

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



Comparative analysis of canine testicular tumors using histopathological and flow cytometry methods

Mihoković, S.^{1*}, D. Kezić², M. Mišić³, M. Popović², M. Hohšteter⁴

Sažetak

Tumori sjemenika pasa najčešći su tumori spolnog sustava te među najčešćim tumorima pasa uopće. Većinom se dijagnosticiraju u kasnijoj fazi, kada dođe do povećanja sjemenika, te se u svrhu liječenja obavlja kastracija nakon koje se postavlja dijagnoza na temelju histopatološke pretrage.

U ovom je istraživanju provedena histopatološka analiza i klasifikacija arhiviranih uzoraka najčešćih tumora sjemenika pasa (9 uzoraka) i jednog uzorka nepromijenjenog sjemenika, te je provedena analiza DNK metodom protočne citometrije. Provedenom komparativnom analizom nastojala se utvrditi korelacija između tipova tumora i rezultata protočne citometrije, tj. jesu li promjene u genetičkim ili fizikalnim svojstvima tumorskih stanica povezane s histološkim tipom tumora. Utvrđeno je da je histopatološka pretraga objektivna dijagnostička metoda za razlikovanje pojedinih tipova tumora sjemenika u pasa. Dobiveni rezultati protočne citometrije, iako nisu bili dostatni i dovoljno precizni za donošenje definitivnog zaključka o karakteristikama istraživanih neoplastičnih promjena, pokazuju da je primjenom protočne citometrije na uzorcima sjemenika pasa moguće dobiti nove informacije o svojstvima stanica. Kako bi se protočna citometrija i njezini rezultati mogli objektivnije analizirati te koristiti u dijagnostici neoplazija testisa u pasa, potrebno je optimizirati i standardizirati metodu te postaviti detaljne dijagnostičke kriterije, za što je potrebno provesti istraživanje na znatno većem broju uzoraka tumorozno promijenjenih i patološki nepromijenjenih sjemenika.

Metoda protočne citometrije može pomoći u dijagnostici tumora sjemenika pasa, osobito ako je kombinirana s do sada uhodanim metodama pretrage kao što je histopatološka analiza tumora sjemenika.

Abstract

Canine testicular tumors are the most prevalent male genital neoplasms and among the most common canine neoplasms overall. Most of these neoplasms are diagnosed in the late phase when testicular enlargement is observed. Castration is followed by histopathological analysis, which is performed for both therapeutic and diagnostic purposes.

In this research, histopathological analysis and classification was undertaken together with DNA analysis by flow cytometry of archived samples of the most common canine testicular neoplasm (9 samples) and one of neoplastically unchanged testicle. The aim of this study was to find a correlation between different tumor types and the results of flow cytometry. Our results showed

¹Sanja Mihoković, dr. med. vet., PrimeVigilance Zagreb d.o.o.,

²dr. sc. Dubravko Kezić i prof. dr. sc. Maja Popović, Zavod za biologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,

³Marija Mišić, mag. mol. biol., Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

⁴doc. dr. sc. Marko Hohšteter, Zavod za veterinarsku patologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*e-mail: sanja.mihokovic@gmail.com

Ključne riječi: pas, testis, tumor, histopatologija, protočna citometrija

Key words: dog, testicle, tumor, histopathology, flow cytometry

that histopathological analysis represents an objective diagnostic method for differentiation of different canine testicular tumors. The results of flow cytometry, although not sufficiently precise for drawing definitive conclusions on the characteristics of the testicular neoplasm, show that flow cytometry can give new information about these neoplastic cells. For better results and application of flow cytometry in canine testicular neoplasm diagnosis, optimization and standardization of this method by establishing detailed diagnostic criteria should be undertaken. For this, investigation of a large number of neoplastic and non-neoplastic testicle samples is required.

In conclusion, the flow cytometry method has the capacity to improve diagnosis of canine testicular neoplasms, especially combined with the standard histopathological method.

