

Usporedbena analiza tumora sjemenika psa i čovjeka u Republici Hrvatskoj

Marko Hohšteter¹, Branka Artuković¹, Marijana Ćorić², Krešimir Severin³, Andrea Gudan Kurilj¹, Ana Beck¹, Ivan-Conrado Šoštarić-Zuckermann¹, Željko Grabarević¹

¹ *Zavod za veterinarsku patologiju, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

² *Klinički bolnički centar Zagreb, Klinički zavod za patologiju i citologiju, Zagreb, Hrvatska*

³ *Zavod za sudsko i upravno veterinarstvo, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

Tumori sjemenika su jedni od najčešćih tumora muškaraca i pasa, a tumori zametnih stanica su česti i morfološki slični u obje vrste, ali su različitog biološkog ponašanja.

Materijal i metode: Analizirani su sjemenici obduciranih pasa i uzorci tumora dostavljenih nakon operacija koji su analizirani na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te biopsirani uzorci tumora sjemenika muškaraca sa Zavoda za patologiju KBC Zagreb.

Rezultati: Utvrđena je učestalost tumora testisa obduciranih pasa od 52% te incidencija tumora testisa u odnosu na ostale biopsirane tumore pasa od 7%. Prosječna dob obduciranih pasa s tumorima testisa bila je 10,16 te 10,24 godina za operirane pse. Prosječna dob muškaraca s tumorima testisa je bila 33,35 godina. U sjemenicima obduciranih pasa su najčešći bili tumori Leydigovih stanica, a u biopsiranim seminomi. Uz ove tumore u obje skupine najzastupljeniji su bili tumori Sertolijevih stanica te mješoviti tumori i GCNIS. GCNIS je kao dodatna promjena utvrđena u 25% tumoroznih testisa s obdukcije te u 19% biopsiranih testisa. Kod muškaraca su najčešći bili seminomi, embrionalni karcinomi, teratomi, GCNIS te mješoviti tumori zametnih stanica. GCNIS je kao dodatna promjena dijagnosticiran u 65 % tumoroznih sjemenika muškaraca. Imunohistokemijskom analizom utvrđena je korisnost c-KIT, PLAP, citokeratin AE1/AE3 i CD 30 u diferencijaciji tumora testisa pasa, a potvrđena je njihova svrhovitost za diferencijaciju tumora testisa muškaraca. Citokeratin je pokazao dobre rezultate u diferencijaciji stromalnih tumora od tumora zametnih stanica pasa. c-KIT i PLAP su pokazali veću ekspresiju u tumorima zametnih stanica, a PLAP je eksprimiran i u GCNIS. CD 30 je u tumorima pasa imao slabu ekspresiju.

Rasprava i zaključci: Obavljenom histopatološkom analizom i upotrebom PLAP biljega dokazano je postojanje GCNIS u testisima pasa. Ekspresija PLAP i c-KIT tumorskog biljega potvrdila je hipotezu da se seminomi pasa mogu kao i kod muškaraca svrstati u c-KIT pozitivne klasične te c-KIT negativne spermatocitične seminome, tj. spermatocitne tumore.

Ključne riječi: pas; čovjek; tumor; sjemenici; patologija; imunohistokemija

Adresa za dopisivanje: Marko Hohšteter
Zavod za veterinarsku patologiju,
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
10000 Zagreb
Heinzelova 55
e-pošta: marko.hohsteter@vef.hr

Uvod

Tumori sjemenika pripadaju među najčešće tumore u muškaraca i pasa. U muških pasa su tumori sjemenika treći po učestalosti, nakon tumora kože i vezivnog tkiva (1,2) te su najčešći tumori spolnog sustava s udjelom od oko 90%. Od domaćih životinja psi su vrsta koja najčešće obolijeva od ovih tumora (3, 4).

Tumori sjemenika muškaraca čine 1-2% svih tumora. U Hrvatskoj su tumori sjemenika među tri najčešća tumora u dobi od 10 do 19 godina, a najčešći su tumori u dobi od 20 do 29 godina (5). Njihova incidencija u svijetu kontinuirano raste, a u razdoblju od 1973. do 1995. godine se udvostručila (6).

