Mindesttumorgröße zu ermitteln, die erforderlich ist, um die Serumkonzentrationen eines Tumormarkers wie Survivin oder Ki-67 zuverlässig über die Basiskonzentration hinaus ansteigen zu lassen. Bei Verwendung als Screening-Instrument für Malignität könnte ein erhöhter Survivin- oder Ki-67-Serumspiegel eine Intensivierung der Tumorsuche oder den Einsatz empfindlicherer Bildgebungsverfahren erforderlich machen.

Unterscheidung zwischen verschiedenen Tumorentitäten

Dieser vorliegenden Studie zufolge kann weder Survivin noch Ki-67 zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Krebsarten verwendet werden, da sich die Konzentrationen bei den verschiedenen Tumorentitäten nicht signifikant unterscheiden. Ähnliche Ergebnisse wurden in der Humanmedizin ermittelt (GUNALDI et al., 2018). Hierbei traten bei Patienten mit Dickdarm-, Eierstock-, Brustkrebs sowie weiteren Krebsarten hohe Serum-Survivin-Konzentrationen auf, wobei es nicht möglich war, zwischen den verschiedenen Tumorentitäten zu unterscheiden. In Arbeiten zu immunhistochemischen Untersuchungen der Ki-67-Expression wird diese meist innerhalb einer bestimmten Tumorgruppe ausgewertet, die jeweiligen Ergebnisse variieren dabei je nach Tumorgruppe (BROWN und GATTER, 2002). Die veterinärmedizinische Literatur bietet derzeit noch keinen Aufschluss über den direkten Vergleich von Survivin- oder Ki-67-Konzentrationen im Serum verschiedener Tumorentitäten. Aus der vorliegenden Arbeit geht im Einklang dazu hervor, dass Survivin und Ki-67 zwar einen Hinweis auf das Vorhandensein eines malignen Tumors im Organismus geben können, jedoch noch nicht dazu genutzt werden können, zwischen den verschiedenen Tumorentitäten zu unterscheiden. Im Vergleich zu den anderen kommerziell erhältlichen Tumormarkern in der Veterinärmedizin wie dem Plasmaprotein AFP und dem Glykoprotein CEA weisen Survivin und auch Ki-67 jedoch eine größere Auswahl an Tumoren nach, während AFP nur bei Leberzellkarzinomen (YAMADA et al., 1999) und multizentrischen Lymphomen (LECHOWSKI et al., 2002) hohe Konzentrationen aufweist und CEA ein vielversprechender Marker für die Mammatumoren bei Hunden ist (KASZAK et al., 2018).

Prognostische Aussagekraft der Tumormarker Survivin und Ki-67

Tumormarker können wichtige Informationen über den Ausgang einer Krebserkrankung für einen Patienten liefern. Die prognostische Bedeutung von Survivin wurde beim Menschen untersucht, wobei höhere Survivin-Konzentrationen mit einer schlechteren Prognose und niedrigeren Überlebensraten in Verbindung gebracht wurden (KHAN et al., 2014; VEIGA et al., 2019; WHEATLEY und ALTIERI, 2019). In der Veterinärmedizin wurde die prognostische Bedeutung von Survivin in erster Linie bei Osteosarkomen und Tumoren des kutanen und subkutanen Gewebes untersucht, wobei je nach Tumorentität unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden (SHOENEMAN et al., 2012; KAVYA et al., 2017). In der hier präsentierten Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der Survivin-Konzentration im Serum und dem Krankheitsverlauf hergestellt werden, da die Datenlage zu den Folgeuntersuchungen der vorgestellten Hunde zu gering war.

Auch bei Ki-67 konnte hier keine prognostische Aussagekraft in Hinblick auf die Überlebenszeit der Patienten ermittelt werden. Bei Menschen mit Weichteilsarkomen wurde eine Korrelation zwischen höheren Ki-67-Konzentrationen und einer schlechteren Prognose festgestellt (HUUHTANEN et al., 1999). Auch in der hier ausgeführten Studie hatten einige Patienten mit Weichteilsarkomen und hohen Ki-67-Konzentrationen kurze Überlebenszeiten, aber diese Beobachtungen waren statistisch nicht signifikant. Dies könnte mit der Heterogenität der Tumoren in dieser Gruppe und der geringen Fallzahl zusammenhängen. In der Veterinärmedizin werden je nach Tumorart unterschiedliche Ergebnisse gefunden: Bei Hämangiosarkomen der Milz und Mamma-Adenokarzinomen sind höhere Ki-67-Indizes mit einer schlechteren Prognose verbunden, während bei Adenokarzinomen der apokrinen Drüsen des Hundes keine Korrelation hinsichtlich der Überlebenszeit gefunden wurde (KASZAK et al., 2018; MORELLO et al., 2021; ROZOLEN et al., 2021). Es sind jedoch größere Studien zu dieser Frage erforderlich.

Sensitivität & Spezifität der Tumormarker Survivin und Ki-67

Die ROC-Kurve (Receiver Operating Characteristic) wird in der klinischen Biochemie verwendet, um den besten Cut-off-Wert für Tests zu bestimmen und um zwischen kranken und gesunden Patienten zu unterscheiden. Darüber hinaus veranschaulicht die AUC (Area under the curve) die Zuverlässigkeit des jeweiligen Tests (ROSS et al., 2000; HOO et al., 2017). Den Daten zufolge wurden Serum-Survivin-Konzentrationen über 53 pg/ml mit einem malignen Tumor mit einer Sensitivität von 0,67 und einer Spezifität von 0,95 in Verbindung

gebracht. Hier wurde eine AUC von 0,88 ermittelt. Eine Studie zur Untersuchung der Serum-Survivin-Konzentration bei menschlichen Patienten mit verschiedenen Tumoren ergab eine AUC von 0,66 (GUNALDI et al., 2018). In einer Humanstudie zu kolorektalem Krebs hatte CEA eine AUC von 0,88 (WANG et al., 2014). In einer kürzlich durchgeführten veterinärmedizinischen Studie wurde die ROC-Kurve auch für CEA berechnet (SENHORELLO et al., 2020).

Ein Anstieg der AUC sowie der Sensitivität und Spezifität der Survivin-Konzentrationen wurde durch die Berechnung des Verhältnisses zwischen Survivin und der Lymphozytenzahl verzeichnet, ähnlich wie in anderen Studien (HU et al., 2018). Grundlage für diese Kalkulationen ist die Beobachtung, dass Entzündungsmediatoren in der Mikroumgebung des Tumors, wie z. B. Lymphozyten und andere Immunzellen, die Proliferation, Angiogenese, Invasion und Progression von Tumorzellen unterstützen (CARVALHO et al., 2014). Auf diese Weise kann eine Korrelation zwischen den Tumormarkern und der Anzahl der Immunzellen hergestellt werden (CARVALHO et al., 2014; HU et al., 2018).