UVOD

Tumori sjemenika najčešći su tumori genitalnog sustava muških pasa gdje čine oko 90 % svih genitalnih tumora (North i sur., 2009.). Na temelju istraživanja provedenog u Republici Hrvatskoj, u razdoblju od tri godine (2006. – 2009.) tumori spolnog sustava čine oko 7,97 % od svih tumora pasa (Šoštarić-Zuckermann i sur., 2013.). Dobna predispozicija vrlo je bitan čimbenik u razvoju tumora, na što upućuju brojna istraživanja koja su pokazala da se tumori sjemenika najčešće pojavljuju u starijih pasa. Tri najčešća primarna tumora sjemenika jesu tumori intersticijskih (Leydigovih) stanica, seminomi i tumori Sertolijevih stanica (Hohšteter i sur., 2012.; McGavin i Zachary, 2006.). U manjoj mjeri mogu se razviti i tumori testikularnih mezenhimnih 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 pojavljuju se uginuća pasa kao posljedica tumora sjemenika, no isto tako često posljedica može biti neplodnost životinja. Metastaze koje se mogu pojaviti, 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 važnih za diferencijaciju tumora sjemenika, kao i vrlo mali broj istraživanja koja se provode na neklasificiranim intratubularnim neoplazijama zametnih stanica (engl. *intratubular germ cell neoplasia of undifferentiated origin*, IGCNU).

Protočna citometrija jest analitička metoda kojom se, među ostalim, mogu analizirati fizikalna svojstva stanica, odnosno njihova veličina, oblik i zrnatost, kao i drugi parametri (promjene u jezgri ili kariotipu stanica, broj mitoz). Na temelju ovih parametara može se utvrditi heterogenost populacije stanica te razlikovati pojedine podskupine i odrediti njihov udio unutar određene populacije stanica. Metoda protočne citometrije temelji se na mjerenju raspršenja svjetlosti i fluorescencije koja nastaje prolaskom suspenzije stanica kroz fokusiranu lasersku zraku. Količina raspršenog svijetla ovisi o veličini, obliku i homogenosti stanice ili drugih čestica koje prolaze kroz lasersku zraku, no isto tako i o kutu iz kojega se raspršenje mjeri. 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 se fazi staničnog ciklusa nalazi određeni broj tumorozno promijenjenih stanica (Cooper, 2000., Ormerod, 2009.). Velika prednost ove metode jest njezina 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 istodobno (veličina, zrnatost, oblik, sadržaj DNK stanica, faze staničnog ciklusa) (Ormerod, 2009.). Za ispitivanje staničnog ciklusa protočnom citometrijom mogu se koristiti uzorci svježeg tkiva ili uzorci tkiva uklopljeni u parafin. U Republici Hrvatskoj protočna se citometrija većinom ne koristi kao rutinska metoda u veterinarskoj medicini, no iznimke ipak postoje, kao što je to slučaj kod primjene protočne citometrije kao rutinske metode u procjenjivanju ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku (Samaržija, 2004.).

Budući da su vlasnici životinja u današnje vrijeme iznimno zainteresirani za liječenje tumora svojih kućnih ljubimaca, osobito životinja poželjnih genetičkih 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, i u Hrvatskoj i u ostatku svijeta, utvrđivanje korelacije između rezultata histopatološke analize tumora te analize rezultata dobivenih primjenom protočne citometrije u svrhu utvrđivanja utjecaja genetičkih i molekularno patoloških karakteristika tumorskih stanica na biološko ponašanje tumora testisa, važno je radi dobivanja novih spoznaja koje mogu pridonijeti boljoj dijagnostici, prognozi i liječenju ovih bolesti.

MATERIJALI I METODE

Uzorci

Za potrebe istraživanja korišteni su arhivirani uzorci tumora sjemenika pasa sa Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskoga 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 provedene su na devet nasumično odabranih arhiviranih uzoraka tumora sjemenika pasa koji su makroskopski bili promijenjeni te na jednom makroskopski nepromijenjenom uzorku testisa. Komparativnom analizom histopatološke pretrage i metodom protočne citometrije nastojala se utvrditi korelacija između tipova tumora i rezultata protočne citometrije, tj. jesu li promjene u genetičkim ili fizikalnim svojstvima tumorskih stanica povezane s histološkim tipom tumora.