Tumori sjemenika pasa, osobito tumori Sertolijevih stanica, javljaju se najčešće u starijih jedinki (7), a češći su u kriptorhida (8). Izlaganje okolišnim karcinogenima može dovesti do povećanja učestalosti ovih tumora što je dokazano kod vojnih pasa (9). Tumori testisa pasa javljaju se kao pojedinačni ili u oko 40% pasa kao multipli tumori (7). Najčešća su tri tipa tumora s otprilike istim udjelima: tumori Sertolijevih i tumori Leydigovih stanica koje ubrajamo u stromalne tumore te seminomi iz skupine tumora zametnih stanica. Iza njih slijede, iako su rjeđi, mješoviti tumori podrijetla zametnih i stromalnih stanica dok su ostali primarni te metastatski tumori izrazito rijetki (3,7,10). Većina primarnih tumora pasa je dobroćudna, no postoje iznimke od kojih se najčešće javljaju maligni tumori Sertolijevih stanica i seminomi. Dokaz maligniteta tumora je nalaz metastaza te se bez toga histološki ili citološki dijagnoza malignog tumora sjemenika ne može postaviti (10).

Tumori zametnih stanica su najčešći tumori sjemenika muškaraca s udjelom većim od 90%. Seminomi sunajčešći jednostavi oblici, a više od polovice tumora

ima više tipova stanica (5). Većinom su to agresivni tumori, dok je većina stromalnih tumora benigna (5). Kod muškaraca je, kao i u pasa, kriptorhizam povezan s većim rizikom za nastajanje tumora zametnih stanica (11). Istraživanja djelovanja egzogenih estrogenih i antiandrogenih tvari na embrio upućuju na njihov mogući učinak na razvoj tumora testisa (12). Za razliku od klasičnih seminoma, spermatocitni tumori (prije klasificirani kao spermatocitični seminomi) nisu povezani s neoplazmama zametnih stanica *in situ* (GCNIS) pa stoga vjerojatno nisu prenatalnog porijekla (11, 13). Genetski utjecaj na nastanak tumora zametnih stanica sjemenika muškaraca je povezan s promjenama na kromosomima 2p23, 3p12, 3q26, 12p13-q21, 18q21-q23 i Xq27, a najčešća aberacija kod invazivnih tumora je na 12p sekvenci (11).

Tumori zametnih stanica dijele se u muškaraca u seminomatozne i neseminomatozne. Seminomatozni tumori su sastavljeni od stanica koje podsjećaju na primitivne zametne stanice ili rane gonocite. Neseminomatozni tumori mogu biti sastavljeni od nediferenciranih stanica koje podsjećaju na embrionalne zametne stanice što je slučaj kod embrionalnih karcinoma. Maligne se stanice mogu diferencirati u razne stanične linije te mogu nastati tumori žumanjčane vrećice, koriokarcinomi i teratomi. Neseminomatozni tumori su biološki agresivniji i imaju lošiju prognozu od seminoma (6,11).

Seminomatizni tumori su najčešći tumori testisa muškaraca te se dijele u rijetke spermatocitne tumore koji se javljaju primarno u starijih osoba i seminome (prije klasificirani kao klasični seminomi) koji čine oko 50% svih tumora zametnih stanica i javljaju se najčešće u muškaraca u 30-tim godinama, a gotovo nikada u djece (6,11). Genetska karakteristika klasičnih seminoma je izokromosom 12p (6,11), a

histološki su građeni od uniformnih, okruglih stanica posloženih u "plahte" ili su podijeljene u klustere s nježnim fibrozim trabekulama u kojima je obično limfocitni infiltrat. Klasični seminomi imaju zloćudni karakter, dok spermatocitni tumori rastu sporo i ne stvaraju metastaze (11). Histološki se spermatocitni tumori sastoje od tri osnovna tipa stanica. Dominantni tip su okrugle stanice različite veličine, a jezgre su ovalne s finom distribucijom kromatina i filamentoznim ili spiralnim oblicima. Drugi tip su male stanice koje podsjećaju na sekundarne spermatocite, a treći tip su divovske stanice koje obično imaju jednu, a rjeđe više jezgri u kojima je kromatin često raspoređen u obliku niti ili spirala. Mitoze, uključujući atipične mitoze su česte, a ne nalaze se limfocitni agregati te se u okolnim tubulima ne nalaze GCNIS (11).

Većina zametnih testikularnih tumora nastaje od lezija koje se nazivaju GCNIS no smatra se da one nisu preteća tumora žumanjčane vrećice u djece, teratoma i spermatocitnih tumora odraslih (11, 14). Tumori zametnih stanica *in situ* (prije klasificirane kao neklasificirane intratubularne neoplazije zametnih stanica) su u osnovi vrsta *carcinoma in situ*, a ove se lezije kod muškaraca razvijaju još intrauterino te se smatra da miruju do puberteta kada mogu progredirati u seminome ili neseminomske tumore (6,11,13). Makroskopski nema lezija, a histopatološki se sastoje od malignih, primitivnih, atipičnih zametnih stanica koje su veće od normalnih spermatogonija, imaju obilnu citoplazmu bogatu glikogenom. Jezgra je velika, a mitoze nisu rijetke. Stanice su obično smještene bazalno između Sertolijevih stanica. Spermatogeneze obično nema, a tubuli su segmentalno no mogu biti i difuzno zahvaćeni (11).

