

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Sanja Mihoković

**Komparativna analiza tumora sjemenika pasa upotrebom histopatološke
pretrage i metodom protočne citometrije**

Diplomski rad

Zagreb, 2015

Diplomski rad izrađen je na Zavodu za veterinarsku patologiju i na Zavodu za biologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta:

Prof. dr. sc. Željko Grabarević

Predstojnik Zavoda za biologiju Veterinarskog fakulteta:

Prof. dr.sc. Đuro Huber

Mentor: Doc. dr. sc. Marko Hohšteter

Komentor: Dr. sc. Dubravko Kezić

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Branka Artuković
2. Dr. sc. Dubravko Kezić
3. Doc. dr. sc. Marko Hohšteter
4. Doc. dr. sc. Andrea Gudan Kurilj, zamjena

Zahvaljujem mojim mentorima doc. dr. sc. Marku Hohšteteru i dr. sc. Dubravku Keziću na stručnim savjetima koji su mi uvelike pomogli u izradi ovog rada. Isto tako zahvaljujem Mariji Mišić, dipl. ing. biol. s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, za njenu pomoć u provođenju protočne citometrije.

Također se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na razumjevanju i podršci koju su mi pružali tijekom studija i koji su pretrpjeli sve one odbijene pozive na druženje jer sam morala učiti. Isto tako bih se željela zahvaliti i radnim kolegama koji su uvijek bili tu da priskoče i pomognu kada je trebalo, te na podršci i razumjevanju prilikom uzimanja slobodnih dana za učenje i izradu ovog rada.

Bez svih vas, vjerojatno ovaj rad ne bi niti ugledao svjetlo dana. Veliko hvala svima.

POPIS PRILOGA:

Tablica 1. Udio pojedinih vrsta tumora sjemenika pasa u ukupnom broju pretraženih uzoraka

Slika 1: Tumor intersticijskih (Leydigovih) stanica psa. 40x (HE; arhiva
Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu)

Slika 2: Intratubularni oblik tumora Sertolijevih stanica psa. 40x (HE; arhiva
Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu)

Slika 3. Intratubularni oblik seminoma psa. 40x (HE; arhiva Zavoda za
veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu)

Slika 4. Difuzni oblik seminoma psa. 40x (HE; arhiva Zavoda za veterinarsku
patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu)

Slika 5. Mješoviti tumor Leydigovih i Sertolijevih stanica psa. Dio tumora s
neoplastičnim Leydigovim stanicama. 40x (HE; arhiva Zavoda za veterinarsku
patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu)

Slika 6. Mješoviti tumor Leydigovih i Sertolijevih stanica psa. Dio tumora s
neoplastičnim Sertolijevim stanicama. 40x (HE; arhiva Zavoda za veterinarsku
patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu)

Slika 7. Histogram s prikazom DNA poliploidnog uzorka tumora čovjeka (Iz arhive
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu).

Slika 8. Histogram s prikazom DNA uzorka tumora psa (tumor Sertolijevih stanica).

Slika 9. Histogram s prikazom DNA uzorka tumora psa (seminom).

Slika 10. Histogram s prikazom DNA uzorka tumora psa (seminom).

Slika 11. Histogram s prikazom algoritamskog razdvajanja vrha(peak) na faze staničnog ciklusa
kod tumora psa.

Slika 12. *Dot plot* s prikazom veličine i strukture stanica tumora psa (tumor Sertolijevih stanica).

SADRŽAJ:

1. Uvod	1
2. Pregled rezultata dosadašnjih istraživanja	2
2.1. Anatomija i histologija sjemenika	2
2.2. Tumori sjemenika pasa	4
2.2.1. Tumori strome sjemenika (tumori sjemenog tračka)	6
2.2.2. Tumori zametnih stanica	10
2.2.3. Mješoviti tumori sjemenika	12
2.3. Metoda protočne citometrije	13
2.3.1. Protočna citometrija u veterinarskoj medicini	14
2.3.1.1. DNK analiza	15
3. Materijali i metode	17
3.1. Histopatološka pretraga	17
3.2. Protočna citometrija	17
4. Rezultati	19
4.1. Histološka analiza tumora sjemenika pasa	19
4.2. DNK analiza tumora sjemenika	23
5. Rasprava	26
6. Zaključci	28
7. Literatura	29
8. Sažetak	32
9. Summary	34
10. Životopis	36

1. UVOD

Tumori sjemenika najčešći su oblik tumora genitalnog sustava muških pasa te se mogu javiti u 90 % slučajeva, dok se kod drugih vrsta životinja javljaju vrlo rijetko (North i sur., 2009). Dobna predispozicija vrlo je bitan čimbenik u razvoju tumora, na što ukazuju brojna istraživanja koja su pokazala da se tumori sjemenika najčešće javljaju u starijih pasa. Tri najčešća primarna tumora sjemenika su tumori Sertolijevih stanica, intersticijskih (Leydigovih) stanica i seminomi (McGavin i Zachary, 2006). U manjoj mjeri mogu se razviti i tumori testikularnih mezenhimalnih struktura ili vrlo rijetko metastatski tumori. Biološko ponašanje tumora sjemenika u pasa najčešće je benignog karaktera (Hohšteter, 2012.; McGavin i Zachary, 2006). U malom broju slučajeva javljaju se uginuća pasa kao posljedica tumora sjemenika, no isto tako često posljedica može biti neplodnost životinja. Metastaze koje se mogu javiti, očituju se čvorovima u sjemenom užetu, skrotalnim limfnim čvorovima i izvan njih (McGavin i Zachary, 2006).

Klasifikacija tumora sjemenika u pasa relativno je jednostavna, za što postoji nekoliko mogućih razloga, a to su prije svega njihova benignost, oskudna istraživanja imunohistokemijskih biljega, te drugih obilježja značajnih za diferencijaciju tumora sjemenika kao i vrlo mali broj istraživanja koja se provode na neklasificiranim intratubularnim neoplazijama zametnih stanica (IGCNU, engl. *intratubular germ cell neoplasia of undifferentiated origin*).

Budući da su vlasnici životinja u današnje vrijeme izuzetno zainteresirani za liječenje tumora svojih kućnih ljubimaca, osobito životinja poželjnih genetskih osobina, bilo kakva nova spoznaja u dijagnostici, terapiji i prevenciji neplodnosti, kao i uginuća životinja iznimno je korisna. Zbog općenito vrlo malog broja istraživanja u području tumora sjemenika kod pasa, kako u Republici Hrvatskoj tako i u ostatku svijeta, jedan od ciljeva ovog rada je i utvrditi na temelju rezultata histopatološke analize tumora te analize rezultata dobivenih korištenjem protočne citometrije korelaciju genetsko i molekularno patoloških struktura tumorskih stanica s biološkim ponašanjem tumora.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. ANATOMIJA I HISTOLOGIJA SJEMENIKA

Sjemenici (testisi) ili muške gonade su parne žlijezde koje se sastoje od egzokrinog tubularnog dijela čija je funkcija proizvodnja spermija i endokrinog dijela kojeg čine intersticijalne (Leydigove) stanice i Sertolijeve stanice (Kozarić, 1997.) koje su između ostaloga zadužene i za proizvodnju spolnih hormona. Tijekom kasnijeg embrionalnog razvoja muške gonade migriraju s mjesta razvitka u trbušnoj šupljini u vaginalni izdanak potrbušnice (*processus vaginalis*) u mošnjku (*scrotum*) što se naziva spuštanjem (*descensus*) sjemenika. Proces spuštanja sjemenika u mošnjku posljedica je povećanja tjelesne temperature u sjemenicima, zbog čega se oni moraju spustiti izvan trbušne šupljine čime se snižava tjelesna temperatura u njima i omogućava se normalna funkcija sjemenika, tj. stvaranje i razvoj spermija (spermatogeneza). Izostanak spuštanja jednog ili oba sjemenika naziva se kriptorhizam (*kryptorchismus*), a smatra se nasljednim degenerativnim poremećajem (Zobundžija i sur., 2009.).

Sjemenici su kod pasa, ovisno o pasmini i dobi, različite veličine. Površina sjemenika je prekrivena vezivnotkivnom čahurom (*tunica albuginea*) koja je građena od gustog vezivnog tkiva. Parenhim sjemenika čine zavinuti sjemeni kanalići (*tubuli concerti*) koji prelaze u ravne kanaliće (*tubuli recti*) u medijastinalnom dijelu sjemenika. Ravni kanalići se međusobno spajaju i tvore mrežu kanalića (*rete testis*) iz koje izlazi veći broj odvodnih kanalića (*ductuli efferentes*) koji se dalje nastavljaju u *caput epididymidis* i tvore *ductus epididymidis*. Nakon izlaska iz epididimisa, *ductus epididymidis* se nastavlja u sjemenovod (*ductus deferens*) (Kozarić, 1997.).

Intersticijske (Leydigove) stanice su velike polimorfne stanice koje imaju okruglaste jezgre, a nalaze se u intertubularnim prostorima sjemenika. Leydigove stanice mogu se u tkivu nalaziti u tračcima ili nakupinama. Glavna funkcija Leydigovih stanica je proizvodnja spolnih hormona (androgena) odnosno testosterona.

Potporne (sustentakularne) ili Sertolijeve stanice, zajedno s višeslojnim spermatogenim epitelom (germinativnim epitelom) i laminom proprijom grade zavinate sjemene cjevčice koje se nastavljaju u sjemene kanaliće (Wrobel i Bergman, 2006.). Sertolijeve stanice nastaju od nediferenciranih potpornih stanica prepubertetskih gonada. Brojne mitoze i proizvodnja antimezonefričnog hormona koji suprimira razvoj ženskih spolnih organa u mužjaka mogu se uočiti kod nediferenciranih Sertolijevih stanica. Nakon što životinja dosegne spolnu zrelost dolazi do gubitka mitotske sposobnosti tih stanica te do njihovih morfoloških transformacija u nepravilne duguljaste stanice, a mitotska sposobnost tih stanica se gubi te podliježu morfološkoj transformaciji u nepravilne duguljaste stanice koje sadrže jezgru ovalnog ili kruškolikog oblika, s velikom jezgričicom smještenom uz bazalnu membranu. Uloga Sertolijevih stanica u genitalnom sustavu životinja je višestruka. One imaju potpurnu, hranidbenu i zaštitnu funkciju za spermatogene stanice, odgovorne su za odvijanje spermatogeneze, imaju fagocitirajuću sposobnost te tako uklanjaju degenerirane spermatogene stanice i ostatke tijela spermatida, no isto tako otpuštaju spermatozoe u lumen sjemenih cjevčica. Osim toga, luče i brojne hormone (transferin, androgen-vezajući protein, inhibin) te tako utječu na hipofizu i lučenje folikulostimulirajućeg hormona (FSH). U fiziološkim uvjetima, količina steroidnih hormona koje proizvode Sertolijeve stanice vrlo je mala.

2.2. TUMORI SJEMENIKA PASA

Na temelju istraživanja provedenog u Republici Hrvatskoj, u razdoblju od tri godine (2006.-2009.), utvrđena je pojavnost tumora u pasa koji su u većini slučajeva bili zloćudni (59,1%), a u manjoj mjeri dobroćudni (35,4%), dok se ostatak od 5,29% smatrao neodređenim. Kao najčešći oblik tumora pojavljuju se tumori kože i potkožja (45,73%), zatim tumori mliječne žlijezde (21,75%) i spolnoga sustava (7,97%) (Šoštarić-Zuckermann i sur., 2013.).