Auch bei den Untersuchungen der Ki-67-Konzentrationen wurde eine ROC-Analyse zur Unterscheidung zwischen gesunden Hunden und Hunden mit malignen Tumoren durchgeführt, welche ergab, dass Ki-67-Konzentrationen im Serum über 1,15 ng/ml mit einer Sensitivität von 0,89 und einer Spezifität von 0,95 mit dem Vorhandensein eines malignen Tumors verbunden waren. Auf der Grundlage der ermittelten Daten wurde die AUC hier mit einem Wert von 0,97 berechnet. Die ROC-Analyse zur Unterscheidung zwischen nicht neoplastisch erkrankten Hunden und Hunden mit bösartigen Tumoren ergab, dass Ki-67-Serumkonzentrationen über 1,9 ng/ml auf einen bösartigen Tumor im Organismus hinweisen und mit einer Sensitivität von 0,63 und einer Spezifität von 0,62 sowie einer AUC von 0,66 verbunden sind. Wird der Cut-off-Wert auf 1,26 ng/ml gesenkt, erhöht sich die Sensitivität auf 0,81 und damit die Zahl der wirklich positiven Ergebnisse, gleichzeitig sinkt jedoch die Spezifität auf 0,23. Wird der Cut-off auf 2,52 ng/ml gesetzt, erhöht sich die Spezifität auf 0,81 und die Rate der wirklich negativen Ergebnisse steigt, während die Sensitivität auf 0,43 sinkt (PARIKH et al., 2008). Die Anwendung des Ki-67-Monozyten-Verhältnisses für die ROC-Analyse zur Unterscheidung zwischen nicht-neoplastisch erkrankten Hunden und Hunden mit bösartigen Tumoren verbessert die AUC auf einen Wert von 0,74. Werte über dem Cut-off-Wert von 2,15 weisen auf einen bösartigen Tumor im Organismus hin, wobei die Sensitivität bei 0,71 und die Spezifität bei 0,62 liegt.

Einschränkungen der Studie

Im Folgenden werden die Einschränkungen im Rahmen dieser Arbeit thematisiert. Die Unterschiede in den Survivin-Konzentrationen zwischen den malignen Tumorarten konnten aufgrund der geringen Anzahl von Hunden in der Gruppe mit den malignen Tumoren nicht bestimmt werden. Außerdem gab es Ausreißer in der Gruppe der Hunde mit Lymphomen (2.364 pg/ml) und in der Gruppe der Hunde mit mesenchymalen Tumoren (5.906 pg/ml), die zum aktuellen Zeitpunkt nicht erklärt werden können. Daher sind weitere Studien mit einer größeren Anzahl von Hunden erforderlich.

Auch die Ki-67-Konzentrationen im Serum waren bei einigen Lymphompatienten dieser Studie sehr hoch. Dies überrascht aber nicht unbedingt, da Lymphome eine heterogene Gruppe von Tumoren mit sehr unterschiedlichen, aber im Allgemeinen hohen Ki-67-Expressionen sind (GERDES et al., 1984). Es sollte erwähnt werden, dass die Hunde mit malignen Lymphomen nicht weiter klassifiziert wurden (VALLI et al., 2011). Es werden keine großen Unterschiede in den Ki-67-Konzentrationen im Serum zwischen T-Zell- und B-Zell-Lymphomen erwartet, da high-grade Lymphome in der Regel eine hohe Proliferationsrate aufweisen, unabhängig vom Immunphänotyp. Von Unterschieden ist hier eher zwischen low-grade und high-grade Lymphomen auszugehen (ZANDVLIET, 2016). Das Vorhandensein von Ki-67 gibt zudem nur Aufschluss über die Wahrscheinlichkeit, dass sich bestimmte Zellen teilen könnten, nicht aber über die tatsächliche Proliferationsrate. Daher werden zusätzliche Tests empfohlen, zum Beispiel ein weiterer Marker (SCHOLZEN und GERDES, 2000). Es wurden in der vorliegenden Arbeit keine vergleichenden Messungen von Survivin bzw. Ki-67 und Entzündungsparametern direkt im Tumorgewebe der jeweiligen Tumorpatienten durchgeführt, was jedoch für zukünftige Folgestudien zu empfehlen wäre, um noch aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten. Solange die direkten Vergleichsstudien zur Survivin- und Ki-67-Freisetzung aus dem Tumorgewebe und der begleitenden Mikrotumorumgebung mit den entsprechenden Survivin- und Ki-67-Serumspiegeln und Entzündungsparametern im Blut noch nicht vorliegen, sind die Ergebnisse dieser Studie noch als vorläufig zu sehen. Darüber hinaus wäre es interessant, die Survivin- bzw. Ki-67-Werte nach einer Tumorthherapie erneut zu messen und mit den Ergebnissen zum Zeitpunkt der Diagnose zu vergleichen. Um noch aufschlussreichere Ergebnisse zu erhalten, wären Folgestudien mit größeren Fallzahlen, homogeneren Gruppen, zusätzlichen gutartigen Tumorarten und altersgleichen Kontrolltieren empfehlenswert. Dies könnte auch helfen, eine

Aussage über den prognostischen Wert von Survivin und Ki-67 als Serumentumormarker zu treffen.

Abschließend ist festzuhalten, dass die Survivin- und Ki-67-Konzentrationen im Serum von Hunden mit malignen Tumoren jeweils höher sind als die von Hunden mit nicht-tumorösen Erkrankungen und gesunden Hunden. Andererseits konnten weder Survivin noch Ki-67 zwischen verschiedenen Tumorentitäten differenzieren oder prognostische Informationen liefern. Die angeführten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Survivin und Ki-67 als Serumentumormarker als nicht-selektives Screening-Instrument für Malignität bei Vorsorgeuntersuchungen nützlich sein können, insbesondere bei älteren Hunden oder bei Hunden mit erhöhtem rassespezifischem Tumorrisiko (DIEZ et al., 2015; KENT et al., 2018). Speziell bei Tieren, die zu einer Routineuntersuchung vorgestellt werden und bei denen keine Angaben zur Anamnese oder Untersuchungsergebnisse vorliegen, die auf eine Entzündung oder Infektion hindeuten, sollten erhöhte Survivin- und Ki-67-Serumwerte eine intensive Suche nach einer potentiellen malignen Tumorerkrankung mit Hilfe bildgebender Verfahren und anderer Modalitäten nach sich ziehen (KYCKO und REICHERT, 2014). Der klinische Nutzen eines jeden Tests hängt von seiner Sensitivität und Spezifität ab (SIMON, 2015).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Zielsetzung

Serumtumormarker finden in der Veterinärmedizin bisher kaum Anwendung, obwohl sie wenig invasiv sind, schneller zu einer Diagnosefindung beitragen und neue Therapieoptionen aufzeigen können. Die beiden vielversprechenden Tumormarker Survivin und Ki-67 werden in dieser Arbeit im Hinblick auf dieses Anliegen eingehender betrachtet.

Das Apoptose-hemmende Protein Survivin wird unter physiologischen Bedingungen vor allem in embryonalem Gewebe nachgewiesen und spielt u.a. eine wichtige Rolle in der Mitose, indem es an die Chromosomen andockt und die richtige Trennung der Schwesterchromatiden koordiniert. In adulten Organismen wird Survivin im Wesentlichen nur von malignem Gewebe produziert und ist daher als Marker zur Detektion von malignen Tumoren interessant.

Das Zellkernprotein Ki-67 wird im Laufe des Zellzyklus in der G₁-, S-, G₂- und M-Phase, nicht jedoch in der G₀-Phase nachgewiesen. Die Ki-67-Proteinstruktur weist für Tenside charakteristische Eigenschaften auf und sorgt damit in der Prophase der Mitose für die räumliche Trennung und Stabilität der Chromosomen nach dem Zerfall der Zellkernmembran und auch ein inhibierender Effekt von Ki-67 auf die RNS-Synthese wurde nachgewiesen. Folglich wird es in der Forschung als Marker für den Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtzellpopulation verwendet und kann damit Aufschluss über neoplastisches Gewebe im Organismus geben.

Überexpression von Survivin und Ki-67 in neoplastischen Zellen wird in der Humanmedizin mit kürzerer Überlebensdauer, höherer Rezidivwahrscheinlichkeit und reduzierter Apoptoserate in Verbindung gebracht.

Diese Arbeit soll durch die Bestimmung der caninen Serumkonzentration der Biomarker Survivin und Ki-67 zeigen, ob diese als potentielle, canine Tumormarker für die Tiermedizin von Nutzen sein können.