Histopatološka pretraga

U svrhu histološke analize uzoraka tumora sva tkiva sjemenika, odnosno njihovi dijelovi fiksirani su u 10 %-tnom puferiranom formalinu i uklopljeni u parafin. Za bojenje uzoraka tumora korištena je rutinska metoda bojenja, hematoksilin-eozin (HE) metoda. Histološki su uzorci analizirani svjetlosnim mikroskopom (OLYM-

PUS, CX 21), najprije pod povećanjem od 100x, a nakon toga i pod povećanjem od 400x. Histološka klasifikacija tumora sjemenika provedena je u skladu s kriterijima klasifikacije tumora sjemenika pasa i ljudi Svjetske zdravstvene organizacije (KENNEDY i sur., 1998.).

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. Uzorci tkiva prvo su obrađeni kako bi se uklonili ostaci parafina. Parafin je uklonjen potapanjem uzoraka u ksilolu tijekom 30 minuta nakon čega je ksilol uklonjen vakuumskom sisaljkom. Uzorci su potom rehidrirani uzastopnim umakanjem u 100 %-tnom, 95 %-tnom i 70 %-tnom etanolu, s razmacima od po 10 minuta između umakanja u pojedine koncentracije, te su prije stavljanja uzoraka u drugu koncentraciju, ostaci prethodno dodanog etanola uklonjeni vakuumskom sisaljkom.

Nakon finalne rehidracije u destiliranoj vodi u trajanju od 10 min, voda je uklonjena vakuumskom sisaljkom te su oni inkubirani s 2 mL 0,5 %-tnog pepsina u 0,9 % NaCl (pH 1,5) kroz 60 minuta, prilikom kojih su uzorci bili uronjeni u vodenu kupelj na 37 °C uz stalno miješanje.

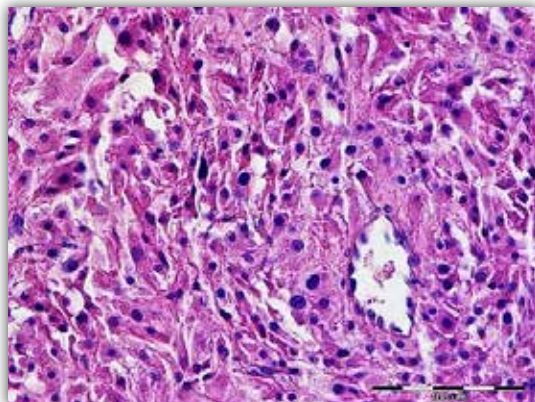
Uzorci su zatim profiltrirani kroz sito veličine 50 µm te centrifugirani na 400 G tijekom 5 minuta. Zatim je uzorcima dodano 50 µL 100 µg/mL ribonukleaze A (Sigma-Aldrich, Njemačka) i 200 µL 50 µg/mL propidij-jodida (Sigma-Aldrich, Njemačka) te su pohranjeni na +4 °C preko noći. Sljedeći dan su uzorci analizirani protočnim citometrom EPICS XL (Beckman-Coulter, USA). Dobiveni rezultati analizirani su Flowlogic programom (Invai technologies, Australija).

REZULTATI

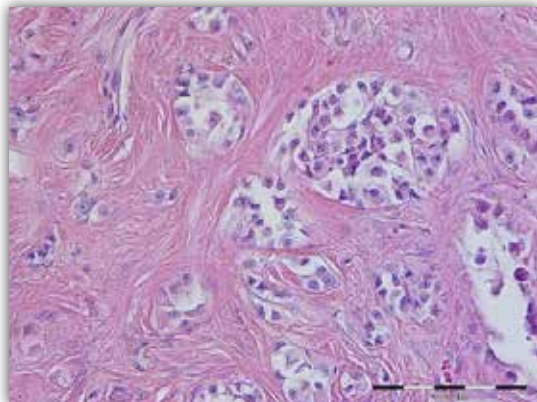
Histološka analiza tumora sjemenika pasa

Od ukupno deset uzoraka tumora sjemenika na kojima je rađena patohistološka analiza, četiri su uzorka bila seminomi (40 %) (slike 3 i 4), tri uzorka tumori intersticijskih (Leydigovih) stanica (30 %) (slika 1), te po jedan uzorak tumora Sertolijevih stanica (10 %) (slika 2), mješovitog tumora Leydigovih i Sertolijevih stanica