Kod tumora spolnog sustava pasa, u najvećem broju slučajeva javljaju se tumori sjemenika koji su znatno učestaliji u pasa za razliku od ostalih vrsta životinja (North i sur., 2009.). Tri najčešća tipa tumora sjemenika u pasa su tumori intersticijskih (Leydigovih) stanica koji se javljaju u 50% slučajeva, seminomi koji se javljaju u 42% slučajeva, te najmanje zastupljeni tumori Sertolijevih stanica koji su prisutni u 8% slučajeva. Ostali oblici tumora sjemenika kao što su teratomi, embrionalni karcinomi, fibromi, hemangiomi, granulosa stanični tumori, sarkomi, gonadoblastomi, limfomi i rete testis mucinozni adenokarcinomi, mogu se javiti no vrlo su rijetki (Degner, n.d.; Fan i De Lorimer, 2007.; Foster i Ladds, 2007.). Tumori sjemenika često su klasificirani i kao mješoviti tumori, tzv. kolizijski tumori, jer se u dosta slučajeva unutar istog tumorozno promjenjenog sjemenika mogu pronaći dva različita tipa tumora (Maclachlan i Kennedy, 2002.). Osim spomenutih oblika tumora sjemenika, u malom broju mogu se javiti i IGCNU na kojima su do sada provedena vrlo oskudna istraživanja (Hohšteter, 2012.). Za razliku od do sada navedenih podataka, retrospektivno istraživanje koje su proveli Liao i suradnici (2009.) pokazuje drugačiji udio pojavnosti različitih tipova sjemenika u pasa, pa oni tako navode seminom kao najčešći oblik. Na drugom mjestu su tumori intersticijskih stanica, zatim mješoviti tumori zametnih stanica i stanica sjemenog tračka te na kraju tumori Sertolijevih stanica.

Za razliku od ostalih oblika tumora u pasa, tumori sjemenika su većinom benignog karaktera (Hohšteter, 2012.), a mogu biti zahvaćena oba ili samo jedan sjemenik. Metastaze se rijetko javljaju i većinom su sporog tijeka. U slučaju pojave metastaza tumora sjemenika, one se najčešće mogu pronaći u područnim (ilijačnim ili lumbalnim) limfnim čvorovima, sjemenom užetu i limfnim žilama. Nalaz metastaza u navedenim područjima jedini je u potpunosti siguran dokaz da se radi o malignom tumoru sjemenika te se bez toga histološki ili citološki dijagnoza

malignog tumora sjemenika ne može sa sigurnošću postaviti. Metastatski tumori u sjemenicima su rijetki, a najčešće se javljaju kao limfomi ili hemangiosarkomi (Foster i Ladds, 2007.).

Iako se tumori sjemenika većinom javljaju spontano, određeni genetski čimbenici mogu znatno utjecati na njihovu pojavnost i razvitak. Jedan od najznačajnijih čimbenika koji predstavlja rizik za pojavu tumora sjemenika je dob životinje. Tumori sjemenika se najčešće javljaju u starijih pasa. Osim dobne predispozicije, velik rizik za nastanak i razvoj tumora sjemenika predstavlja kriptorhizam. Pojava tumora sjemenika u pasa mlađih od 10 godina, znatno je veća kod kriptorhidnih pasa ($p < 0,01$), a kriptorhizam sam ili u korelaciji sa starošću pasa znatno utječe na pojavnost i tip tumora sjemenika (Liao i sur., 2009.).

Pasminska predispozicija i njen utjecaj na pojavu tumora sjemenika do sada nisu u potpunosti istraženi i potvrđeni, no u nekim istraživanjima uočena je veća pojavnost tumora sjemenika u određenih pasmina. Tijekom jednog istraživanja provedenog u Norveškoj kao najčešće pasmine kod kojih su pronađeni tumori sjemenika navode se šetlandski ovčarski pas, škotski ovčar, norveški elkhound, sibirski haski, pudl, jazavčar, tibetanski španijel, erdelterijer, bišon, zlatni retriver i križanci dok su se u labradora, pointera, dobermana, rotvajlera, ravnodlakih retrivera, buvijeja i leonbergera tumori sjemenika javili vrlo rijetko (Nødtvedt i sur., 2011.). U novijem istraživanju provedenom u Hrvatskoj, pasmine kod kojih su se tumori sjemenika, točnije seminomi, najčešće pojavljivali su labradori, pudli, pekinezeri, zlatni retriveri, aljaški malamuti, mastifi, križanci, jorkširski terijeri i njemački ovčari (Hohšteter i sur., 2014.).

S obzirom na pretežno benigni karakter tumora sjemenika pasa, klinička slika oboljelih životinja nije specifična i vrlo često životinja ne pokazuje nikakve znakove oboljenja. U većini slučajeva uočava se samo povećanje zahvaćenog sjemenika, te u određenih tipova tumora može doći do feminizacije oboljelih životinja.

Histološki se tumori sjemenika dijele na tumore koji nastaju iz stromalnih elemenata sjemenog užeta gonada ili od germinativnih stanica. Seminomi, teratomi, embrionalni karcinomi i karcinomi žumanjčanih vrećica ubrajaju se u tumore podrijetla zametnih stanica dok se tumori Leydigovih (intersticijskih) stanica i tumori Sertolijevih stanica ubrajaju u tumore podrijetla sjemenog užeta sjemenika. Histološka klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, *World Health Organization*, engl.) neznatno se razlikuje od prethodno navedene klasifikacije sjemenika tumora životinja pa se tako tumori Leydigovih (intersticijskih) stanica i tumori Sertolijevih stanica ubrajaju u tumore strome sjemenika, a seminom, teratom i embrionalni

karcinom u tumore zametnih stanica. Nadalje razlikujemo mješovite tumore zametnih stanica i stanica strome sjemenog užeta te ostale tumore sjemenika koji se javljaju u manjoj mjeri. Iako prema WHO klasifikaciji tumora životinja, IGCNU nisu klasificirani kao neoplazije, u proučavanim tumorima sjemenika pasa pronađene su lezije morfološki slične IGCNU prisutnom kod tumora sjemenika u ljudi (Hohšteter, 2012.).

2.2.1. TUMORI STROME SJEMENIKA (TUMORI SJEMENOG TRAČKA)

Kod tumora strome sjemenika razlikujemo:

Tumore Leydigovih (intersticijskih) stanica - Leydig cell tumour (LCT), engl.

Tumori intersticijskih stanica su po učestalosti najčešće testikularne neoplazije pasa (McGavin i Zachary, 2006). Tumorožno mogu biti promjenjeni oba ili samo jedan sjemenik, a isto tako mogu se javiti i multiple neoplazije. Tumori intersticijskih stanica, kao i ostale testikularne neoplazije, javljaju se najčešće kod starijih životinja. Vrlo vjerojatno tumori intersticijskih stanica započinju kao područja nodularne hiperplazije, a postoje podaci i da su povezani s bolestima i povećanjem prostate te s perinealnim hernijama. Pojava hiperplastičnih čvorića uočava se prvenstveno u senilno atrofiranim sjemenicima, a dokazi o tome da difuzna hiperplazija intersticijskih endokrinih stanica u hipoplastičnim ili kriptorhidnim sjemenicima predisponira nastanak tumora za sada ne postoje. Pasmenska predispozicija za pojavu tumora intersticijskih stanica nije potvrđena, no podaci koji postoje navode pasmine kao što su sibirski haski, foksterijer, staroengleski ovčarski pas, šetlandski ovčarski pas, bulterijer i dalmatinski pas kao pasmine kod kojih se ovaj tip tumora javljao učestalije (Cooley i Waters, 2001.). U nekim slučajevim, tumorozno promjenjene intersticijske stanice proizvode androgene hormone, uključujući i estrogene supstance, no za razliku od tumora Sertolijevih stanica, kod ovog oblika tumora ne postoje dokazi o pojavi značajnijih posljedica hiperestrogenizma, koji se može pojaviti u vrlo malom broju slučajeva.

Za razliku od tumora Sertolijevih stanica, tumori intersticijskih stanica većinom su manjeg promjera (1-2 cm) te vrlo rijetko ili gotovo nikada ne uzrokuju povećanje zahvaćenog

sjemenika te posljedično pritisak na okolna tkiva, no deformacije (okrugla ispupčenja na površini sjemenika, atrofija sjemenika) nisu rijetkost kod ovog oblika tumora. Tumori intersticijskih stanica su većinom dobro ograničeni, a mogu biti vrlo slabo inkapsulirani ili vrlo često potpuno inkapsulirani. Makroskopski izgled tumora intersticijskih stanica karakterističan je po svojoj brončano do narančastoj boji s čestim krvarenjima (McGavin i Zachary, 2006). Slabo su prožeti vezivnim tkivom i zbog toga su meke konzistencije. Na prereznoj plohi uočava se umjereno zrnata građa, uz često prisutne zone krvarenja te u manjem broju slučajeva cisti. Hiperplastični čvorići su vrlo mali (< 1 cm) no ponekad mogu biti i makroskopski vidljivi, a histološki se vide kao nakupine intersticijskih endokrinih stanica u intertubularnoj stromi.

Tumori intersticijskih stanica nastaju od intersticijskih stanica zdravih sjemenika te im histološki sličje zbog toga što dolazi do vrlo malih varijacija u obliku stanice, jezgre i citoplazme, kao što je to slučaj kod bikova. U pasa se naime često javljaju stanice okruglog, poliedričnog ili vretenastog oblika s obilnom eozinofilnom citoplazmom u kojoj se uočavaju fine granule, vakuole ili smeđe granule lipokromnog pigmenta. Jezgre tumorozno promjenjenih stanica su obično okrugle, male i tamne s izrazito rijetkim mitozama. Ciste i nekroze češće se uočavaju kod vretenasto promjenjenih tumoroznih stanica koje oblažu i lumen cisti. Kod 15 % ovih tumora u neoplastičnim stanicama mogu se uočiti intranuklearne citoplazmatske invaginacije složene građe s izduženim jezgrama koje nisu dokazane kod drugih oblika tumora sjemenika.

Tumori intersticijskih stanica su gotovo uvijek benignog karaktera i nisu invazivni, no u nekim slučajevima mogu se pojaviti i maligni oblici, kao što su naprimjer karcinomi intersticijskih stanica. Kod malignih oblika tumora stanice su često nepravilnijeg oblika s brojnijim mitozama, a često se uočavaju i invazije krvnih žila. No diferencijacija benignih i malignih oblika tumora samo na temelju histoloških karakteristika i dalje je otežana, ponajviše zbog izostanka metastaza.

Prognoza kod ovog tipa tumora u većini slučajeva je povoljna ukoliko se nisu pojavili maligni oblici tumora. Kastracijom se kod pojave benignih oblika postiže potpuno izlječenje i koncentracija estradiola, ukoliko je bila povišena, vraća se unutar fizioloških granica ubrzo nakon uklanjanja tumora.

Tumore Sertolijevih stanica - Sertoli cell tumours (SCT), engl.