Methoden

In dieser Studie haben wir die Serumkonzentrationen von Survivin und Ki-67 bei Hunden mit verschiedenen malignen Tumoren (Adenokarzinome der Mamma, Plattenepithelkarzinome, Weichteilsarkome, Lymphome) gemessen. Die Survivin- und Ki-67-Konzentrationen wurden jeweils mit denen einer Gesundgruppe und einer Gruppe Hunde mit nicht-neoplastischen Erkrankungen verglichen.

Der Tumormarker Survivin wurde mittels eines kommerziell erhältlichen, kompetitiven, caninen ELISAs von BlueGene gemessen und die Werte des Tumormarkers Ki-67 wurden mittels eines kommerziell erhältlichen, quantitativen Sandwich-ELISAs von mybiosource ermittelt.

Ergebnisse

Die Survivin-Konzentrationen im Serum bei den Hunden mit Neoplasien lagen zwischen 15 und 5906 pg/ml (Median 72 pg/ml), die Konzentrationen der gesunden Hunde zwischen 7 und 99 pg/ml (Median 21 pg/ml) und diejenigen der Hunde mit nicht-neoplastischen Erkrankungen zwischen 15 und 93 pg/ml (Median 42 pg/ml).

Hunde mit malignen Tumoren zeigten signifikant höhere Survivin-Serumkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Hunden ($p < 0,001$) und Hunden mit nicht-neoplastischen Erkrankungen ($p = 0,006$). Zwischen den verschiedenen Tumorgruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Survivin-Serumkonzentration feststellen.

Die Ki-67-Konzentrationen im Serum bei den Hunden mit Neoplasien lagen zwischen 1,0 und 19,0 ng/ml (Mittelwert 2,0 ng/ml), bei den Hunden mit nicht-neoplastischen Erkrankungen zwischen 0,51 und 3,6 ng/ml (Median 1,79 ng/ml) und die Konzentrationen bei gesunden Hunden zwischen 0 und 1,88 ng/ml (Median 0,29 ng/ml). Hunde mit malignen Tumoren zeigten signifikant höhere Ki-67-Serumkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Hunden ($p < 0,0001$) und auch im Vergleich zu nicht-neoplastisch erkrankten Hunden ($p = 0,027$).

Zwischen den verschiedenen Tumorgruppen ließ sich auch bei den Ki-67-Serumkonzentrationen kein signifikanter Unterschied feststellen.

Die Serumkonzentrationen beider Tumormarker waren unabhängig von Alter, Gewicht und Tumorgröße der jeweiligen Hunde. Das Einbeziehen von verschiedenen Entzündungsparametern im Blut wie Neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten lieferte nur teilweise signifikante Ergebnisse.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit lassen die Annahme zu, dass Survivin und Ki-67 als Tumormarker bei Hunden mit bösartigen Tumoren großes Potential haben und Informationen über das Vorhandensein von malignem Tumorgewebe im Organismus liefern könnten.

VII. SUMMARY

Objectives

Serum tumour markers have rarely been used in veterinary medicine, despite the fact that they are less invasive, contribute to a faster diagnosis and can reveal new therapeutic options. The two promising tumour markers survivin and Ki-67 are reviewed in more detail in this work with this objective in mind.

Under physiological conditions, the apoptosis-inhibiting protein survivin is detected mainly in embryonic tissues and plays an important role in mitosis by attaching to chromosomes and coordinating the correct segregation of sister chromatids. In adult individuals, survivin is essentially only produced by malignant tissue and is therefore of interest as a marker for the detection of malignant tumours.

The nuclear protein Ki-67 is detected during the cell cycle in G₁, S, G₂ and M phase, but not in G₀ phase. The Ki-67 protein structure exhibits properties characteristic of surfactants and thus provides spatial separation and stability of chromosomes after nuclear membrane disruption in the prophase of mitosis, and an inhibitory effect of Ki-67 on RNA synthesis has also been demonstrated.

Consequently, it is used in research as a marker for the percentage of proliferating cells in the total cell population and can thus provide information about neoplastic tissue in an organism.

Overexpression of survivin and Ki-67 in neoplastic cells has been associated with shorter survival, higher probability of recurrence and reduced rate of apoptosis in human medicine.

By determining the canine serum concentration of the tumour markers survivin and Ki-67, this work aims to show whether these can be useful as potential canine tumour markers for veterinary medicine.

Methods

In this study, we measured serum concentrations of survivin and Ki-67 in dogs with various malignant tumours (canine mammary adenocarcinomas, squamous cell carcinomas, soft tissue sarcomas, lymphomas). Survivin and Ki-67 concentrations were compared with those of a healthy group and a group of dogs with non-neoplastic diseases, respectively.

The tumour marker survivin was measured using a commercially available competitive canine ELISA from BlueGene, and levels of the tumour marker Ki-67 were determined using a commercially available quantitative sandwich ELISA from mybiosource.

Results

Serum survivin concentrations in dogs with neoplasms ranged from 15 to 5906 pg/ml (median 72 pg/ml), concentrations in healthy dogs ranged from 7 to 99 pg/ml (median 21 pg/ml), and those in dogs with non-neoplastic diseases ranged from 15 to 93 pg/ml (median 42 pg/ml). Dogs with malignant tumours showed significantly higher serum survivin concentrations compared to healthy dogs ($p < 0.001$) and dogs with non-neoplastic diseases ($p = 0.006$). No significant difference in serum survivin concentrations could be detected between the different tumour groups.

Serum Ki-67 concentrations in dogs with neoplasia ranged from 1.0 to 19.0 ng/ml (mean 2.0 ng/ml), in dogs with non-neoplastic diseases from 0.51 to 3.6 ng/ml (median 1.79 ng/ml), and concentrations in healthy dogs ranged from 0 to 1.88 ng/ml (median 0.29 ng/ml). Dogs with malignant tumours showed significantly higher serum Ki-67 concentrations compared to healthy dogs ($p < 0.0001$) and also compared to non-neoplastic diseased dogs ($p = 0.027$). There was no significant difference in serum Ki-67 concentrations between the different tumour groups.

Serum concentrations of both tumour markers were independent of age, weight and tumour size of the respective dogs. The inclusion of various inflammatory parameters in the blood such as neutrophil granulocytes, lymphocytes and monocytes provided only partially significant results.