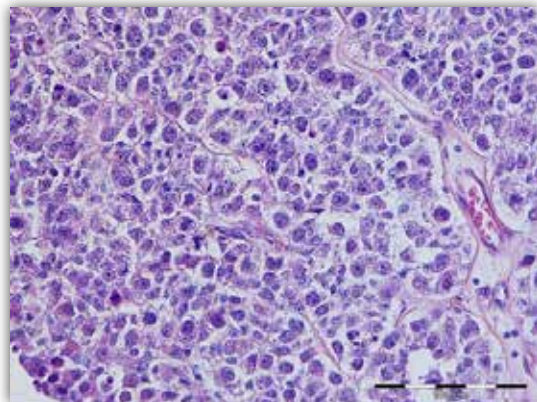
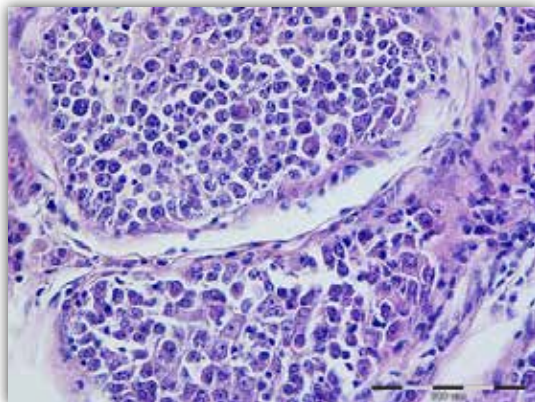
Slika 1. Lijevo: tumor intersticijskih (Leydigovih) stanica psa. 400x (HE)



Slika 2. Desno: tumor Sertolijevih stanica psa. 400x (HE)

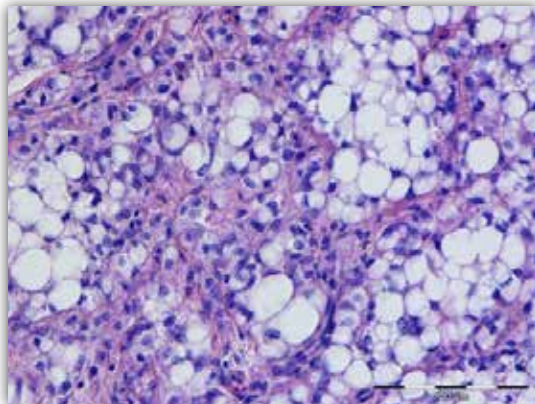


Slika 3. Lijevo: intratubularni oblik seminoma psa. 400x (HE)

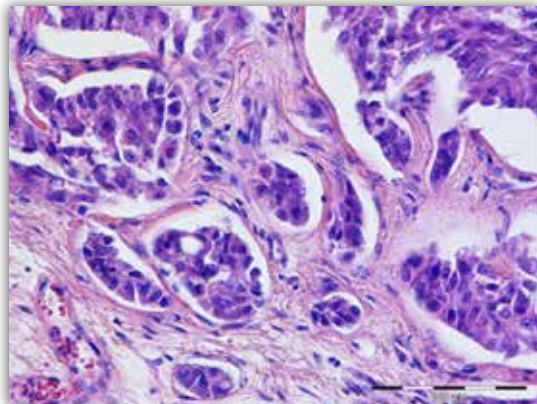


Slika 4. Desno: difuzni oblik seminoma psa. 400x (HE)

Slika 5. Lijevo: mješoviti tumor Leydigovih i Sertolijevih stanica, psa. Dio tumora s neoplastičnim Leydigovim stanicama. 400x (HE)



Slika 6. Desno: mješoviti tumor Leydigovih i Sertolijevih stanica psa. Dio tumora s neoplastičnim Sertolijevim stanicama. 400x (HE)



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

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

(10 %) (slike 5 i 6) i jedan uzorak bez tumorskih promjena (10 %), koji je služio kao negativna kontrola (tablica 1). Niti jedan od uzoraka tumora nije bio malignog karaktera.