Tumori Sertolijevih stanica su po učestalosti treća testikularna neoplazija u pasa, dok se u drugih vrsta životinja rijetko javljaju. Obično je zahvaćen samo jedan sjemenik, dok se obostrani tumori javljaju vrlo rijetko. Tumori Sertolijevih stanica najčešći su u starijih životinja. Velik broj ovih tumora (>50%) javlja se kod kriptorhidnih pasa (McGavin i Zachary, 2006). Pasmenska predispozicija nije jasno izražena no veća učestalost uočava se u minijaturnih šnaučera s perzistentnim sindromom Müllerianovih kanala, norveških goniča, foks terijera, afganistanskih hrtova, zapadnoškotskih bijelih terijera, erdel terijera, wajmaranskih krvosljednika, pekinezera i šetlandskih ovčarskih pasa (Cooley i Waters, 2001.).

Makroskopski se kod ovih tumora uočavaju nodularne ili multinodularne proliferacije, nepravilnog ovalnog oblika, no isto tako mogu biti i lobularni te su obično dobro ograničeni od ostatka zahvaćenog sjemenika i ne probijaju tuniku albugineu. Tumori Sertolijevih stanica vrlo često uzrokuju deformacije ili povećanje zahvaćenog sjemenika što rezultira pritiskom i lokalnom invazijom na okolna tkiva. Na prereznoj plohi izražena je lobularna građa, promjenjeni dijelovi su bijele ili sive boje, a ponekad se mogu uočiti i žućkasta ili smeđa područja s krvarenjima te se oko tumora uočava prsten komprimiranog atrofičnog zdravog tkiva sjemenika. Tumori Sertolijevih stanica za razliku od seminoma i tumora intersticijskih (Leydigovih) stanica obiluju gustim, vezivnim, hijaliniziranim tkivom te su zbog toga i tvrđe konzistencije.

Tumori Sertolijevih stanica razvijaju se iz potpornih (sustentakularnih) stanica sjemenog tubula, a histološki se dijele na intratubularne i difuzne oblike. Intratubularni oblik tumora sastoji se od dobro formiranih tubula višeslojno ograničenih tumorski promjenjenim Sertolijevim stanicama. Kod intratubularnih oblika tumora moguća je pojava invazija s probijanjem bazalne membrane. Difuzni oblik tumora nema organiziranu tubularnu strukturu, a tumorske stanice se nalaze u obliku širokih slojeva (plahti) ili otočića podijeljenih gustom fibroznom stromom. Tumorožno promjenjene Sertolijeve stanice u ranijoj fazi, kod dobro diferenciranih tumora, mogu imati izgled zdravih stanica s malim okruglim do ovalnim bazofilnim jezgrama smještenim bazalno, a citoplazma im je eozinofilno obojena te može biti ili gusta ili vakuolizirana, te sadržavati lipokromne pigmentne granule. Kod slabije diferenciranih tumora, jezgre neoplastičnih Sertolijevih stanica su više pleomorfne, izdužene i nisu smještene bazalno. Iako Sertolijeve stanice u zdravim sjemenicima proizvode minimalnu količinu steroidnih hormona, njihovi tumori su kao i većina stromalnih tumora, hormonski aktivni te proizvode estrogen što za

posljedicu ima pojavu znakova hiperestrogenizma kod životinja (ginekomastija, atrofija kontralateralnog sjemenika, alopecija i feminizacija) koji se javljaju u 20-30% slučajeva. Osim estrogena, tumorozno promjenjene Sertolijeve stanice pojačano luče i inhibin koji snižava produkciju testosterona djelujući inhibitorno na lučenje hormona hipofize, no isto tako uzrokuje i nastanak drugih lezija (Grootenhuis i sur., 1990). Najopasnija posljedica hiperestrogenizma nastalog kao posljedica tumora Sertolijevih stanica je njegova mijelotoksičnost, koja rezultira slabo regenerativnom anemijom, trombocitopenijom i granulocitopenijom, te posljedičnom hemoragičnom dijatezom koja može biti opasna po život. Kod životinja kod kojih se javlja perzistentna pancitopenija mogu se javiti krvarenja, depresija, umor i infekcije (North i Banks, 2009.).

Većina tumora Sertolijevih stanica je dobroćudna i zahvaća samo sjemenik, no oko 10-15% tumora pokazuje znakove malignosti (Fan i De Lorimier, 2007.), te su moguće metastaze na susjedne strukture tunike albuginee, epididimisa ili sjemenog užeta, regionalne limfne čvorove i u rijetkim slučajevima na unutrašnje organe. Metastatski čvorići imaju histološke karakteristike slične primarnim tumorima te također mogu biti hormonski aktivni.

Simptomi nastali kao posljedica razvoja tumora Sertolijevih stanica obično nestaju nakon kastracije, ako tumor nije metastazirao. Prognoza kod ovog tipa tumora u pravilu je povoljna ukoliko nije došlo to metastaziranja tumora te ako se znakovi hiperestrogenizma ne očituju atrofijom koštane srži (smrtnost veća od 70 %). Općenito je prognoza kod životinja kod kojih jaka trombocitopenija traje duže od dva tjedna nepovoljnija.

2.2.2. TUMORI ZAMETNIH STANICA

Kod tumora zametnih stanica razlikujemo seminome, teratome, embrionalne karcinome i karcinome žumanjčane vreće. Od prethodno navedenih oblika tumora, u pasa, no i ostalih vrsta životinja, najčešće se javljaju seminomi.

Seminom

Seminom je po učestalosti druga testikularna neoplazija u pasa (McGavin i Zachary, 2006.). Ovaj oblik tumora sjemenika može se javiti i kod drugih vrsta životinja no najčešće se javlja u pasa, osobito kod starijih i/ili kriptorhidnih pasa. Podaci koje navode North i Banks (2009.) i Maclachlan i Kennedy (2002.) ukazuju na to da se oko 34% svih utvrđenih seminoma pojavilo kod kriptorhidnih pasa te da je u 18 % slučajeva tumor zahvatio oba sjemenika, a u ostalim slučajevima gdje je tumorom zahvaćen samo jedan sjemenik, tumorozne tvorbe su bile češće u desnom sjemeniku. Pasminka predispozicija za nastanak seminoma izraženija je kod boksera, staroengleskih ovčarskih pasa, sibirskih haskija, foksterijera, norveških goniča, samojeda, danskih doga, wajmaranera i buldoga (Cooley i Waters, 2001.).

Kod seminoma je, kao i kod tumora intersticijskih stanica, hiperestrogenizam rijetko prisutan pa se kao i kod tumora Leydigovih stanica feminizacija životinja rijetko uočava.

Veličina seminoma može varirati te o tome ovise i klinički simptomi koji se mogu javiti. Kod pojave seminoma karakteristična su nagla povećanja zahvaćenog sjemenika koji mogu narasti i do 6 cm što posljedično uzrokuje rastezanje tunike albuginee, pritisak na okolna tkiva, te bolnost koja se između ostaloga javlja i zbog čestih intratumoralnih krvarenja i nekroza koje se mogu javiti. Makroskopski se kod seminoma, osim povećanja zahvaćenog sjemenika, u većini slučajeva može uočiti i homogena građa tumora, u rijedim slučajevima lobularna građa, koji su na presjeku vlažni, bijelo do sivoružičaste boje, te se na pritisak cijedi mliječno-bijela tekućina. Seminomi su uglavnom meke konzistencije zbog strome siromašne vezivnim tkivom, no ukoliko se i pojave seminomi tvrde konzistencije, nikada nisu tvrdi kao tumori Sertolijevih stanica.

Seminomi nastaju od zametnih stanica spermatogenog epitela sjemenih kanalića. Na temelju histološke građe seminoma razlikujemo intratubularne i difuzne oblike. Intratubularni oblici seminoma građeni su od germinativnih stanica koje stvaraju nakupine i zamjenjuju slojeve spermatogenih i Sertolijevih stanica koje se nalaze u zdravim sjemenim

tubulima. Tumorozno promjenjene stanice ispunjavaju cijeli lumen sjemenih tubula čija stijenka može rupturirati posljedično pojačanoj proliferaciji tumorskih stanica. Posljedica ruptуре stijenke tubula je nastanak difuznog oblika seminoma u kojem se uočavaju guste nakupine (plahte) tumorskih stanica. Tumorozne stanice su velike, poliedrične, dobro demarkirane i okrugle s velikim okruglim jezgrama različite veličine koje sadrže jedan ili više jezgrica. Citoplazma tumoroznih stanica je vrlo oskudna i često se pod mikroskopom uočava samo kao jedva vidljivi bazofilni ili amfofilni prsten oko jezgre. Mitotski indeks tumorskih stanica je najčešće visok (McGavin i Zachary, 2006.), te su uočljive brojne bizarne mitoze. Ponekad se u preparatima mogu uočiti brojne divovske mono ili multinuklearne stanice s obilnom citoplazmom, kao i limfoidni agregati (CD8+) oko krvnih žila sjemenika.

Maligni oblici seminoma su rijetki iako se javljaju češće nego u ostalih oblika testikularnih neoplazija pasa. Malignitet je izraženiji kod difuznih oblika, što je moguća posljedica jače vaskularizacije spomenutog oblika tumora (Restucci i sur., 2003.). Diferencijacija benignih i malignih oblika nije laka jer su metastaze rijetke (<10%) kod oba oblika te im je histološka građa vrlo slična. Metastaze se mogu uočiti najčešće u regionalnim limfnim čvorovima, no isto tako u drugim udaljenijim organima kao što su pluća, jetra, gušterača, slezena, nadbubrežna žlijezda, središnji živčani sustav (SŽS), oči i koža (Foster i Ladds, 2007.; Maclachlan i Kennedy, 2002.; North i Banks, 2009.).

Prognoza kod ovog tipa tumora u većini slučajeva je povoljna, no kod starijih kriptorhidnih životinja, te u slučaju pojave malignih oblika s većim stupnjem metastaziranja mogućnost izlječenja je smanjena. Kastracija je u slučaju pojave benignih oblika najbolji izbor liječenja.

2.2.3. MJEŠOVITI TUMORI SJEMENIKA

Tumori sjemenika pasa se obično javljaju kao pojedinačni, ali se unutar jednog sjemenika često nalaze multiple neoplazije. Istraživanja koja su proveli Fan i De Lorimier (2007.) pokazuju da oko 40 % pasa kod kojih je dijagnosticiran tumor sjemenika ima više od jedne vrste primarnog tumora unutar istog sjemenika, dok Degner (n.d.) u svom izlaganju spominje da se kod jedne trećine pasa kod kojih se razvijaju testikularne neoplazije javljaju mješoviti tumori koji sadrže više od jedne vrste primarnih tumora sjemenika. Mješoviti tumori osobito su česti kod kriptorhidnih pasa, a najčešće se javljaju u kombiniranom obliku tumora Sertolijevih stanica i tumora Leydigovih stanica. Kombinacija seminoma i tumora Sertolijevih i/ili Leydigovih stanica javlja se u pasa u oko 7% slučajeva (North i Banks, 2009.). U pravih mješovitih tumora koji predstavljaju mješavinu različitih tumorozno promjenjenih stanica unutar jednostrukog tumora, Sertolijeve stanice i zametne stanice međusobno su pomiješane unutar tubula i odjeljene gušćom ili rijedom fibroznom stromom.

Biološko ponašanje mješovitih tumora ovisi o tipu tumoroznih stanica koje dominiraju u tumoru, no najčešće su benignog karaktera i ne uzrokuju hiperestrogenizam. Kao izbor liječenja koristi se kastracija koja u velikoj većini dovodi do potpunog izlječenja životinje.