U posljednje vrijeme objavljeno je nekoliko istraživanja vezanih uz klasifikaciju seminoma u pasa. Rezultati nekih istraživanja pokazuju da se

seminomi u pasa mogu kao i kod muškaraca klasificirati u dva tipa tj. klasične seminome i spermatocitne tumore (prije spermatocitične seminome) (15, 16), a neki autori navode da su u pasa dominantni spermatocitni tumori, a klasični seminomi su iznimno rijetki (17). Seminomi pasa najčešće pokazuju dobroćudno ponašanje, no postoji mali broj slučajeva s metastaziranjem (10). Osim razlike u klasifikaciji seminoma kod pasa i muškaraca postoje i nejasnoće vezane uz pojavu GCNIS u sjemenicima pasa pa pojedini autori ukazuju na postojanje istih u sjemenicima pasa (18,19). Kod ljudi su GCNIS te klasični seminomi, a prema pojedinim izvještajima i kod pasa primarno podrijetla gonocita (prespermatogonija) i spermatogonija koje eksprimiraju biljege zametnih stanica u koje pripadaju c-KIT i placenta alkalna fosfataza (PLAP). Spermatocitni tumori koji nastaju od diferenciranih stanica (spermatocita) samo fokalno eksprimiraju ili uopće ne eksprimiraju ove biljege, a oni nisu eksprimirani ni u neseminomatoznim tumorima zametnih stanica te tumorima Sertolijevih stanica (15,16,20). U svrhu dijagnostike i diferencijacije vrste i podrijetla tumora testisa u humanoj medicini se osim c-KIT i PLAP imunohistokemijskih biljega koriste i brojni drugi biljezi. Biljeg citokeratin AE1/AE3 se koristi za razlikovanje humanih tumora zametnih stanica tj. seminoma koji ne eksprimiraju ovaj biljeg od embrionalnih karcinoma, tumora Sertolijevih i Leydigovih stanica te žumanjčane vrećice, koji su pozitivni na citokeratin (11,21). U dijagnostici tumora sjemenika pasa ima vrlo malo podataka o imunoreaktivnosti citokeratina pa je opisana njegova ekspresija u mješovitim tumorima Leydigovih i Sertolijevih stanica te u karcinomima testisa, dok tumori Leydigovih stanica kao i tumori zametnih stanica nisu pokazivali imunoreaktivnost na citokeratinske biljege (22). CD 30 jestaničnimembranski proteinski receptor faktor tumorskene kroke koji je jako

ekspresiran u stanicama embrionalnih karcinoma testisa pa se u humanoj patologiji koristi kao biljeg za njihovo razlikovanje od drugih tumora zametnih stanica (23, 24). U veterinarskoj medicini je provedeno malo istraživanja koja pokazuju da su kao i u muškaraca embrionalni karcinomi pasa CD30 pozitivni, dok u seminomima nema ekspresije ovog biljega (20).

Predmetnim istraživanjem se htjela utvrditi zastupljenost tumora sjemenika kod psa i čovjeka u Republici Hrvatskoj te obaviti histopatološka analizu pomoću standardnog hematoksilin-eozin (HE) i kod pasa dodatnog PAS (*periodic acid Schiff*) bojenja, klasificirati tumore prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije utvrditi udio pojedinih tipova tumora. Imunohistokemijskom analizom pomoću tumorskih biljega (placentna alkalna fosfataza (PLAP), c-KIT, CD-30, citokeratin) je obavljena diferencijacija tumora zametnih stanica u odnosu na tumore sjemenog tračka. Utvrđivala se prisutnost GCNIS u tkivu testisa u kojima su uočeni tumori i u klinički nepromijenjenim testisima pasa te se nastojalo utvrditi valjanost hipoteze o diferencijaciji psećih seminoma na spermatocitične i nespermatocitične.