Conclusion

The results of this dissertation suggest that survivin and Ki-67 have considerable potential as tumour markers in dogs with malignant tumours and could provide information about the presence of malignant tumour tissue in the organism.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998; 152: 43-9.
- Akpınar U, Gur Aksoy G, Hayran Y, Firat Oguz E, Yalcin B. Serum levels of survivin in patients with psoriasis and their relation to disease characteristics. *J Cosmet Dermatol* 2022; 21: 1721-6.
- Ali MS, Harmer M, Vaughan R. Serum S100 protein as a marker of cerebral damage during cardiac surgery. *Br J Anaesth* 2000; 85: 287-98.
- Alizadeh-Fanalou S, Alian F, Mohammadhosayni M, Rahban D, Abbasi Ghasem Kheyli P, Ahmadi M. Dysregulation of microRNAs regulating survivin in CD4+ T cells in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 2020; 44: 102303.
- Altieri DC, Marchisio PC. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* 1999; 79: 1327-33.
- Amayo AA, Kuria JG. Clinical application of tumour markers: a review. *East Afr Med J* 2009; 86: S76-83.
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-21.
- Andrejeva G, Rathmell JC. Similarities and Distinctions of Cancer and Immune Metabolism in Inflammation and Tumors. *Cell Metab* 2017; 26: 49-70.
- Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol* 2017; 76: 9 23 1-9 17.
- Assadiasl S, Mousavi MJ, Amirzargar A. Antiapoptotic Molecule Survivin in Transplantation: Helpful or Harmful? *J Transplant* 2018; 2018: 6492034.
- Barsoum AL, Schwarzenberger PO. Oncofetal antigen/immature laminin receptor protein in pregnancy and cancer. *Cell Mol Biol Lett* 2014; 19: 393-406.
- Bidard FC, Proudhon C, Pierga JY. Circulating tumor cells in breast cancer. *Mol Oncol* 2016; 10: 418-30.
- Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95.
- Bohling SD, Allison KH. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. *Mod Pathol* 2008; 21: 1527-32.
- Bokarewa M, Lindblad S, Bokarew D, Tarkowski A. Balance between survivin, a key member of the apoptosis inhibitor family, and its specific antibodies determines erosivity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R349-58.
- Bongiovanni L, Colombi I, Fortunato C, Della Salda L. Survivin expression in canine epidermis and in canine and human cutaneous squamous cell carcinomas. *Vet Dermatol* 2009; 20: 369-76.
- Bongiovanni L, Romanucci M, Malatesta D, D'Andrea A, Ciccarelli A, Della Salda L. Survivin and related proteins in canine mammary tumors: immunohistochemical expression. *Vet Pathol* 2015; 52: 269-75.
- Bongiovanni L, Caposano F, Romanucci M, Grieco V, Malatesta D, Brachelente C, Massimini M, Benazzi C, Thomas RE, Salda LD. Survivin and Sox9: Potential Stem Cell Markers in Canine Normal, Hyperplastic, and Neoplastic Canine Prostate. *Vet Pathol* 2019; 56: 200-7.
- Booth DG, Takagi M, Sanchez-Pulido L, Petfalski E, Vargiu G, Samejima K, Imamoto N, Ponting CP, Tollervey D, Earnshaw WC, Vagnarelli P. Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *Elife* 2014; 3: e01641.
- Borrebaeck CA. Precision diagnostics: moving towards protein biomarker signatures of clinical utility in cancer. *Nat Rev Cancer* 2017; 17: 199-204.
- Bozkaya Y, Ozdemir NY, Sezer S, Kostek O, Demirci NS, Yazici O, Erdem GU, Eren T, Zengin N. Is serum survivin expression a predictive biomarker in locally advanced gastric cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy? *Cancer Biomark* 2018; 22: 143-9.
- Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 96-109.

- Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002; 40: 2-11.
- Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* 1992; 25: 31-40.
- Bryan JN. The Current State of Clinical Application of Serum Biomarkers for Canine Lymphoma. *Front Vet Sci* 2016; 3: 87.
- Burger PC, Shibata T, Kleihues P. The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 611-7.
- Burks ML, Bao S. The 24-Hour Urinary 5-HIAA: A Simple Test With a Common Pitfall. *AACE Clinical Case Reports* 2016; 2: 186-8.
- Caldas H, Jiang Y, Holloway MP, Fangusaro J, Mahotka C, Conway EM, Altura RA. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene* 2005; 24: 1994-2007.
- Campos M, Ducatelle R, Rutteman G, Kooistra HS, Duchateau L, de Rooster H, Peremans K, Daminet S. Clinical, pathologic, and immunohistochemical prognostic factors in dogs with thyroid carcinoma. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 1805-13.
- Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL. A role for T-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 130894.
- Chandele A, Prasad V, Jagtap JC, Shukla R, Shastry PR. Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia* 2004; 6: 29-40.
- Chantalat L, Skoufias DA, Kleman JP, Jung B, Dideberg O, Margolis RL. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol Cell* 2000; 6: 183-9.
- Chen C, Lu X. The expression of KI-67 and LEF-1 in patients after breast cancer resection and its effects on patients' prognosis. *J buon* 2020; 25: 627-33.
- Chen CK, Liao J, Li MS, Khoo BL. Urine biopsy technologies: Cancer and beyond. *Theranostics* 2020; 10: 7872-88.
- Chen D, Xu J, Zhang Q. Detection of survivin expression in bladder cancer and renal cell carcinoma using specific monoclonal antibodies. *Oncol Rep* 2018; 39: 2817-28.
- Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10: 472-84.
- Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, Müller-Reichert T, Neumann B, Poser I, Ellenberg J, Hyman AA, Gerlich DW. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* 2016; 535: 308-12.
- Dalkilic E, Filiz G, Yavuz M, Dilek K, Ersoy A, Yurtkuran M, Oruc A, Gul CB, Gullulu M. Ki-67 proliferation index in renal biopsy samples of patients with systemic lupus erythematosus and its correlation with clinical findings. *Iran J Kidney Dis* 2013; 7: 198-203.
- Daniels JR, Ma JZ, Cao Z, Beger RD, Sun J, Schnackenberg L, Pence L, Choudhury D, Palevsky PM, Portilla D, Yu LR. Discovery of Novel Proteomic Biomarkers for the Prediction of Kidney Recovery from Dialysis-Dependent AKI Patients. *Kidney360* 2021; 2: 1716-27.
- Derin D, Soydinc HO, Guney N, Tas F, Camlica H, Duranyildiz D, Yasasever V, Topuz E. Serum levels of apoptosis biomarkers, survivin and TNF-alpha in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 59: 240-5.
- Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 1998; 17: 2215-23.
- Diez M, Picavet P, Ricci R, Dequenne M, Renard M, Bongartz A, Farnir F. Health screening to identify opportunities to improve preventive medicine in cats and dogs. *J Small Anim Pract* 2015; 56: 463-9.
- Dong H, Qian D, Wang Y, Meng L, Chen D, Ji X, Feng W. Survivin expression and serum levels in pancreatic cancer. *World J Surg Oncol* 2015; 13: 189.

- Duchrow M, Schluter C, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif* 1996; 29: 1-12.
- Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 2001; 47: 624-30.
- Duffy MJ. Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. *Eur J Intern Med* 2007; 18: 175-84.
- Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW. CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 1869-74.
- Duffy MJ. Tumor markers in clinical practice: a review focusing on common solid cancers. *Med Princ Pract* 2013; 22: 4-11.
- Endl E, Hollmann C, Gerdes J. Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. *Methods Cell Biol* 2001; 63: 399-418.
- Felder M, Kapur A, Gonzalez-Bosquet J, Horibata S, Heintz J, Albrecht R, Fass L, Kaur J, Hu K, Shojaei H, Whelan RJ, Patankar MS. MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress. *Mol Cancer* 2014; 13: 129.
- Fournel-Fleury C, Magnol JP, Chabanne L, Ghernati I, Marchal T, Bonnefond C, Bryon PA, Felman P. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. *J Comp Pathol* 1997; 117: 61-72.
- Frangioni JV. New technologies for human cancer imaging. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4012-21.
- Fraser AR, Bacci B, le Chevoir MA, Long SN. Epidermal Growth Factor Receptor and Ki-67 Expression in Canine Gliomas. *Vet Pathol* 2016; 53: 1131-7.
- Fu L, Wang R, Yin L, Shang X, Zhang R, Zhang P. CYFRA21-1 tests in the diagnosis of non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Int J Biol Markers* 2019; 34: 251-61.
- Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Molecular cancer therapeutics* 2006; 5: 1087-98.
- Fukumoto S, Miyasho T, Hanazono K, Saida K, Kadosawa T, Iwano H, Uchide T. Big endothelin-1 as a tumour marker for canine haemangiosarcoma. *Vet J* 2015; 204: 269-74.
- Gan N, Jia L, Zheng L. A sandwich electrochemical immunosensor using magnetic DNA nanoprobe for carcinoembryonic antigen. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 7410-23.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.
- Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, Lemke H, Stein H. Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol* 1984; 2: 365-71.
- Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol* 2011; 48: 117-31.
- Gravina G, Wasén C, Garcia-Bonete MJ, Turkkila M, Erlandsson MC, Töyrä Silfverswärd S, Brisslert M, Pullerits R, Andersson KM, Katona G, Bokarewa MI. Survivin in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2017; 16: 845-55.
- Guadagni F, Roselli M, Cosimelli M, Ferroni P, Spila A, Cavaliere F, Casaldi V, Wappner G, Abbolito MR, Greiner JW, et al. CA 72-4 serum marker--a new tool in the management of carcinoma patients. *Cancer Invest* 1995; 13: 227-38.
- Gunaldi M, Isiksacan N, Kocoglu H, Okuturlar Y, Gunaldi O, Topcu TO, Karabulut M. The value of serum survivin level in early diagnosis of cancer. *J Cancer Res Ther* 2018; 14: 570-3.
- Guney N, Soydiye HO, Derin D, Tas F, Camlica H, Duranyildiz D, Yasasever V, Topuz E. Serum and urine survivin levels in breast cancer. *Med Oncol* 2006; 23: 335-9.
- Ha SY, Choi M, Lee T, Park CK. The Prognostic Role of Mitotic Index in Hepatocellular Carcinoma Patients after Curative Hepatectomy. *Cancer Res Treat* 2016; 48: 180-9.
- Haque A, Polcyn R, Matzelle D, Banik NL. New Insights into the Role of Neuron-Specific Enolase in Neuro-Inflammation, Neurodegeneration, and Neuroprotection. *Brain Sci* 2018; 8