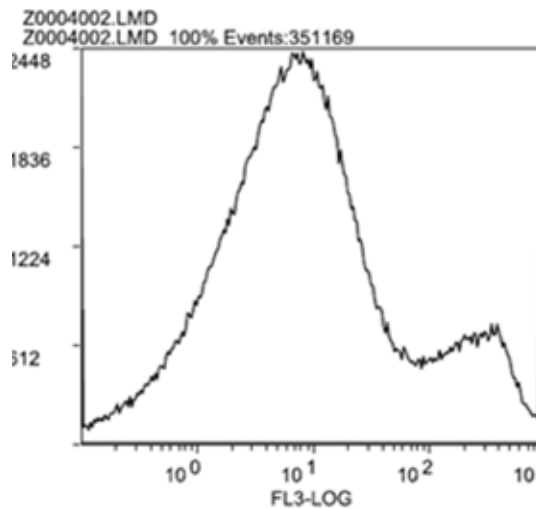
Protočna citometrija

Histogrami na kojima je prikazana FL3-LOG skala (slike 7-10) 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 jer, 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.

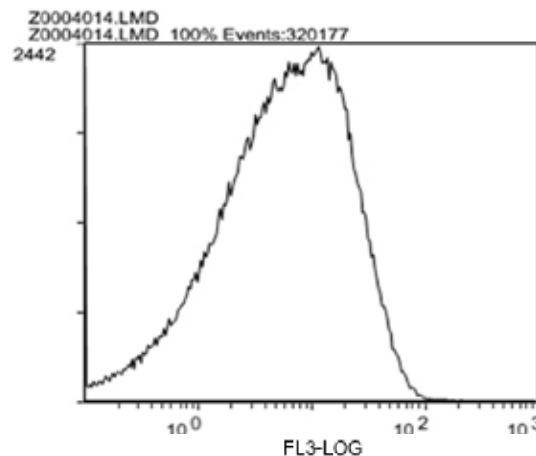
Na prikazu (slika 7) uzorka poliploidnog tumora sjemenika čovjeka (iz arhive Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu) uočavaju se tri vrha. Veća količina DNA dovodi do većeg vezanja propidij-jodida te jače fluorescencije što se vidi na FL3 logaritamskoj ljestvici (apscisa). Prvi vrh predstavlja stanice s jednostrukom količinom DNA u G0/G1 fazi, dok drugi predstavlja stanice u G2/M fazi ciklusa s dvostrukom količinom DNA. Treći vrh pokazuje da poneke stanice sadržavaju veću količinu DNA te upućuje na poliploidnost uzorka.

Na uzorcima tumora testisa pasa nismo uspjeli dobiti veću razlučivost među populacijama stanica, no usprkos tome nijedan od analiziranih uzoraka ne pokazuje više vrhova, što znači da ti uzorci vjerojatno nisu poliploidni (slike 8-10). Smanjena razlučivost vjerojatno je uzrokovana prevelikim obojenjem propidij-jodidom. Uočava se samo po jedna homogena populacija stanica bez dodatnih vrhova na FL3 logaritamskoj ljestvici koji bi upućivali na povećanu količinu DNA u stanicama. Moguće je da se radi o dominantno jednom tipu stanica, tj. tumorskim staničnim klonovima pojedinih tipova stanica testisa (Sertolijeve, Leydigove i zametne stanice testisa).

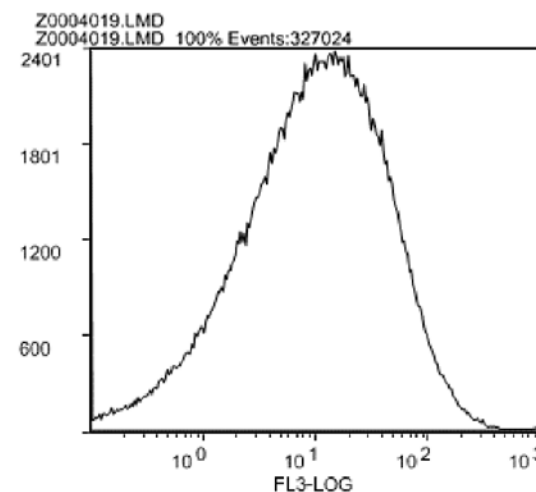
Na slici 11. prikazana je veličina i struktura (granuliranost) svake pojedinačne stanice tumora Sertolijevih stanica psa na linearnoj ljestvici. Na njemu se ne uočava više populacija, već se stanice jednostavno grupiraju u jednu homogenu masu gdje je veća prisutnost sitnih čestica koje su vjerojatno stanični fragmen-



Slika 7. Histogram s prikazom DNA poliploidnog uzorka tumora čovjeka. Na apscisi je prikazana logaritamska ljestvica snage fluorescencije, a na ordinati broj čestica. (Izvor: Arhiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu).