2.3. METODA PROTOČNE CITOMETRIJE

Protočna citometrija je analitička metoda kojom se, između ostalog, mogu analizirati fizikalna svojstva stanica odnosno njihova veličina, oblik i zrnatost, kao i drugi parametri (promjene u jezgri ili kariotipu stanica, broj mitozna). Na temelju ovih parametara, može se utvrditi heterogenost populacije stanica, te razlikovati pojedine podskupine i odrediti njihov udio unutar određene populacije stanica. Protočna citometrija je za razliku od ostalih sličnih metoda, koje se baziraju na mjerenju samo jednog svojstva stanice u staničnoj populaciji ili na svojstva cjelokupne stanične populacije, usredotočena na analizu svake pojedine stanice u staničnoj populaciji, odnosno ne određuje prosjek svih stanica u populaciji, nego se svaka stanica pojedinačno analizira. Isto tako omogućava analizu više biokemijskih i fizikalnih parametara stanice istovremeno i to uz veliku brzinu i objektivnost dobivenih rezultata.

Ova metoda vrši se pomoću protočnog citometra koji analizira i razvrstava stanice prema njihovim fizikalnim, molekularnim i biokemijskim svojstvima. Metoda protočne citometrije osniva se na mjerenju raspršenja svjetlosti i fluorescencije koja nastaje prolaskom suspenzije stanica kroz fokusiranu lasersku zraku. Prilikom prolaska suspenzije obojanih stanica dolazi do raspršenja svjetla laserske zrake. Razlikujemo dva tipa raspršenja koja se mogu mjeriti, a to su prednje raspršenje (FS, *forward scatter*, engl.) i bočno raspršenje (SS, *side scatter*, engl.). Prednje raspršenje bilježi detektor koji se nalazi u ravnini laserske zrake i daje nam podatke o veličini stanice, a bočno raspršenje bilježi detektor koji se nalazi pod pravim kutem u odnosu na lasersku zraku i daje podatke o unutrašnjoj strukturi stanice (granuliranosti, sadržaju DNK). Količina raspršenog svjetla ovisi o veličini, obliku i homogenosti stanice ili drugih čestica koje prolaze kroz lasersku zraku no isto tako i o kutu iz kojeg se raspršenje mjeri (Ormerod, 2009.). Intenzitet fluorescencije odražava unutrašnjost stanice, odnosno ako je količina DNK u stanici veća, više boje će se vezati za nju te će i intenzitet fluorescencije biti veći. Rezultati analize protočnim citometrom dobivaju se u obliku histograma, koji može biti pojedinačan ili prikazivati dvije korelirajuće plohe u obliku točkica gdje svaka točkica predstavlja jednu stanicu. U pojedinačnom histogramu os apscise na histogramu predstavlja intenzitet fluorescencije dok je na osi ordinate prikazan broj stanica.

Velika prednost ove metode je njena brzina kojom se mogu dobiti rezultati analize stanica (i do nekoliko tisuća stanica u sekundi) uz veliku preciznost i specifičnost, kao i mogućnost praćenja više parametara na jednoj stanici u populaciji istovremeno (veličina, zrnatost, oblik, sadržaj DNK stanica, faze staničnog ciklusa) (Ormerod, 2009.).

2.3.1. PROTOČNA CITOMETRIJA U VETERINARSKOJ MEDICINI

Protočna citometrija u veterinarskoj medicini počinje se sve više koristiti (Reggeti i Bienzle, 2011.). Zbog brzine izvođenja metode i visoke specifičnosti koristi se najviše na područjima citologije, hematologije, imunologije, no sve više se počinje primjenjivati i na područjima onkologije, molekularne genetike, citogenetike, toksikologije i transfuziologije (Vujica, 2005.). Upotreba protočne citometrije kao dio rutinske dijagnostike i prevencije bolesti životinja u svijetu se primjenjuje već dugi niz godina. U Republici Hrvatskoj (RH) se protočna citometrija većinom ne koristi kao rutinska metoda u laboratorijskoj dijagnostici, no iznimke ipak postoje, kao što je to slučaj kod korištenja protočne citometrije kao rutinske metode u procjenjivanju ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku (Samaržija, 2004.). Neka od istraživanja u kojima je protočna citometrija korištena kao metoda izbora na području RH, daju dobre rezultate i bolji uvid u stanične promjene koje se javljaju kod pojave različitih oboljenja životinja.

Istraživanja temeljena na provođenju metode protočne citometrije na području onkologije životinja u RH su vrlo oskudna te postoji vrlo mali broj literaturnih zapisa.

2.3.1.1. DNK ANALIZA

DNK analiza je druga najvažnija primjenjiva metoda protočne citometrije, odmah nakon imunofluorescencije (Ormerod, 2009.). Prije početka analize DNK sadržaja potrebno je stanice u uzorku razbiti kako bismo dobili pojedinačne stanice te ih obojiti. Za bojanje stanica koriste se fluorescirajuće boje (fluorokromi) od kojih se najčešće koristi propidijev jodid koji fluorescira crveno pri ekscitaciji laserom na valnoj duljini od 488 nm.

Promjene u sadržaju i količini DNK stanice te kvantitativne promjene kariotipa stanice često se mogu uočiti kod pojedinih oblika tumora. Analizom sadržaja DNK protočnim citometrom mogu se dobiti informacije o sadržaju kromosoma, premda sadržaj DNK nije uvijek u korelaciji s kariotipom. Mutacije kromosoma očituju se odstupanjem od normalnog broja kromosoma ili promjenama oblika kromosoma. U zdravim stanicama sadržaj DNK odgovara diploidnom broju kromosoma (*Canis familiaris*, 78), dok se kod tumorski promijenjenih stanica (prvenstveno u zloćudnih tumora) često javlja aneuploidija odnosno poremećaj broja kromosoma u stanici (Ormerod, 2009.). Aneuploidija tumorskih stanica značajan je parameter koji se istražuje iz razloga jer se kod aneuploidnih tumora češće javljaju metastaze i prognoze su puno nepovoljnije nego kod ostalih tumora (Nola, 2005.). Aneuploidija se može očitovati povećanim brojem kromosoma (hiperploidija) odnosno povećanjem haploidnog broja kromosoma ili smanjenim brojem kromosoma (hipoploidija). Povremeno se u stanicama može javiti povećanje haploidnog broja kromosoma i do četiri (tetraploidija) ili čak osam (oktoploidija) puta.

Sadržaj DNK u jezgri odgovara intenzitetu fluorescencije prilikom prolaska suspenzije stanica kroz lasersku zraku. Na temelju toga moguće je pomoću protočnog citometra odrediti u kojoj fazi staničnog ciklusa se nalazi određeni broj tumorski promijenjenih stanica. U G₀/G₁-fazi koja predstavlja fazu mirovanja stanica nalaze se stanice s normalnim diploidnim (2n) brojem kromosoma i razmjerno tome istim sadržajem DNK, u S-fazi koja predstavlja fazu sinteze DNK i udvostručavanja broja kromosoma nalazimo stanice s tetraidnim (4n) brojem kromosoma, dok se u fazama G₂ i M u kojima se 4n broj kromosoma zadržava dok ne nastupi druga stanična dioba (citokineza) odvija udvostručavanje sadržaja DNK i nastanak dvije nove stanice (Cooper, 2000.). Ovi podaci važni su zbog toga što na temelju poznatih informacija o sadržaju DNK i broju kromosoma u normalnim stanicama u određenim fazama staničnog ciklusa

možemo prilikom analize tumorozno promijenjenih stanica izuzeti rezultate dobivene mjerenjem staničnih parametara kod zdravih stanica. Odnosno, ako znamo da u G0 i G1 fazama staničnog ciklusa normalnih stanica nalazimo duplo manji broj kromosoma i manju količinu DNK nego u G2 i M fazama tada možemo zaključiti da će normalne stanice u G2 i M- fazi duplo jače fluorescirati zbog veće količine DNK sadržaja koji je na sebe vezao više fluorescirajuće boje.

Za ispitivanje staničnog ciklusa protočnom citometrijom mogu se koristiti uzorci svježeg tkiva ili uzorci tkiva uklopljeni u parafin. DNK analizom i obradom dobivenih podataka te interpretacijom izrađenih histograma mogu se odrediti parametri kao što su udio stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa (%), DNK-indeks koji predstavlja omjer između DNK sadržaja kod tumorskih stanica i kod normalnih stanica koje sadrže diploidan broj kromosoma (G0/G1- faza), ploidnost kromosoma u stanici koja je iskazana brojem vrškova (pikova) u G0/G1 fazi na histogramu. Jedan pik označava ploidiju, dodatni pik aneuploidiju, a dva ili više pikova multiploidiju. Kod analize DNK sadržaja, priprema uzoraka tkiva je od izrazite važnosti i točnost krajnjih rezultata ovisi o brojnim čimbenicima, kao što su kvaliteta uzorka (prisutnost nekroza, fibroza, krvarenja, autolize u uzorkovanim tkivima), poznavanju protokola pripremanja uzoraka, kao i vještini u pripremanju uzoraka (upotrebljeni enzimi i fluorokromi, trajanje inkubiranja, temperatura na kojoj se pripremaju uzorci u određenim fazama pripreme, rukovanje uzorcima), kvaliteti korištenog protočnog citometra te vještini tumačenja histograma.

3. MATERIJALI I METODE

Za potrebe istraživanja tijekom izrade ovog rada koristila sam arhivirane uzorke tumora sjemenika pasa sa Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi analizirani tumori bili su dostavljeni na patohistološku pretragu Zavoda ili su uzeti od životinja koje su bile dostavljene na Zavod u svrhu razudbe u razdoblju od 2007. do 2010. godine. Histopatološka analiza i analiza protočnim citometrom izvršene su na devet nasumično odabranih arhiviranih uzoraka tumora sjemenika pasa koji su makroskopski bili promijenjeni te na jednom makroskopski nepromijenjenom uzorku testisa.

3.1. HISTOPATOLOŠKA PRETRAGA

U svrhu histološke analize uzoraka tumora, sva tkiva sjemenika odnosno njihovi dijelovi fiksirani su u 10% puferiranom formalinu i uklopljeni u parafin. Za bojanje uzoraka tumora korištena je rutinska metoda bojanja, hemalaun-eozin (HE) metoda. Histološki su uzorci analizirani pomoću svjetlosnog mikroskopa (OLYMPUS, CX 21), najprije pod povećanjem od 10x, a nakon toga i pod povećanjem od 40x. Histološka klasifikacija tumora sjemenika provedena je u skladu s kriterijima klasifikacije tumora sjemenika pasa i ljudi Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl.), 1999.