- Harris VK, Schiffman JD, Boddy AM. Evolution of Cancer Defense Mechanisms Across Species. In: Ecology And Evolution Of Cancer, 1st Edition edn. Ujvari B, Roche B, Thomas F, eds.: Academic Press 2017: 99-110.
- Henry CJ. Biomarkers in veterinary cancer screening: Applications, limitations and expectations. *Vet J* 2010; 185: 10-4.
- Herwig MC, Holz FG, Loeffler KU. Distribution and presumed proliferation of macrophages in inflammatory diseases of the ocular adnexae. *Curr Eye Res* 2015; 40: 604-10.
- Hoo ZH, Candlish J, Teare D. What is an ROC curve? *Emerg Med J* 2017; 34: 357-9.
- Hu J, Wang N, Yang Y, Ma L, Han R, Zhang W, Yan C, Zheng Y, Wang X. Diagnostic value of alpha-fetoprotein combined with neutrophil-to-lymphocyte ratio for hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol* 2018; 18: 186.
- Huhtanen RL, Blomqvist CP, Wiklund TA, Böhling TO, Virolainen MJ, Tukiainen EJ, Tribukait B, Andersson LC. Comparison of the Ki-67 score and S-phase fraction as prognostic variables in soft-tissue sarcoma. *Br J Cancer* 1999; 79: 945-51.
- Ishizuka M, Oyama Y, Abe A, Kubota K. Combination of platelet count and neutrophil to lymphocyte ratio is a useful predictor of postoperative survival in patients undergoing surgery for gastric cancer. *J Surg Oncol* 2014; 110: 935-41.
- Jakoube P, Cutano V, Gonzalez-Morena JM, Keckesova Z. Mitochondrial Tumor Suppressors-The Energetic Enemies of Tumor Progression. *Cancer Res* 2021; 81: 4652-67.
- Jakubowska K, Pryczynicz A, Dymicka-Piekarska V, Famulski W, Guzinska-Ustymowicz K. Immunohistochemical expression and serum level of survivin protein in colorectal cancer patients. *Oncol Lett* 2016; 12: 3591-7.
- James NE, Emerson JB, Borgstadt AD, Beffa L, Oliver MT, Hovanesian V, Urh A, Singh RK, Rowsell-Turner R, DiSilvestro PA, Ou J, Moore RG, Ribeiro JR. The biomarker HE4 (WFDC2) promotes a pro-angiogenic and immunosuppressive tumor microenvironment via regulation of STAT3 target genes. *Sci Rep* 2020; 10: 8558.
- Jena SC, Shrivastava S, Saxena S, Kumar N, Maiti SK, Mishra BP, Singh RK. Surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of BIRC5 biomarker in spontaneously occurring canine mammary tumours. *Sci Rep* 2019; 9: 13485.
- Kammerer-Jacquet SF, Ahmad A, Møller H, Sandu H, Scardino P, Soosay G, Beltran L, Cuzick J, Berney DM. Ki-67 is an independent predictor of prostate cancer death in routine needle biopsy samples: proving utility for routine assessments. *Mod Pathol* 2019; 32: 1303-9.
- Karlovits S, Manz A, Allenspach K, Walter I, Kummer S, Tichy A, Richter B, Burgener IA, Luckschander-Zeller N. Ki-67/CD3 ratio in the diagnosis of chronic inflammatory enteropathy in dogs. *J Vet Intern Med* 2020; 34: 92-7.
- Kashyap D, Garg VK, Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2021; 125: 73-120.
- Kaszak I, Ruszczak A, Kanafa S, Kacprzak K, Król M, Jurka P. Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Vet Scand* 2018; 60: 66.
- Kavya N, Rao S, Sathyanarayana ML, Narayanaswamy HD, Byregowda SM, Ranganath L, Kamaran A, Purushotham KM, Kishore TK. Survivin expression in canine spontaneous cutaneous and subcutaneous tumors and its prognostic importance. *Vet World* 2017; 10: 1286-91.
- Kema IP, Schellings AM, Meiborg G, Hoppenbrouwers CJ, Muskiet FA. Influence of a serotonin- and dopamine-rich diet on platelet serotonin content and urinary excretion of biogenic amines and their metabolites. *Clin Chem* 1992; 38: 1730-6.
- Kent MS, Burton JH, Dank G, Bannasch DL, Rebhun RB. Association of cancer-related mortality, age and gonadectomy in golden retriever dogs at a veterinary academic center (1989-2016). *PLoS One* 2018; 13: e0192578.
- Khan S, Bennit HF, Turay D, Perez M, Mirshahidi S, Yuan Y, Wall NR. Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. *BMC Cancer* 2014; 14: 176.