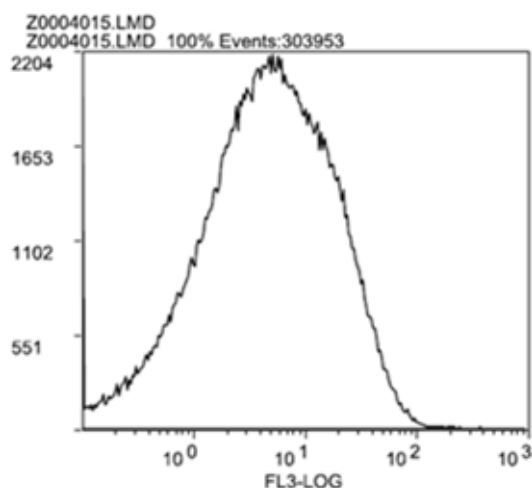


Slika 8. Histogram s prikazom DNA uzorka tumora psa (tumor Sertolijevih stanica). Na apscisi je prikazana logaritamska ljestvica snage fluorescencije, a na ordinati broj čestica.

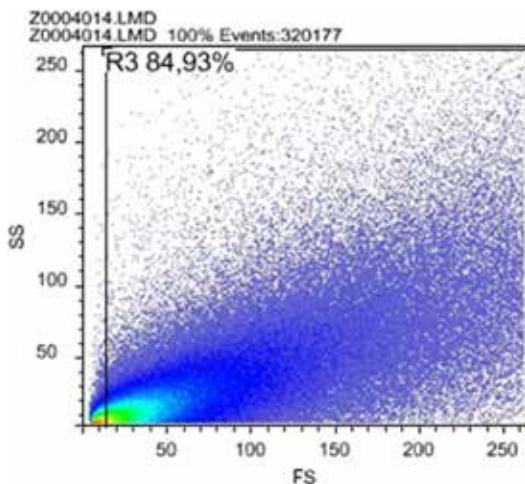


Slika 9. Histogram s prikazom DNA uzorka tumora psa (seminom). Na apscisi je prikazana logaritamska ljestvica snage fluorescencije, a na ordinati broj čestica.

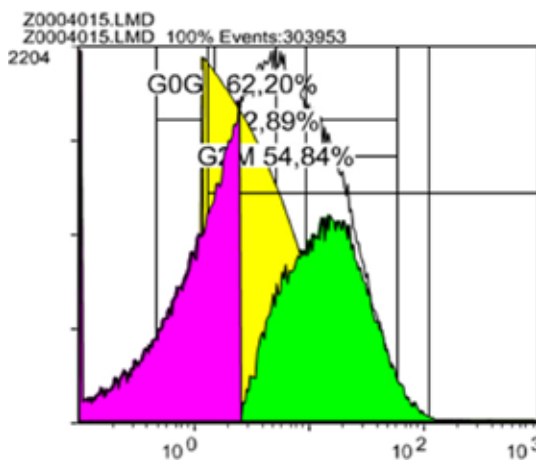
Slika 10. Histogram s prikazom DNA uzorka tumora psa (tumor Leydigovih stanica). Na apscisi je prikazana logaritamska ljestvica snage fluorescencije, a na ordinati broj čestica.



Slika 11. Dot-plot s prikazom veličine i strukture stanica tumora psa (tumor Sertolijevih stanica). Na SS ljestvici (ordinata) jest intenzitet raspršene svjetlosti koji ovisi o strukturi i kompleksnosti čestica u uzorku, a na FS ljestvici (apscisa) jest intenzitet raspršene svjetlosti u smjeru laserske zrake koji nam govori o relativnoj veličini čestice.