3.2. PROTOČNA CITOMETRIJA

U svrhu analize protočnim citometrom korištena su tkiva pohranjena u formalinu i tkiva uklopljena u parafinske blokove rezana na debljinu od 40 μm . Analiziran je velik broj čestica (jezgara) po uzorku, najčešće 300 000 čestica (jezgara). Uzorci tkiva su zatim dalje obrađeni prema određenom protokolu kako bi se uklonili ostaci parafina i omogućilo izoliranje jezgara stanica. Prije početka analize uzoraka protočnim citometrom jezgre stanica su obojane propidijevim jodidom. Uklanjanje parafina vrši se stajanjem uzoraka u ksilolu tijekom 30 min nakon čega se vakuum sisaljkom uklanja ksilol. Uzorci se potom rehidriraju uzastopnim umakanjem u 100%, 95% i 70% etanol, s razmacima od po 10 min između umakanja u pojedine koncentracije, te se prije stavljanja uzoraka u drugu koncentraciju, ostaci prethodno dodanog etanola uklanjaju vakuum sisaljkom. Nakon toga uzorci se umaču u destiliranu vodu u trajanju od 10 min, ukloni se voda vakuum sisaljkom, a uzorcima se zatim dodaje po 2 ml 0,5% pepsina

u 0.9% NaCl (pH 1.5) kako bi se razbile skupine stanica i dobile pojedinačne stanice. Ova enzimski reakcija traje 60 min, prilikom kojih uzorci moraju biti uronjeni u vodenu kupelj na 37 °C uz stalno miješanje. Uzorke je potrebno promiješati, a zatim profiltrirati kroz čvrstu napetu svilu (veličina pora 50 mikrona). Nakon toga uzorci se centrifugiraju na 400 G (1500 rpm, *revolutions per minute*, engl., okretaja u minuti) tijekom 5 minuta. Nastali supernatant se odlije jednim naglim pokretom. Nakon centrifugiranja, dobiveni talog jezgara tumorozno promijenjenih stanica obradi se ribonukleazom zbog toga što se propidijev jodid veže na dvostruke RNK u stanici koje je potrebno razdvojiti, a zatim se boja propidijevim jodidom na sobnoj temperaturi. Dobiveni uzorak se prelije („rub uz rub“) u plastičnu epruvetu i stavi na +4°C preko noći. Slijedeći dan uzorak je spreman za analizu protočnim citometrom.

Analiza sadržaja DNK provedena je na 10 uzoraka od kojih je bilo 9 uzoraka tumora sjemenika pasa, te 1 uzorak sjemenika bez tumoroznih promjena koji je služio kao negativna proba. Jedan uzorak tumora muškarca korišten je kao pozitivna proba. Sadržaj DNK pojedinačnih tumorozno promijenjenih stanica sjemenika pasa izmjeren je na protočnom citometru (Beckman-Coulter Epics XL) koristeći valnu duljinu od 488 nm, a analiza podataka i izrada histograma provedena je pomoću Inivai Technologies FlowLogic programa.

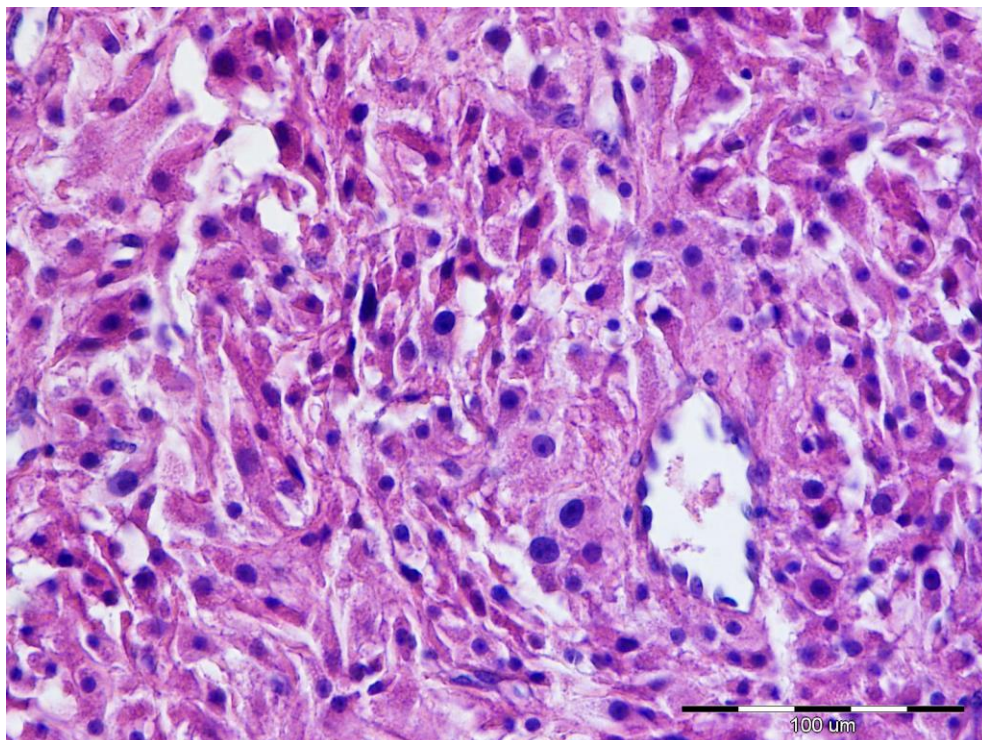
4. REZULTATI

4.1. HISTOLOŠKA ANALIZA TUMORA SJEMENIKA PASA

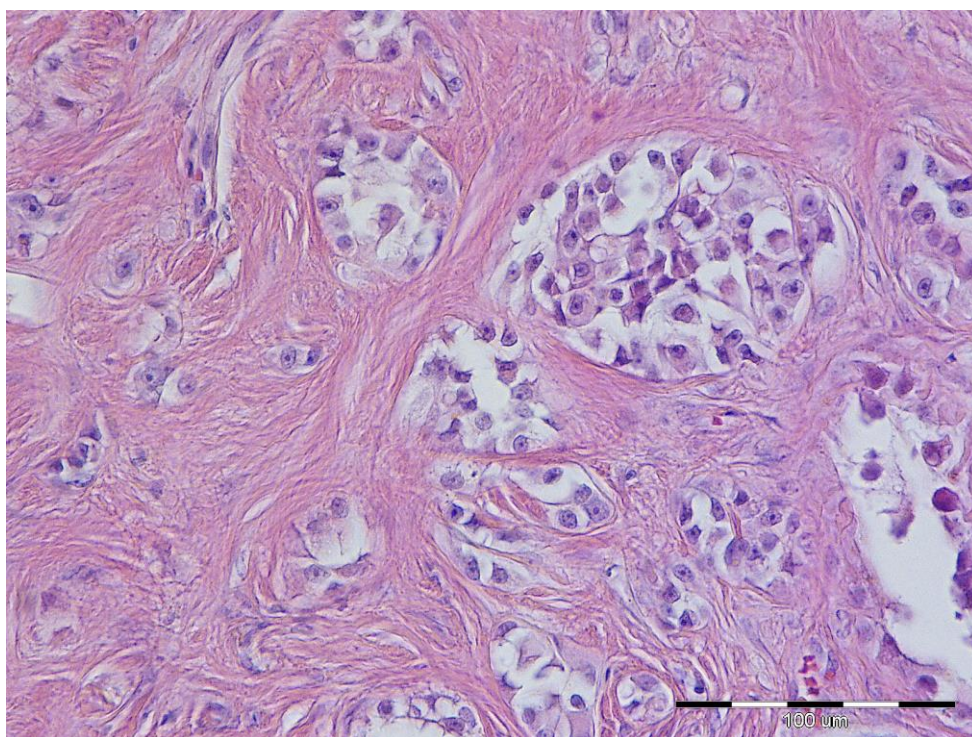
Od ukupno deset uzoraka tumora sjemenika na kojima je rađena patohistološka analiza, četiri su uzorka seminomi (40%), tri uzorka tumori intersticijskih (Leydigovih) stanica (30%), te po jedan uzorak tumora Sertolijevih stanica (10%), mješovitog tumora Leydigovih i Sertolijevih stanica (10%) i jedan uzorak bez prisutnosti tumoroznih promjena (10%) (tablica 1.). Niti jedan od uzoraka tumora nije bio malignog karaktera.

Vrsta tumora	Ukupan broj	Postotak (%)
Seminom	4	40
Tumor intersticijskih (Leydigovih) stanica	3	30
Tumor Sertolijevih stanica	1	10
Mješoviti tumor Leydigovih i Sertolijevih	1	10
Bez tumoroznih tvorbi	1	10

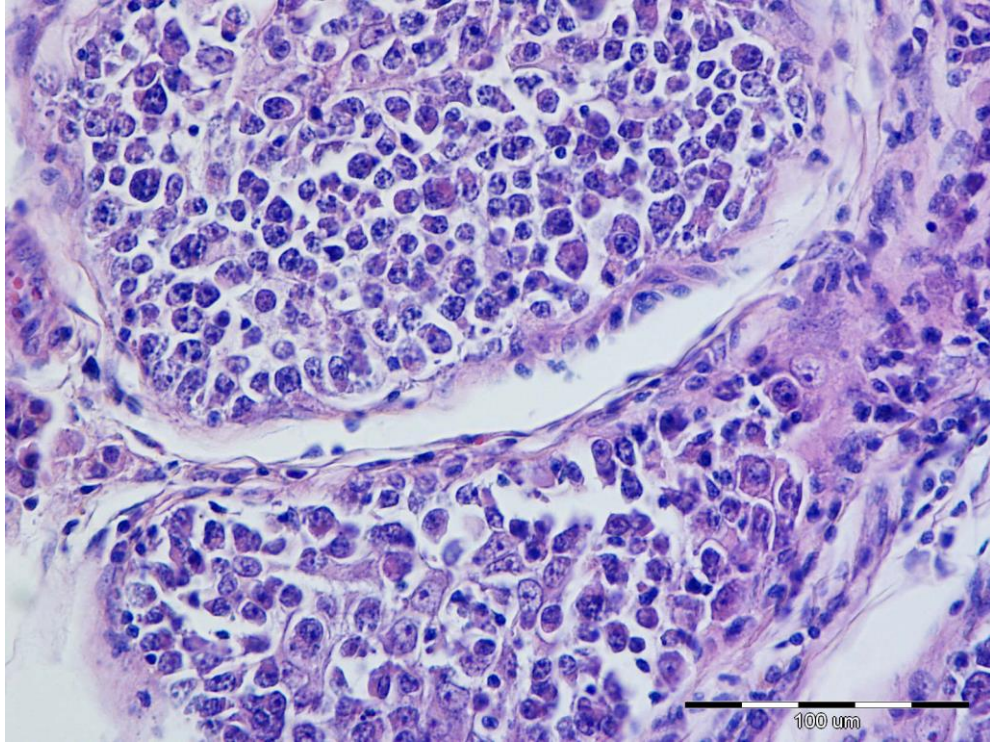
Tablica 1. Udio pojedinih vrsta tumora sjemenika pasa u ukupnom broju pretraženih uzoraka