- Kim J, Bae JS. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators Inflamm* 2016; 2016: 6058147.
- Kim KM, Oh YL, Ko JS, Choe YH, Seo JK. Histopathology and expression of Ki-67 and cyclooxygenase-2 in childhood *Helicobacter pylori* gastritis. *J Gastroenterol* 2004; 39: 231-7.
- Kloppel G, Caselitz J. Epithelial tumor markers: oncofetal antigens (carcinoembryonic antigen, alpha fetoprotein) and epithelial membrane antigen. *Curr Top Pathol* 1987; 77: 103-32.
- Koike Y, Muroi E, Yoshizaki A, Ogawa F, Yanaba K, Takenaka M, Shimizu K, Sato S. Autoantibody against survivin in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2010; 37: 1864-70.
- Kornacker M, Verneris MR, Kornacker B, Scheffold C, Negrin RS. Survivin expression correlates with apoptosis resistance after lymphocyte activation and is found preferentially in memory T cells. *Immunol Lett* 2001; 76: 169-73.
- Korniluk A, Koper O, Kemoni H, Dymicka-Piekarska V. From inflammation to cancer. *Ir J Med Sci* 2017; 186: 57-62.
- Kratofil RM, Kubes P, Deniset JF. Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 37: 35-42.
- Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008; 13: 472-82.
- Kycko A, Reichert M. Proteomics in the search for biomarkers of animal cancer. *Curr Protein Pept Sci* 2014; 15: 36-44.
- Langsenlehner T, Thurner EM, Krenn-Pilko S, Langsenlehner U, Stojakovic T, Gerger A, Pichler M. Validation of the neutrophil-to-lymphocyte ratio as a prognostic factor in a cohort of European prostate cancer patients. *World J Urol* 2015; 33: 1661-7.
- Lechler P, Wu X, Bernhardt W, Campean V, Gastiger S, Hackenbeck T, Klanke B, Weidemann A, Warnecke C, Amann K, Engehausen D, Willam C, Eckardt KU, Rödel F, Wiesener MS. The tumor gene survivin is highly expressed in adult renal tubular cells: implications for a pathophysiological role in the kidney. *Am J Pathol* 2007; 171: 1483-98.
- Lechowski R, Jagielski D, Hoffmann-Jagielska M, Zmudzka M, Winnicka A. Alpha-fetoprotein in canine multicentric lymphoma. *Vet Res Commun* 2002; 26: 285-96.
- Lei HJ, Wang SY, Chau IY, Li AF, Chau YP, Hsia CY, Chou SC, Kao YC, Chau GY. Hepatoma upregulated protein and Ki-67 expression in resectable hepatocellular carcinoma. *J Chin Med Assoc* 2021; 84: 623-32.
- Lenders JW, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P, Keiser HR, Goldstein DS, Eisenhofer G. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? *JAMA* 2002; 287: 1427-34.
- Li C, Wu Z, Liu M, Pazgier M, Lu W. Chemically synthesized human survivin does not inhibit caspase-3. *Protein Sci* 2008; 17: 1624-9.
- Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-4.
- Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer* 2005; 92: 212-6.
- Lisboa RV, de Oliveira FR, Quaresma TO, de Almeida RM, Ribeiro Oliveira RD, Junior PL. The Behaviour of Serum Survivin in Patients With Lupus Nephritis. *Biomark Insights* 2022; 17: 11772719221131470.
- Lisiecka U, Brodzki P, Smiech A, Kocki J, Czop M, Adaszek L, Winiarczyk S. Comparative Expression Analysis of Innate Immune Markers and Phagocytic Activity in Peripheral Blood of Dogs with Mammary Tumors. *Animals (Basel)* 2021; 11
- Lodi G, Franchini R, Bez C, Sardella A, Moneghini L, Pellegrini C, Bosari S, Manfredi M, Vescovi P, Carrassi A. Detection of survivin mRNA in healthy oral mucosa, oral leucoplakia and oral cancer. *Oral Dis* 2010; 16: 61-7.
- Louthan O. Chromogranin a in physiology and oncology. *Folia Biol (Praha)* 2011; 57: 173-81.

- Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE, Gerharz CD. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1334-42.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 519-31.
- Matteucci C, Sorrentino R, Bellis L, Ettore GM, Svicher V, Santoro R, Vennarecci G, Biasiolo A, Pontisso P, Scacciarelli D, Beneduce L, Sarrecchia C, Casalino P, Bernardini S, Pierimarchi P, Garaci E, Puoti C, Rasi G. Detection of high levels of Survivin-immunoglobulin M immune complex in sera from hepatitis C virus infected patients with cirrhosis. *Hepatol Res* 2014; 44: 1008-18.
- Melincovici CS, Bosca AB, Susman S, Marginean M, Miha C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Miha CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol* 2018; 59: 455-67.
- Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chim Acta* 2019; 491: 39-45.
- Miettinen M. Immunohistochemistry of soft tissue tumours - review with emphasis on 10 markers. *Histopathology* 2014; 64: 101-18.
- Miliaraki M, Briassoulis P, Ilija S, Polonifi A, Mantzourani M, Briassouli E, Vardas K, Nanas S, Pistiki A, Theodorakopoulou M, Tavladaiki T, Spanaki AM, Kondili E, Dimitriou H, Tsiodras S, Georgopoulos D, Armaganidis A, Daikos G, Briassoulis G. Survivin and caspases serum protein levels and survivin variants mRNA expression in sepsis. *Sci Rep* 2021; 11: 1049.
- Mobasher A, Cassidy JP. Biomarkers in veterinary medicine: Towards targeted, individualised therapies for companion animals. *Vet J* 2010; 185: 1-3.
- Mohseni S, Aboerad M, Sharifi F, Tavangar SM, Mohajeri-Tehrani M. Associations of Ki-67 Labeling Index with Clinical and Paraclinical Features of Growth Hormone-Secreting Pituitary Adenomas: A Single Center Report from Iran. *Int J Endocrinol Metab* 2019; 17: e81983.
- Montorsi M, Maggioni M, Falleni M, Pellegrini C, Donadon M, Torzilli G, Santambrogio R, Spinelli A, Coggi G, Bosari S. Survivin gene expression in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 2040-4.
- Morello EM, Cino M, Giacobino D, Nicoletti A, Iussich S, Buracco P, Martano M. Prognostic Value of Ki67 and Other Clinical and Histopathological Factors in Canine Apocrine Gland Anal Sac Adenocarcinoma. *Animals (Basel)* 2021; 11
- Morgillo F, Woo JK, Kim ES, Hong WK, Lee HY. Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res* 2006; 66: 10100-11.
- Mseddi M, Ben Mansour R, Gouia N, Mnif F, Bouselaa R, Abid M, Boudaouara T, Attia H, Lassoued S. A comparative study of nuclear 8-hydroxyguanosine expression in Autoimmune Thyroid Diseases and Papillary Thyroid Carcinoma and its relationship with p53, Bcl-2 and Ki-67 cancer related proteins. *Adv Med Sci* 2017; 62: 45-51.
- Muro Y, Kano T, Sugiura K, Hagiwara M. Low frequency of autoantibodies against Ki-67 antigen in Japanese patients with systemic autoimmune diseases. *J Autoimmun* 1997; 10: 499-503.
- Myojin M, Horimoto Y, Ito M, Kitano S, Ishizuka Y, Sasaki R, Uomori T, Himuro T, Murakami F, Nakai K, Iijima K, Saito M. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and histological type might predict clinical responses to eribulin-based treatment in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer* 2020; 27: 732-8.
- Neumann S, Schuettler J, Frenz M, Kaup FJ, Gessler F. Investigation of serum Ki-67 as a biomarker in tumor-bearing dogs. *Res Vet Sci* 2017; 110: 16-21.
- No JH, Jeon YT, Kim YB, Song YS. Quantitative detection of serum survivin and its relationship with prognostic factors in ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2011; 71: 136-40.