Slika 12. Histogram s prikazom algoritamskog razdvajanja vrha (peak) na faze staničnog ciklusa kod tumora psa (tumor Leydigovih stanica). Na apscisi je prikazana logaritamska ljestvica snage fluorescencije, a na ordinati broj čestica.



ti. Postotak od 84,93 % (desno od postavljene granice) pokazuje koje smo čestice uzeli u daljnju obradu (slika 11). S obzirom na to da bi nam premalene čestice samo dodatno otežavale analizu, čestice lijevo od postavljene granice isključili smo iz daljnje analize. Na SS ljestvici (ordinata) jest intenzitet raspršene svjetlosti koji ovisi o strukturi i kompleksnosti čestica u uzorku. Relativno nizak intenzitet pokazuje da su stanice u tumoru relativno jednostavne građe, bez mnogo krupnih staničnih elemenata. Na FS ljestvici (apscisa) jest intenzitet raspršene svjetlosti u smjeru laserske zrake, koji nam govori o relativnoj veličini čestice. Na slici 11 vidimo da imamo velik spektar veličina čestica koje se ipak grupiraju u donjem lijevom kutu. Ovakav je raspored za očekivati jer je uzorak dobiven razbijanjem međustaničnih veza enzimima te je velika količina detritusa i slijepljenih stanica normalna. Stoga je i granična crta postavljena na ovoj ljestvici jer računamo da premale čestice (u odnosu na ukupni uzorak) predstavljaju fragmente i prašinu te ih isključujemo iz daljnje analize kako ne bi autofluorescencijom otežavale daljnju analizu.

Analizom uzorka, pomoću Inivai Technologies FlowLogic programa, moguće je dobiti i algoritamski prikaz udjela stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa, što je vidljivo na slici 12.

RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je komparativna analiza tumora sjemenika pasa pomoću dvije različite pretrage tj. histopatološke pretrage i protočne citometrije. Željelo se utvrditi može li se histopatološka pretraga, koja služi za razlikovanje različitih tipova tumora sjemenika, upotpuniti metodom protočne citometrije te postoji li razlika u rezultatima analize protočnom citometrijom za pojedine tipove tumora.

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

Pri izvedbi osjetljivih metoda, kao što je protočna citometrija, priprema uzoraka koji će se analizirati jedan je od najvažnijih čimbenika jer u najvećoj mjeri utječe na krajnje rezultate. Ovakav tip istraživanja do sada se nije provodio na tumorima sjemenika pasa (Reggeti i Bienzle,

2011.) te je zbog tog bilo teško postaviti protokol za njegovo izvođenje, što je dodatno otežalo provođenje ove analize. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da u svim analiziranim uzorcima nisu dobiveni dostatni, optimalni i dovoljno precizni rezultati koji bi uključivali broj i izgled kromosoma, količinu DNA te broj mitozu u jezgri. Iako postoji više različitih matematičkih modela po kojima je moguće izračunati udjele stanica u pojedinoj fazi ciklusa, nažalost zbog ograničenja matematički model nije u stanju dobro izračunati udjele ako se ne razlučuju vrhovi za G0/G1 fazu i M-fazu, što je u provedenom istraživanju bilo problem u daljnjoj analizi uzoraka. Iako u ovom slučaju nije dobiven idealan prikaz, prilagodbom protokola moguće je dobiti detaljniji uvid u količinu DNA u populaciji stanica te na temelju toga točnije algoritamski izračunati udjele stanica u pojedinoj fazi ciklusa. Temeljem dobivenih rezultata nije moguće donijeti definitivne zaključke o karakteristikama istraživanih neoplastičnih promjena.

Dobiveni rezultati pokazuju da se primjenom metode protočne citometrije na uzorcima sjemenika pasa, koji su pripremljeni za histopatološku pretragu (parafinski blokovi), mogu dobiti nove informacije o svojstvima stanice koji uključuju podatke o veličini stanice, broju kromosoma, postotku stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa, a oni mogu koristiti u diferencijaciji neoplastičnog od nepromijenjenog tkiva. Dobivanje nepotpunih podataka najvjerojatnije je posljedica pripreme samih uzoraka koja nije u potpunosti adekvatna jer postoje različiti protokoli za pripremu uzoraka tkiva, koje je u nekim slučajevima potrebno i kombinirati pa je, među ostalim, za dobivanje zadovoljavajućih rezultata potrebno protokol pripreme uzoraka tkiva prilagoditi i protočnom citometru koji se koristi u analizi.