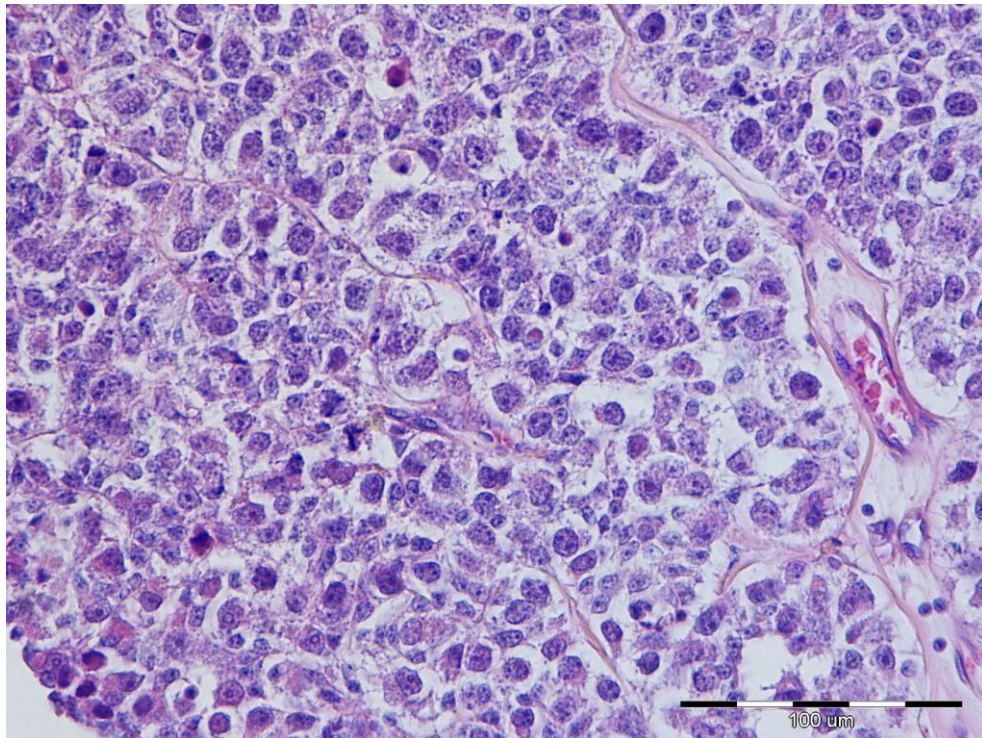
Slika 1: Tumor intersticijskih (Leydigovih) stanica psa. 40x (HE; arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu)



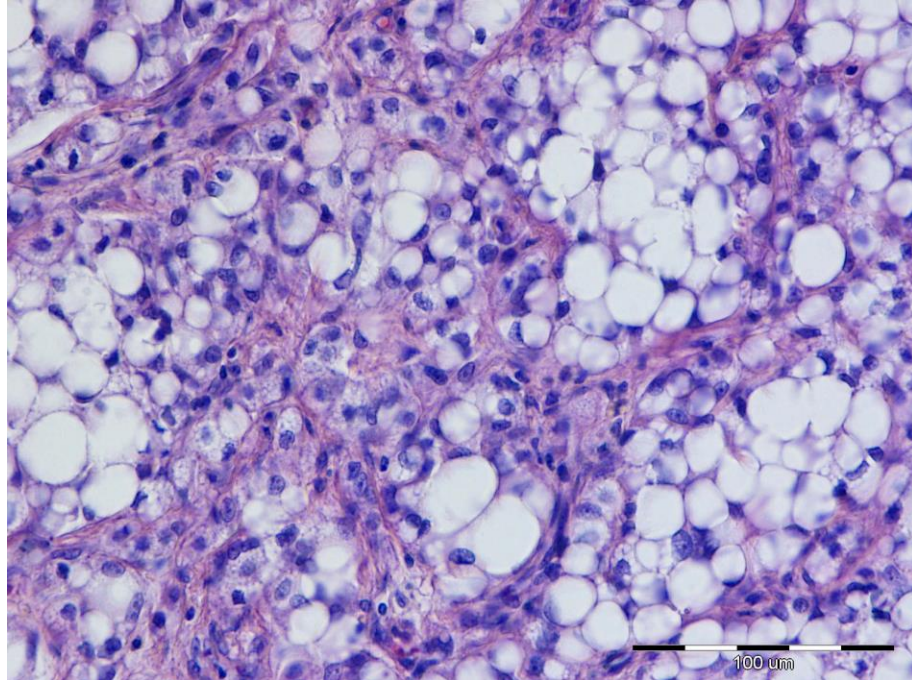
Slika 2. Intratubularni oblik tumora Sertolijevih stanica psa. 40x (HE; arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu)



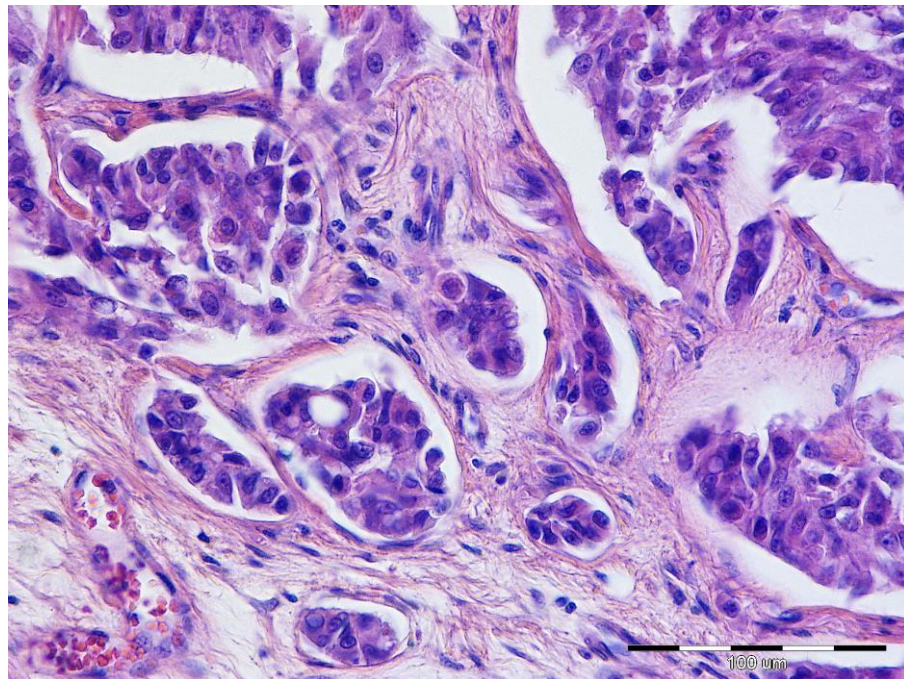
Slika 3. Intratubularni oblik seminoma psa. 40x (HE; arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu)



Slika 4. Difuzni oblik seminoma psa. 40x (HE; arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu)



Slika 5. Mješoviti tumor Leydigovih i Sertolijevih stanica, psa. Dio tumora s neoplastičnim Leydigovim stanicama. 40x (HE; arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu)



Slika 6. Mješoviti tumor Leydigovih i Sertolijevih stanica psa. Dio tumora s neoplastičnim Sertolijevim stanicama. 40x (HE; arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu)

4.2. DNK ANALIZA TUMORA SJEMENIKA

Histogrami na kojima je prikazana FL3-LOG skala (Slika 7., Slika 8., Slika 9., Slika 10.) zapravo predstavljaju snagu fluorescencije koja raste logaritamski. Što znači da su svi histogrami zapravo logaritamski stisnuti na skali radi lakšeg prikaza. Ovaj način prikaza lako može zavarati iz razloga što ako je neki događaj na skali prikazan više desno, njegova snaga fluoresciranja ne raste linearno kako se na prvi pogled čini već se povećava za po jedno decimalno mjesto 10, 100, 1000 itd.

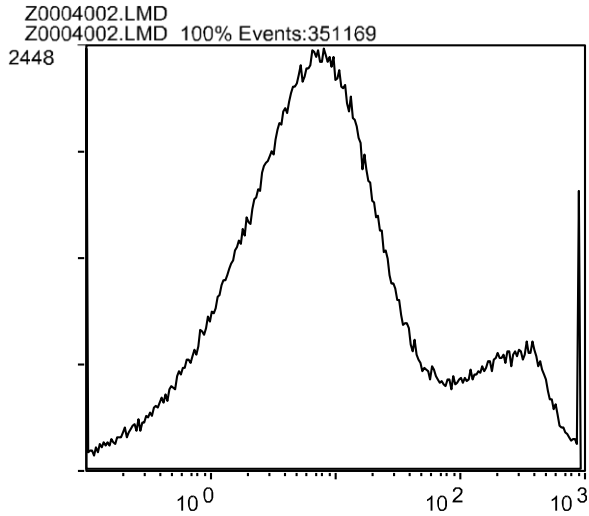
Na uzorku poliploidnog tumora sjemenika čovjeka (iz arhive Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu) uočavaju se tri vrha od kojih prvi, veći vrh prikazuje većinu analiziranih stanica (Slika 7.). Na temelju ostala dva vrha koji pokazuju jaču fluorescenciju, a budući da znamo da je ovo poliploidan tumor, možemo pretpostaviti da desni vrh predstavlja populaciju stanica koje imaju abnormalno povećanu količinu DNA.

Na ostalim histogramima (Slika 8., Slika 9.) sve su stanice jednolike obojene i ne odvajaju se posebno na temelju fluorescencije. Iz toga možemo zaključiti, ako ih usporedimo sa sigurno pozitivnim uzorkom, da ne pokazuju poliploidnost iako se zbog prevelike obojanosti stanica ne prikazuje klasični histogram staničnog ciklusa. Kako možemo vidjeti na drugom (Slika 8.) i trećem (Slika 9.) histogramu, sami vrhovi nisu jako pravilni i vjerojatno bi sa boljom razlučivošću i manjim intenzitetom obojenja pokazali nekoliko vrhova koje bismo onda možda mogli detaljnije protumačiti.

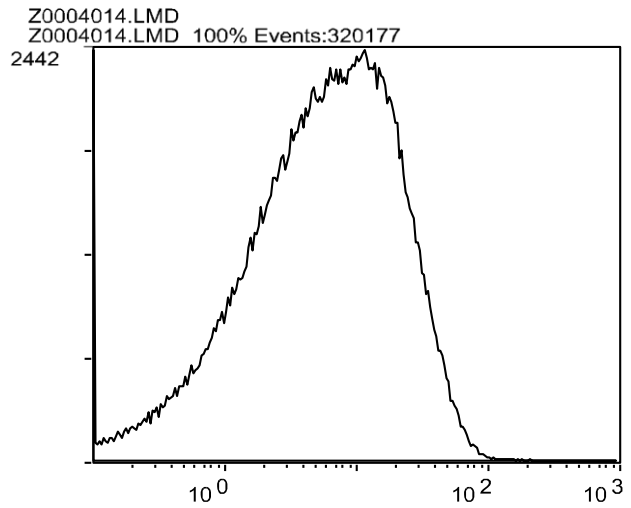
Na histogramu (slika 10.) se mogu uočiti dvije populacije stanica koje smo uspjeli dobiti, ali kod kojih je zbog prejake obojanosti teško razlučiti predstavlja li postotak stanica od 19, 41% apoptotične stanice, obojene stanične fragmente ili dio normalne populacije stanica.