- Nowak M, Madej JA, Pula B, Dziegiel P, Ciaputa R. Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), E-cadherin and Ki-67 in metastatic and non-metastatic canine mammary carcinomas. *Ir Vet J* 2015; 69: 9.
- O'Riordan MX, Bauler LD, Scott FL, Duckett CS. Inhibitor of apoptosis proteins in eukaryotic evolution and development: a model of thematic conservation. *Dev Cell* 2008; 15: 497-508.
- Ohara M, Yamaguchi Y, Matsuura K, Murakami S, Arihiro K, Okada M. Possible involvement of regulatory T cells in tumor onset and progression in primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 441-7.
- Onagi H, Horimoto Y, Sakaguchi A, Ikarashi D, Yanagisawa N, Nakayama T, Nakatsura T, Ishizuka Y, Sasaki R, Watanabe J, Saito M, Saeki H, Hayashi T, Arakawa A, Yao T, Kitano S. High platelet-to-lymphocyte ratios in triple-negative breast cancer associates with immunosuppressive status of TILs. *Breast Cancer Res* 2022; 24: 67.
- Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 2817-26.
- Parikh R, Mathai A, Parikh S, Chandra Sekhar G, Thomas R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol* 2008; 56: 45-50.
- Park S, Yoo JE, Yeon GB, Kim JH, Lee JS, Choi SK, Hwang YG, Park CW, Cho MS, Kim J, Na D, Kim HW, Kim DS, Kim DW. Trophoblast glycoprotein is a new candidate gene for Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis* 2021; 7: 110.
- Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology* 2017; 49: 166-71.
- Pereira RS, Schweigert A, Dias de Melo G, Fernandes FV, Sueiro FA, Machado GF. Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms: a novel approach for immunohistological diagnostic and prognostic. *BMC Vet Res* 2013; 9: 83.
- Pessler F, Ogdie A, Diaz-Torne C, Dai L, Yu X, Einhorn E, Gay S, Schumacher HR. Subintimal Ki-67 as a synovial tissue biomarker for inflammatory arthropathies. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 162-7.
- Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. In: *GeneReviews((R))*. Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, eds. Seattle (WA): 1993:
- Queiroga FL, Raposo T, Carvalho MI, Prada J, Pires I. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo* 2011; 25: 455-65.
- Ragab HM, Samy N, Afify M, El Maksoud NA, Shaaban HM. Assessment of Ki-67 as a potential biomarker in patients with breast cancer. *J Genet Eng Biotechnol* 2018; 16: 479-84.
- Rahmanzadeh R, Hüttmann G, Gerdes J, Scholzen T. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif* 2007; 40: 422-30.
- Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gogenur I. Cytotoxic CD8(+) T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 2021; 124: 359-67.
- Ren A, Wei M, Yang Y, Yang L, Yang J. [Detection and value of serum antigen KI-67 (ki67) in clinical diagnosis of breast cancer patients]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2020; 36: 1124-8.
- Roblek M, Bicher J, van Gogh M, Gyorgy A, Seebock R, Szulc B, Damme M, Olczak M, Borsig L, Siekhaus DE. The Solute Carrier MFSD1 Decreases the Activation Status of beta1 Integrin and Thus Tumor Metastasis. *Front Oncol* 2022; 12: 777634.
- Rodrigues H, Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL. Clinicopathological significance of caspase-3 and Ki-67 expression in canine mammary gland tumours. *Acta Vet Hung* 2016; 64: 78-89.
- Rosen MJ, Kunjappu JT (2012) *Surfactants and Interfacial Phenomena.*, 4th Edition edn. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY
- Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 2000; 24: 227-35.

- Rozolen JM, Teodoro TGW, Sobral RA, Sueiro FAR, Laufer-Amorim R, Elias F, Fonseca-Alves CE. Investigation of Prognostic Value of Claudin-5, PSMA, and Ki67 Expression in Canine Splenic Hemangiosarcoma. *Animals (Basel)* 2021; 11
- Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett* 2006; 244: 164-71.
- Saiwaki T, Kotera I, Sasaki M, Takagi M, Yoneda Y. In vivo dynamics and kinetics of pKi-67: transition from a mobile to an immobile form at the onset of anaphase. *Exp Cell Res* 2005; 308: 123-34.
- Sakai H, Noda A, Shirai N, Iidaka T, Yanai T, Masegi T, Shirai N, Iidaka T, Yanai T, Masegi T. Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. *J Comp Pathol* 2002; 127: 233-8.
- Saleh R, Taha RZ, Toor SM, Sasidharan Nair V, Murshed K, Khawar M, Al-Dhaheeri M, Petkar MA, Abu Nada M, Elkord E. Expression of immune checkpoints and T cell exhaustion markers in early and advanced stages of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2020; 69: 1989-99.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-22.
- Senhorello ILS, Terra EM, Sueiro FAR, Firmo BF, Anai LA, Goloni C, Canavari IC, Ampuero RAN, Pereira RS, Tinucci-Costa M. Clinical value of carcinoembryonic antigen in mammary neoplasms of bitches. *Vet Comp Oncol* 2020; 18: 315-23.
- Sharma S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2009; 30: 1-8.
- Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40: 1117-23.
- Shoeneman JK, Ehrhart EJ, 3rd, Eickhoff JC, Charles JB, Powers BE, Thamm DH. Expression and function of survivin in canine osteosarcoma. *Cancer Res* 2012; 72: 249-59.
- Simon R. Sensitivity, Specificity, PPV, and NPV for Predictive Biomarkers. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107
- Sledge DG, Webster J, Kiupel M. Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *Vet J* 2016; 215: 43-54.
- Sobecki M, Mrouj K, Camasses A, Parisi N, Nicolas E, Lières D, Gerbe F, Prieto S, Krasinska L, David A, Eguren M, Birling MC, Urbach S, Hem S, Déjardin J, Malumbres M, Jay P, Dulic V, Lafontaine D, Feil R, Fisher D. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife* 2016; 5: e13722.
- Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, Dulic V, Fisher D. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res* 2017; 77: 2722-34.
- Sokolowska J, Urbanska K, Gizinski S, Wysocka A, Cywinska A, Lechowski R. Survivin expression in canine lymphomas in relation with proliferative markers. *Pol J Vet Sci* 2015; 18: 113-22.
- Solak M, Kraljević I, Zibar Tomšić K, Kaštelan M, Kakarigi L, Kaštelan D. Neutrophil-Lymphocyte Ratio as a Prognostic Marker in Adrenocortical Carcinoma. *Endocr Res* 2021; 46: 74-9.
- Soltani K. Alpha-fetoprotein: a review. *J Invest Dermatol* 1979; 72: 211-3.
- Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology* 2015; 82: 142-52.
- Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 165-8.
- Svensson B, Hafstrom I, Forslind K, Albertsson K, Tarkowski A, Bokarewa M. Increased expression of proto-oncogene survivin predicts Joint destruction and persistent disease activity in early rheumatoid arthritis. *Ann Med* 2010; 42: 45-54.
- Szczerba A, Bialas P, Pieta PP, Jankowska A. hCG - related molecules and their measurement. *Ginekol Pol* 2016; 87: 65-70.
- Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58: 5315-20.

- Tango Y, Kano R, Maruyama H, Asano K, Tanaka S, Hasegawa A, Kamata H. Detection of autoantibodies against survivin in sera from cancer dogs. *J Vet Med Sci* 2010; 72: 917-20.
- Tatarinov YS. Trophoblast-specific beta1-glycoprotein as a marker for pregnancy and malignancies. *Gynecol Obstet Invest* 1978; 9: 65-97.
- Terms NCIDoC. serum tumor marker test. NCI 2021: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/serum-tumor-marker-test>. 1 January 2023.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62.
- Thrivani K, Krishnamoorthy L, Ramaswamy G. Correlation study of Carcino Embryonic Antigen & Cancer Antigen 15.3 in pretreated female breast cancer patients. *Indian J Clin Biochem* 2007; 22: 57-60.
- Tosoian J, Loeb S. PSA and beyond: the past, present, and future of investigative biomarkers for prostate cancer. *ScientificWorldJournal* 2010; 10: 1919-31.
- Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 4349-54.
- Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep* 2005; 14: 425-31.
- Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzky F, Durham A, Ehrhart EJ, Johnson Y, Jones C, Kiupel M, Labelle P, Lester S, Miller M, Moore P, Moroff S, Roccabianca P, Ramos-Vara J, Ross A, Scase T, Tvedten H, Vernau W. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol* 2011; 48: 198-211.
- van Dierendonck JH, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1989; 49: 2999-3006.
- Veiga GA, Miziara RH, Angrimani DS, Papa PC, Cogliati B, Vannucchi CI. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra syndrome in bitches: identification of hemodynamic, inflammatory, and cell proliferation changes. *Biol Reprod* 2017; 96: 58-69.
- Veiga GLD, Silva R, Pereira EC, Azzalis LA, Alves B, Gehrke FS, Gascón TM, Fonseca FLA. The role of Survivin as a biomarker and potential prognostic factor for breast cancer. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 2019; 65: 893-901.
- Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, Lal A, Wang CJ, Beaudry GA, Ciriello KM, Cook BP, Dufault MR, Ferguson AT, Gao Y, He TC, Hermeking H, Hiraldo SK, Hwang PM, Lopez MA, Luderer HF, Mathews B, Petroziello JM, Polyak K, Zawel L, Kinzler KW, et al. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 1999; 23: 387-8.
- Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 602-8.
- Wang YR, Yan JX, Wang LN. The diagnostic value of serum carcino-embryonic antigen, alpha fetoprotein and carbohydrate antigen 19-9 for colorectal cancer. *J Cancer Res Ther* 2014; 10 Suppl: 307-9.
- Wheatley SP, McNeish IA. Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol* 2005; 247: 35-88.
- Wheatley SP, Altieri DC. Survivin at a glance. *J Cell Sci* 2019; 132
- Whitfield ML, George LK, Grant GD, Perou CM. Common markers of proliferation. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 99-106.
- Wimmershoff J, Polkinghorne A, Grest P, Schade B, Marchal T, Keller SM, Guscetti F. Immunohistochemical detection of survivin in canine lymphoma. *J Comp Pathol* 2010; 142: 311-22.
- World Health Organization. Cancer control: early detection: WHO guide for effective programmes. WHO 2007: https://www.who.int/cancer/publications/cancer_control_detection/en/. 15 January 2021.