Iz dobivenih je rezultata vidljivo da bi, osim pripreme uzoraka tkiva koja će se analizirati, za bolje rezultate istraživanja trebalo tijekom izvođenja koristiti i različita razrjeđenja boja te utvrditi koja najbolje odgovaraju ispitivanom uzorku stanica i korištenom protočnom citometru. Osim toga, potrebno je utvrditi moguće dodatne postupke koje je potrebno primijeniti za dobivanje čiste populacije tumorskih stanica koja nam je od interesa za citometrijsku analizu.

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 usporediti 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 istraživanje na znatno većem broju uzoraka tumorozno promijenjenih i 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.

ZAKLJUČCI

Histopatološka pretraga jest objektivna dijagnostička metoda za razlikovanje pojedinih tipova tumora sjemenika u pasa.

Iako dobiveni rezultati protočne citometrije nisu bili dostatni i dovoljno precizni za donošenje definitivnog zaključka o karakteristikama istraživanih neoplastičnih promjena, iz rezultata je vidljivo da se protočnom citometrijom na uzorcima sjemenika pasa koji su pripremljeni za histopatološku pretragu, mogu dobiti neke nove informacije o svojstvima stanice koje se mogu koristiti za diferencijaciju neoplastičnog od nepromijenjenog tkiva.

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 i standardizaciju metode protočne citometrije pomoću kojih bi se točnije mogle razlučiti karakteristike stanica i njihove genetičke osobine. Također treba provesti opsežnije istraživanje na znatno većem broju uzoraka tumorozno promijenjenih i patološki nepromijenjenih sjemenika.

Metoda protočne citometrije može pomoći u dijagnostici tumora sjemenika pasa, osobito ako je kombinirana s do sada uhodanim metodama

pretrage kao što su histopatološka analiza tumora sjemenika te ako se protokol njezina izvođenja standardizira i prilagodi analiziranom tkivu.

ZAHVALA

Zahvaljujemo Zavodu za patologiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za biologiju i Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za pomoć i osiguravanje resursa za izradu ovog rada. Ovaj je rad izrađen u svrhu izrade diplomskog rada Sanje Mihoković.

LITERATURA

- 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.].
- HOŠTETER M. (2012): Poredbena patologija tumora sjemenika psa i čovjeka u Republici Hrvatskoj, disertacija, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- HOŠTETER M., B. ARTUKOVIĆ, K. SEVERIN, A. GUDAN KURILJ, A. BECK, I.C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, Ž. GRABAREVIĆ (2014): Canine testicular tumors: two types of seminomas can be differentiated by immunohistochemistry, BMC Veterinary Research [Online], 10: 169.
- KENNEDY, P.C., J.M. CULLEN, J.F. EDWARDS, M.H. GOLDSCHMIDT, S. LARSEN (1998): Histo-

logical Classification of Tumors of the Genital System of Domestic Animals, 2nd Series, WHO, Armed Forces Institute of Pathology; Washington, D.C., str. 17-18.

- MCGAVIN M.D., J.F. ZACHARY (2006): Pathologic Basis of Veterinary Disease, 4th ed. 1036-1038.
- NORTH S., T. BANKS, R. STRAW (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.
- ORMEROD M.G. (2009): Flow cytometry: A basic Introduction [E-book], pristupljeno preko De Novo Software, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> [pristupljeno 10. kolovoza 2015.].
- REGGETI F., D. BIENZLE (2011): Flow Cytometry in Veterinary Oncology, Veterinary Pathology, 48, (1), 223-235.
- SAMARŽIJA D., N. ANTUNAC, T. POGAČIĆ, S. SIKORA (2004): Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku metodom protokne citometrije, Mljekarstvo, 54 (1), 39-51.
- ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN I.C., K. SEVERIN, M. HOŠTETER, B. ARTUKOVIĆ, A. BECK, A. GUDAN KURILJ, SABOČANEC R., DŽAJA P., Ž. GRABAREVIĆ (2013): Incidence and types of Canine tumors in Croatia, Veterinarski arhiv, 83 (1), 31-45.

SUMMER SCHOOL FOR STUDENTS – ZOONOSES

23rd – 30th April 2017, Dubrovnik - Croatia



Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb

VetNEST - Veterinary Network Of European Student & Staff Transfer