Na slici 12. prikazana je veličina i struktura (granuliranost) svake pojedinačne stanice tumora psa na linearnoj skali koja zapravo predstavlja normalnu raspodjelu stanica, s obzirom da je uzorak uzet iz tkiva i relativno agresivno obrađen enzimima. Na njemu se ne uočava više populacija već se stanice jednostavno grupiraju u jednu homogenu masu gdje je veća prisutnost sitnih čestica koje su vjerojatno stanični fragmenti. Postotak od 84,93% (desno od postavljene granice) pokazuje koje smo čestice uzeli u daljnu obradu (Slika 8.) s obzirom da bi nam premalene čestice samo dodatno otežavale analizu dok smo ostale čestice (lijevo od postavljene granice) isključili iz daljnje analize. Ukoliko je analiza uzoraka uspješna, pomoću Inivai

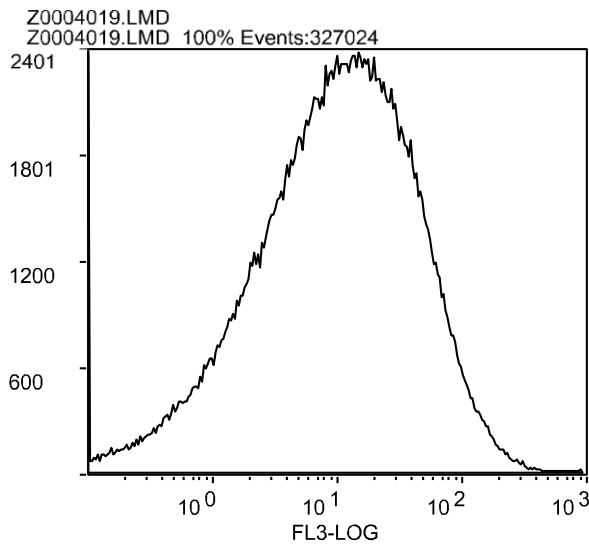
Technologies FlowLogic programa moguće je dobiti i algoritamski prikaz udjela stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa, što je vidljivo na slici 11.



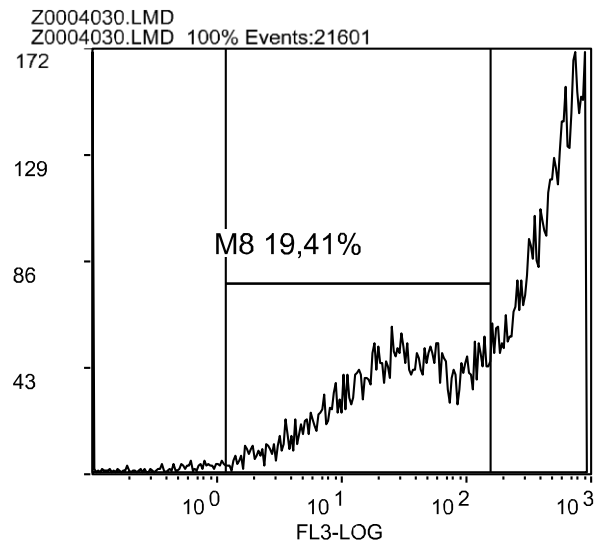
Slika 7. Histogram s prikazom DNA poliploidnog uzorka tumora čovjeka (Iz arhive Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu).



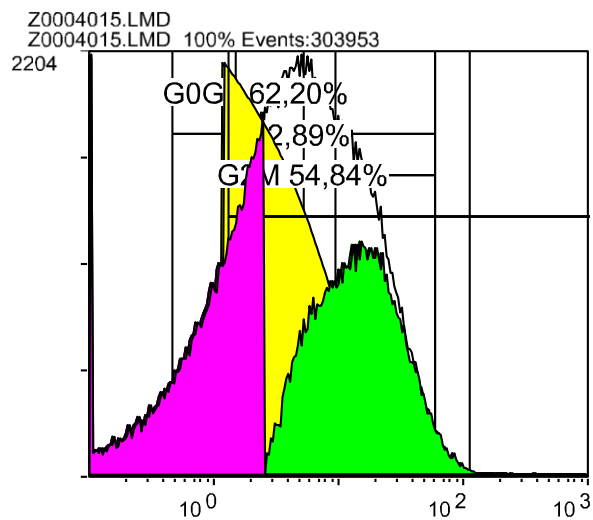
Slika 8. Histogram s prikazom DNA uzorka tumora psa (tumor Sertolijevih stanica).



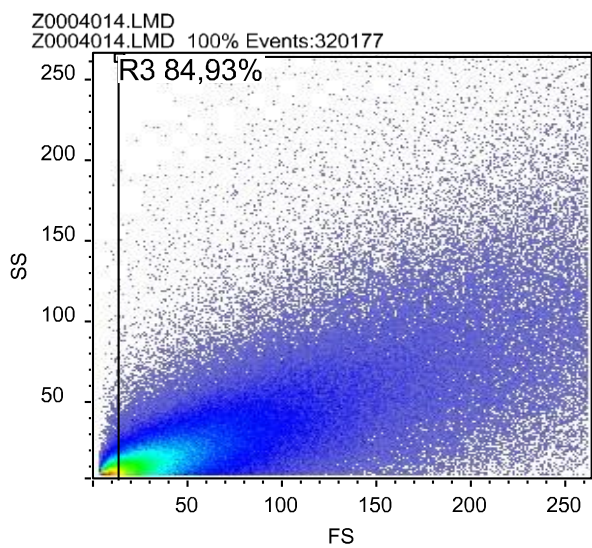
Slika 9. Histogram s prikazom DNA uzorka uzorka tumora psa (seminom) .



Slika 10. Histogram s prikazom DNA tumora psa (seminom).



Slika 11. Histogram s prikazom algoritamskog razdvajanja vrha (peak) na faze staničnog ciklusa kod tumora psa (tumor Leydigovih stanica) .



Slika 12. Dot plot s prikazom veličine i strukture stanica tumora psa (tumor Sertolijevih stanica).

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio komparativna analiza tumora sjemenika pasa pomoću dvije različite pretrage tj. histopatološke pretrage i protočne citometrije. Na temelju toga htjelo se utvrditi da li bi se klasična i već standardizirana metoda histopatološke pretrage koja se koristi za razlikovanje različitih tipova tumora sjemenika mogla upotpuniti metodom protočne citometrije te da li postoje razlike u rezultatima analize protočnom citometrijom za svaki pojedini tip tumora koje bi korelirale sa rezultatima histopatološke pretrage. Na ovaj način smo željeli utvrditi da li bi se eventualno metoda protočne citometrije mogla koristiti kao jedna od metoda za diferencijaciju pojedinih tipova tumora sjemenika u pasa.

Histopatološka pretraga se potvrdila kao pouzdana i kvalitetna metoda za diferencijaciju pojedinih tipova tumora sjemenika pasa (McGavin i Zachary, 2006).

Kod izvedbe osjetljivih metoda kao što je protočna citometrija, priprema uzoraka koji će se analizirati, je jedan od najvažnijih čimbenika jer u najvećoj mjeri utječe na krajnje rezultate. Ovakav tip istraživanja se do sada nije provodio na tumorima sjemenika pasa (Reggeti i Bienzle, 2011.) te je zbog bilo teško postaviti protokol za njegovo izvođenje što je također dodatno otežalo provođenje ove analize s obzirom da je i rutinski za pravilno izvođenje protočne citometrije potrebna stručna osposobljenost i prije svega iskustvo, mnogo rada i vježbe. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da iz svih analiziranih uzoraka metodom protočne citometrije nisu dobiveni podaci koji uključuju broj i izgled kromosoma, količinu DNK, broj mitozu u jezgri. Ovo je najvjerojatnije posljedica pripreme samih uzoraka koja u potpunosti nije adekvatna jer postoje različiti protokoli za pripremu uzoraka tkiva, koje je u nekim slučajevima potrebno i kombinirati, pa je između ostalog, za dobivanje zadovoljavajućih rezultata potrebno protokol pripreme uzoraka tkiva prilagoditi i protočnom citometru koji se koristi u analiziranju.

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da bi, osim pripreme uzoraka tkiva koja će se analizirati, za bolje rezultate istraživanja trebalo tijekom izvođenja koristiti i različita razrjeđenja boja te posljedično tome utvrditi koja najbolje odgovaraju ispitivanom uzorku stanica i korištenom protočnom citometru. Osim toga, potrebno je i isprobati koje je sve postupke moguće primjeniti kako bismo dobili dobru populaciju stanica koja nam je od interesa iz analiziranog uzorka tkiva, kao na primjer da li bismo trebali koristiti manje agresivne enzime i slično.

Provođenjem ovog istraživanja utvrdili smo da postoji mogućnost da se protočna citometrija koristi kao jedna od metoda u dijagnostici tumora sjemenika pasa. No, usprkos tome potrebno je postavljanje detaljnih dijagnostičkih kriterija pomoću kojih bi se mogli komparirati rezultati analize protočne citometrije s histopatološkom analizom tumora koja je danas jedina objektivna metoda za određivanje tipova tumora. Kako bi se ti navedeni dijagnostički kriteriji odredili potrebno je provesti opsežnije istraživanje na znatno većem broju uzoraka tumorozno promijenjenih i patološki nepromijenjenih sjemenika. Na temelju rezultata takvih istraživanja treba se provesti komparativna analiza histopatološke pretrage i pretrage metodom protočne citometrije kako bi se eventualno dobili podaci o prikladnosti protočne citometrije kao jedne od metoda za diferencijaciju tumorski promijenjenih od tumorski nepromijenjenih sjemenika te za diferencijaciju pojedinih tipova tumora sjemenika. Mogući razlozi ne korištenja protočne citometrije u rutinskoj dijagnostici, unatoč njenim brojnim prednostima, su najvjerojatnije ekonomske prirode, te zahtjevi za rukovanjem stručno osposobljenog osoblja.

6. ZAKLJUČCI

1. Utvrđeno je da histopatološka pretraga predstavlja objektivnu dijagnostičku metodu za razlikovanje pojedinih tipova tumora sjemenika u pasa.
2. Iako dobiveni rezultati protočne citometrije nisu bili dostatni i dovoljno precizni za donošenje definitivnog zaključka o karakteristikama istraživanih neoplastičnih promjena, iz dobivenih rezultata je vidljivo da se primjenom metode protočne citometrije na uzorcima sjemenika pasa mogu dobiti neke nove informacije o svojstvima stanice (broj kromosoma, postotak stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa).
3. Dobiveni rezultati protočne citometrije pokazuju da je iz uzoraka tkiva tumora sjemenika pasa koje je pripremljeno za histopatološku pretragu (parafinski blokovi) moguće dobiti određene podatke koji se mogu koristiti za diferencijaciju neoplastičnog od nepromijenjenog tkiva (promjene u kariotipu, količini DNK, granuliranost, veličina stanica).
4. Kako bi se postavili detaljni dijagnostički kriteriji pomoću kojih bi se mogli komparirati rezultati analize protočne citometrije s histopatološkom analizom tumora potrebno je primarno uspostaviti pouzdane protokole za provedbu protočne citometrije pomoću kojih bi se točnije mogle razlučiti karakteristike stanica i njihove genetske osobine.
5. Kod provođenja metode protočne citometrije, osim kvalitete uzoraka i rada protočnog citometra, vrlo je bitno pažnju posvetiti pripremi uzoraka, odrediti najprikladniju metodu pripreme, prilagoditi ga protočnom citometru koji se koristi i raditi više uzoraka kako bismo pronašli najoptimalniji način za dobivanje dobrih rezultata istraživanja i analize.
6. Nakon standardiziranja metode protočne citometrije treba provesti opsežnije istraživanje na znatno većem broju uzoraka tumorozno promijenjenih i patološki nepromijenjenih sjemenika.
7. Metoda protočne citometrije pruža mnoge mogućnosti i ostavlja puno prostora za napredak u dijagnostici tumora sjemenika pasa osobito ako je kombinirana s do sada uhodanim metodama pretrage kao što su histopatološka analiza tumora sjemenika.
8. Mogući razlozi ne korištenja protočne citometrije u rutinskoj dijagnostici, unatoč njenim brojnim prednostima, su najvjerojatnije ekonomske prirode, te zahtjevi za rukovanjem stručno osposobljenog osoblja.