- Xu G, Li C, Wang Y, Ma J, Zhang J. Correlation between preoperative inflammatory markers, Ki-67 and the pathological grade of glioma. *Medicine (Baltimore)* 2021; 100: e26750.
- Yamada T, Fujita M, Kitao S, Ashida Y, Nishizono K, Tsuchiya R, Shida T, Kobayashi K. Serum alpha-fetoprotein values in dogs with various hepatic diseases. *J Vet Med Sci* 1999; 61: 657-9.
- Yamazaki H, Takagi S, Hoshino Y, Hosoya K, Okumura M. Inhibition of survivin influences the biological activities of canine histiocytic sarcoma cell lines. *PLoS One* 2013; 8: e79810.
- Yan M, Schwaederle M, Arguello D, Millis SZ, Gatalica Z, Kurzrock R. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer Metastasis Rev* 2015; 34: 157-64.
- Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010; 11: 174-83.
- Yie SM, Luo B, Ye NY, Xie K, Ye SR. Detection of Survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of breast cancer patients by a RT-PCR ELISA. *Clin Exp Metastasis* 2006; 23: 279-89.
- Yilmaz H, Demirag G, Sullu Y, Yilmaz A. Predictive Significance of Ki-67 and Platelet Lymphocyte Ratio in Patients with Gastric Cancer Receiving Neoadjuvant FLOT Chemotherapy. *J Coll Physicians Surg Pak* 2021; 30: 546-52.
- Yuan P, Xu B, Wang C, Zhang C, Sun M, Yuan L. Ki-67 expression in luminal type breast cancer and its association with the clinicopathology of the cancer. *Oncol Lett* 2016; 11: 2101-5.
- Zandvliet M. Canine lymphoma: a review. *Vet Q* 2016; 36: 76-104.
- Zhang Y, Cheng S, Zhang M, Zhen L, Pang D, Zhang Q, Li Z. High-infiltration of tumor-associated macrophages predicts unfavorable clinical outcome for node-negative breast cancer. *PLoS One* 2013; 8: e76147.
- Zhang Y, Feng Q, Zhou S, Chen H. Downregulation of serum survivin correlates with increased inflammation, enhanced disease severity and worse prognosis in sepsis patients. *Medicine (Baltimore)* 2020; 99: e20272.
- Zhu H. Squamous Cell Carcinoma Antigen: Clinical Application and Research Status. *Diagnostics (Basel)* 2022; 12

IX. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mentor, Professor Dr. Stephan Neumann, für die Überlassung des spannenden Themas und die geduldige Betreuung und stets wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Dissertation, bei der Kontaktaufnahme mit möglichen Anlaufstellen für die Gewinnung weiterer Blutproben von Hunden mit Tumoren, sowie bei der Anfertigung der beiden Publikationen und deren Präsentation auf Fachtagungen.

Bei Professor Dr. Johannes Hirschberger bedanke ich mich herzlichst für die bereitwillige Übernahme der Betreuung dieser Doktorarbeit, für die schnelle und immer freundliche und motivierende Rückmeldung auf Fragen jeglicher Art und für die hilfreichen Korrekturen und Anmerkungen zu den beiden Veröffentlichungen und der Doktorarbeit.

Ein großes Dankeschön möchte ich Herrn Dr. Martin Kessler dafür aussprechen, dass ich zwei Monate zur Probengewinnung in der Tierklinik Hofheim in der onkologischen Abteilung hospitieren durfte und dass er sich so viel Zeit für die ausführliche Überarbeitung und Verbesserung der Manuskripte genommen hat.

Professor Dr. Axel Wehrend, Dr. Sebastian Ganz, Dr. Teresa Conze und allen weiteren beteiligten Mitarbeitern der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen möchte ich gerne für die Akquirierung von Serumproben von Hündinnen mit Mammatumoren und die freundliche Zusammenarbeit danken.

Auch Professor Dr. Oechtering, Dr. Sarah Rösch und allen weiteren beteiligten Mitarbeitern der HNO-Abteilung der Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig gebührt ein herzliches Dankeschön für die nette Zusammenarbeit, für die Möglichkeit, in den dortigen Klinikalltag hineinzuschnuppern und für die Tipps und Anregungen für das wissenschaftliche Arbeiten von Frau Dr. Rösch.

Für die freundliche Zusammenarbeit und Bereicherung der Publikation über Survivin mit spannenden Erkenntnissen auf der Zellebene bedanke ich mich herzlichst bei Herrn Dr. Frank Gessler und miprolab.

Ein weiteres großes Dankeschön gebührt dem lieben Klinikteam der Kleintierklinik des Tierärztlichen Institutes der Georg-August-Universität Göttingen, das mich fleißig bei der Suche nach geeigneten Patienten und bei der Gewinnung von Probenmaterial unterstützt hat und mir darüber hinaus ein tolles, familiäres Lernumfeld geboten hat. Hierfür möchte ich mich ganz herzlich bei dem gesamten Tierärzte-Team bedanken und insbesondere bei Almuth, die diese Doktorarbeit mit hilfreichen Korrekturen und Anmerkungen verbessert hat.

Ich möchte mich zudem bei Dr. Thomas Kinder und allen weiteren beteiligten Labormitarbeitern für die Einführung und Unterstützung in der Bearbeitung der Proben im Labor bedanken und auch bei Dr. Tony Krebs für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Studienergebnisse.

Ein riesengroßes Dankeschön muss ich meinem fantastischen privaten Umfeld aussprechen: Mit unserem Doktoranden-Team, Caro, Lisa, Lilith, Lena und Anneke, habe ich während meiner Zeit in Göttingen und darüber hinaus tolle neue Freundinnen gewonnen, auf die man in jeglicher Situation zählen und auch außerhalb der Tiermedizin viel Spaß haben kann.

Allerliebsten Dank an meine wunderbare Familie, die mich gerade in den herausforderndsten Zeiten wie ein Fels in der Brandung immer ertragen, motiviert und bedingungslos unterstützt hat und durch fleißiges Korrekturlesen und viele Tipps und Anregungen zusätzlich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen hat, vielen herzlichen Dank dafür!