7. LITERATURA

1. Andor an Oxford Instruments Company, <raspoloživo na: <http://www.andor.com/learning-academy/spectral-flow-cytometry-an-introduction-to-spectral-flow-cytometry>>, [pristupljeno 20. august 2015.].
2. Cooley C.L., Waters (2001.): Tumors of the male genital system. U Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 3th edn. (Withrow S.J i E.G. MacEwen, Ur.), Saunders, Philadelphia, 480-482.
3. Cooper G.M., (2000.): The Cell: A Molecular Approach, 2nd ed. [E-book], Boston, pristupljeno preko National Center for Biotechnology Information, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>, [pristupljeno 10. rujan 2015.].
4. Fan T.M., De Lorimer L.P., (2007.): Tumors of the male reproductive system. U Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 4th ed. Uredio Withrow S.J. Vail D.M. St. Loiuise: Saunders; 799-804.
5. Foster R.A., Ladds P.W., (2007.): Male genital system. U Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of Domestic Animals, Volume 3. 5th ed. Uredio Grant Maxie M. Philadelphia: Elsevier Saunders; 565-619.
6. Grootenhuis A.J., Van Sluijs F.J., Klaji I.A., Steenbergen J., Timmermen M.A., Bevers M.M., Dielman S.J., De Jong F.H., (1990.): Inhibin, gonadotrophins and sex steroids in dogs with Sertoli cell tumours, J. Endocrinol., 127, 235-42.
7. Hohšteter M., (2012.): Poredbena patologija tumora sjemenika psa i čovjeka u Republici Hrvatskoj, Disertacija, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
8. Hohšteter M., Artuković B., Severin K., Gudan Kurilj A., Beck A., Šoštarić-Zuckermann I.C., Grabarević Ž., (2014.): Canine testicular tumors: two types of seminomas can be differentiated by immunohistochemistry, BMC Veterinary Research, [Online], 10: 169, <raspoloživo na: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/10/169>>, [pristupljeno 10. rujan 2015.].
9. Kozarić Z., (1997.): Veterinarska histologija, 195-197.
10. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Hrvatska enciklopedija, <raspoloživo na: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=34167>> [pristupljeno 10. rujan 2015.].

11. Liao A.T., Chu P.Y., Yeh L.S., Lin C.T., Liu C.H., (2009.): A 12-year retrospective study of canine testicular tumors, *J Vet Med Sci*, [Online], 71 (7), 919-923, <raspoloživo na: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/71/7/71_7_919/article>, [pristupljeno 01. rujan 2015.].
12. McGavin M.D., Zachary J.F., (2006.): *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 4th ed. 1036-1038.
13. Maclachlan N.J., Kennedy P.C., (2002.): Tumors of the genital systems. U *Tumors in Domestic Animals*, 4th ed. Uredio Meuten D.J., Ames, Iowa, Iowa Sate Press, 547-574.
14. Nola I., (2005.): Kliničko-patološki čimbenici i značajke staničnog ciklusa u predviđanju ishoda melanoma kože, Disertacija, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
15. North S., Banks T., Straw R., (2009.): Tumors of the urogenital tract. U *Small Animal Oncology, an introduction*. Uredio North S., Banks T., Straw R., Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louise, Sydney, Toronto, Elsevier Saunders, 151-172.
16. Nødtvedt A., Gamlem H., Gunnes G., Grotmol T., Inderbø A., Moe L., (2011.): Breed differences in the proportional morbidity of testicular tumours and distribution of histopathologic types in a population-based canine cancer registry, *Vet Comp Oncol*, 9 (45), 45-54.
17. Ormerod M.G., (2009.): *Flow cytometry: A basic Introduction*, [E-book], pristupljeno preko De Novo Software, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>, [pristupljeno 10. august 2015.].
18. Popović M., Valpotić H., Kardum-Paro M., Pavičić Ž., Vijić N., Popović I., Resanović R., Valpotić I., (2008.): Kvalitativne i kvantitativne karakteristike celularnog imuniteta svinja, *Acta veterinaria*, 58 (2-3), 149-158.
19. Reggeti F., Bienzle D., (2011.): *Flow Cytometry in Veterinary Oncology*, *Veterinary Pathology*, 48, (1), 223-235.
20. Restucci B., Maiolino P., Paciello O., Martano M., De Vico G., Papparella S., (2003): Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry, *J. Comp. Pathol.* 128, 252-259.
21. Samaržija D., Antunac N., Pogачić T., Sikora S., (2007.): Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku metodom protočne citometrije, *Mljekarstvo*, 54 (1), 39-51.

22. Šoštarić-Zuckermann I.C., Severin K., Hohšteter M., Artuković B., Beck A., Gudan Kurilj A., Sabočanec R., Džaja P., Grabarević Ž., (2013.): Incidence and types of canine tumours in Croatia, *Veterinarski arhiv*, 83 (1), 31-45.
23. Vujica N., (2005.): Analiza dobno ovisnih promjena imunohematoloških pokazatelja u perifernoj krvi domaćih životinja s pomoću protočne citometrije, Diplomski rad, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
24. Wrobel K.H., Bergmann M., (2006): Male Reproductive System. U: *Delmann's textbook of veterinary histology 6th ed.* Uredio Eurell, J.L., Frappier B.L., Blackwell Publishing Ltd., Ames, Iowa, USA, 233-255.
25. Zobundžija M., Babić K., Gjurčević Kantura V., (2009): Anatomija domaćih sisavaca, 417-421.

8. SAŽETAK

Tumori sjemenika pasa spadaju u najčešće tumore spolnog sustava te među najčešće tumore pasa uopće. Većina tumora se dijagnosticira u kasnijoj fazi kada već dođe do povećanja sjemenika, pri čemu se kao jedina i najbolja metoda liječenja koristi kastracija, nakon koje se može postaviti i konačna dijagnoza na temelju histopatološke pretrage zahvaćenog sjemenika.

U ovom istraživanju je provedena histopatološka analiza arhiviranih uzoraka najčešćih tumora sjemenika pasa (9 uzoraka) i jednom uzorku nepromijenjenog sjemenika, te je provedena histopatološka klasifikacija. Isti uzorci su podvrgnuti analizi DNK metodom protočne citometrije kako bi se utvrdio udio tumorskih stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa.

Provedenom komparativnom analizom rezultata histopatološke pretrage i protočne citometrije se nastojalo utvrditi da li postoji korelacija između histološke klasifikacije tipova tumora i rezultata protočne citometrije odnosno jesu li promjene u genetskom materijalu (aneuploidija, povećan broj mitozu) ili fizikalnim svojstvima (veličina, oblik, granuliranost) tumorskih stanica povezane sa histološkim tipom tumora, a što je vrlo često kod tumora sjemenika muškaraca. Provedbom obje analize je utvrđeno da histopatološka pretraga predstavlja objektivnu dijagnostičku metodu za razlikovanje pojedinih tipova tumora sjemenika u pasa. Primjenom metode protočne citometrije na uzorcima sjemenika pasa mogu se dobiti neke nove informacije o svojstvima stanice, (broj kromosoma, postotak stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa). Dobiveni su rezultati protočne citometrije koji iako nisu bili dostatni i dovoljno precizni za donošenje definitivnog zaključka o karakteristikama istraživanih neoplastičnih promjena, pokazuju da je primjenom metode protočne citometrije na uzorcima sjemenika pasa moguće dobiti nove informacije o svojstvima stanice (broj kromosoma, postotak stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa). Kako bi se protočna citometrija te njezini rezultati mogli objektivnije analizirati te koristiti u dijagnostici neoplazija testisa u pasa potrebno je optimizirati i standardizirati metodu te postaviti detaljne dijagnostičke kriterije. Takvi takvi kriteriji bi se zatim trebali komparirati s rezultatima histopatološke analize tumora za što je potrebno provesti opsežnije istraživanje na znatno većem broju uzoraka tumorozno promijenjenih i patološki nepromijenjenih sjemenika.

Metoda protočne citometrije pruža mnoge mogućnosti i ostavlja puno prostora za napredak u dijagnostici tumora sjemenika pasa osobito ako je kombinirana s do sada uhodanim metodama pretrage kao što su histopatološka analiza tumora sjemenika.

Ključne riječi: pas, tumor, sjemenici, protočna citometrija, patohistološka pretraga

9. SUMMMARY

Comparative analysis of canine testicular tumours with use of the histopathological analysis and flow cytometry

Canine testicular tumours are one of the most frequent tumours of the dog genital system and among the most frequent tumours of the dogs generally. Most tumours are diagnosed at a later stage when enlargement of the testicles is already present wherein the only and the best treatment method used is castration, after which a final diagnosis can be set up based on histopathological analysis of affected testicle.

In this research, histopathological analysis was conducted on the archive samples of the most frequent canine testicular tumours (9 samples) and on one sample without the presence of a tumour changes, also the histopathological classification of the tumours has been conducted. The same samples were exposed to DNA analysis using flow cytometry to determine the proportion of tumor cells in certain stages of the cell cycle.

With conducted comparative analysis of the results of histopathological evaluation and flow cytometry we tried to determine wheter there is a correlation between the histologically classified types of tumors and results of flow cytometry or whether changes in the genetic material (aneuploidy, an increased number of mitosis) or physical properties (size, shape, granularity) of tumor cells were associated with histological type of tumor, which is very common in testicular tumors of men. With implementation of both studies, it was found that a histopathological eevaluation is an objective diagnostic method for distinguishing certain types of canine testicular tumors.

The obtained results of flow cytometry, although they were not sufficient and precise enough for making a definitive conclusion, on the characteristics of the studied neoplastic changes show that with usage of the method of flow cytometry on the samples of canine testicles it is possible to get some new information about the properties of the cells (the number of chromosomes, the percentage of cells in each stage of the cell cycle). In order to flow cytometry and its results can be objectively analyzed and used in the diagnosis of testicular neoplasia in dogs it is necessary to optimize and standardize the method and detailed set of diagnostic criteria. Such criteria should then be compared with the results of histopathological analysis of the

tumours for what is necessary to conduct extensive research on a much larger number of samples of unmodified and neoplastically modified testicles.

Flow cytometry provides many possibilities and leaves much space for improvement in the diagnosis of canine testicular tumours, especially if it was combined with well-established methods such as histopathological evaluation of testicular tumours.

Key words: dog, tumour, testicles, flow cytometry, histopathological analysis

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30. studenog 1988. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu pohađala sam u Virovitici. Nakon završene srednje škole, upisala sam 2007. godine, Veterinarski fakultet u Zagrebu. Tijekom cijelog studija radila sam razne studentske poslove, no najduži period provela sam u kopiraoni gdje sam radila od studenog 2007. do siječnja 2013. godine. Osvojila sam nagradu u kategoriji najbolje oralne prezentacije studenata na Međunarodnom kongresu Veterinarske znanosti i struke održanom na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu u listopadu 2013. godine. Iste godine sudjelovala sam u znanstveno-istraživačkom radu u suradnji sa studentskom udrugom BIUS u sklopu koje smo posjetili Cres i prikupljali uzorke probavne mikroflore kravosasa (*Elaphe quatuorlineata*) na temelju kojih smo izradili i znanstveni rad koji je također predstavljen na Međunarodnom kongresu Veterinarske znanosti i struke u listopadu 2013. godine. Iste godine, bila sam i jedna od prvih stipendista zagrebačkog zoološkog vrta. U svibnju 2014. godine počela sam raditi na poziciji suradnika u farmakovigilanci na kojoj sam i danas.