Materijal i metode

Uzorkovanje tumora

U istraživanju su korišteni arhivski uzorci tumora sjemenika pasa sa Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu dobivenih nakon operacije tumora (u razdoblju od 1. travnja 2007. do 31. siječnja 2011.) te uzorci tumora dobivenih nakon obdukcije pasa (u razdoblju od 1. listopada 2009. do 31. prosinca 2010.). Također su analizirani arhivski uzorci tumora sjemenika muškaraca sa Zavoda za patologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb dobivenih nakon operacije tumora (u razdoblju od 1. siječnja 2007. do 31. siječnja 2011.). Veličina uzorka

biopsiranih testisa muškaraca prilagođena je broju biopsiranih testisa pasa te je analiziran isti broj nasumično odabranih uzoraka testisa muškaraca. Određivana je sveukupna pojavnost tumora sjemenika pasa i muškaraca dijagnosticiranih u prikupljenim uzorcima u navedenim razdobljima.

Histopatološka analiza

U svrhu histopatološke analize svi uzorci tumora muškaraca, pasa i uzorci makroskopski nepromijenjenih testisa pasa fiksirani su 10%-tnim formalinom, uklopljeni u parafin, te su 5 µm debeli rezovi bojani HE metodom. Uzorci testisa pasa su bojani i klasičnom PAS metodom. Histopatološka klasifikacija tumora provedena je prema kriterijima histološke klasifikacije tumora sjemenika pasa i ljudi Svjetske zdravstvene organizacije 1999. g. (13,25). Makroskopski nepromijenjeni uzorci sjemenika pasa i dijelovi tkiva sjemenika u kojima se nalazio tumor su histološki pretraživani na prisutnost GCNIS ili prisutnost drugih neoplastičnih promjena. PAS metodom se radi bolje vizualizacije utvrđivalo postojanje PAS pozitivnih vakuola u tumorski promijenjenim te u nepromijenjenim sjemenicima pasa.

Imunohistokemijska analiza

Imunohistokemijski je analizirano osamdesetak uzoraka (parafinskih blokova) sjemenika pasa dobivenih nakon razudbe i pedesetak uzoraka sjemenika pasa dobivenih nakon operacije tumora sjemenika te pedesetak tumora sjemenika muškaraca. Analiza je obavljena na reprezentativnim uzorcima testisa kod kojih su utvrđeni tumori HE pretragom. Svi uzorci tumora sjemenika pasa i muškaraca kao i uzorci makroskopski nepromijenjenih sjemenika pasa u kojima je histopatološki HE ili PAS metodom bila utvrđena prisutnost ili sumnja na prisutnost GCNIS pretraživani su na postojanje tumorskih biljega.

Isto je tako kod HE nepromijenjenih testisa imunohistokemijska pretraga obavljena na po jednom uzorku testisa. U imunohistokemijsku analizu nisu bili uključeni uzorci od pasa kod kojih su HE pretragom utvrđene izrazito uznapredovale autolitične promjene. Prigodom imunohistokemijske analize korištena su slijedeća protutijela: PLAP (monoklonsko, miš, anti-human, klon 8A9; proizvođač Dako, M7191), c-KIT (poliklonsko, zec, anti-human; proizvođač Dako; A4502), CD 30 (monoklonsko, miš, anti-human, klon BER-H2³; proizvođač Dako, M0751) i citokeratin (monoklonsko, miš, anti-human, klon AE1/AE3; proizvođač Dako, M3515). Imunohistokemijsko bojenje je provedeno avidin-biotin kompleks metodom. Bojenje je provedeno na deparafiniziranim histološkim rezovima debljine 4 µm.

Imunohistokemijski preparati su pregledavani svjetlosnim mikroskopom pod povećanjima 4x i 10x kako bi se procijenio postotak pozitivnih tumorskih stanica (rasponu 0-100%) radi kvantificiranja reakcije. Distribucija obojenja (membransko, citoplazmatsko ili nuklearno) procjenjivana je na velikom povećanju (400x) svjetlosnog mikroskopa (26).

Statistička obrada rezultata

Dobiveni podatci su statistički obrađeni i utvrđena je razina značajnosti između pojedinih biljega i tipa tumora korištenjem uobičajenih statističkih parametrijskih i neparametrijskih metoda. Statistička analiza svih navedenih pokazatelja napravljena je korištenjem programa MedCalc[®] verzija 10.2.0.0 (*Med Calc Software bvba, Mariakerke, Belgium*). Osnovna statistička analiza promatranih rezultata provedena je uobičajenim metodama opisne statistike. Provjera normalnosti raspodjele podataka unutar istraživanih skupina, za svaki pojedini pokazatelj (dijagnoza tumora), utvrđena je Kolmogorov–Smirnovljevim testom (kvantifikacija diskrepance distribucije

izmjenjenih vrijednosti i Gaussove distribucije). Značajnost razlika između podataka unutar istraživanih skupina koje su slijedile normalnu distribuciju određene su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA), a za skupine koje nisu slijedile normalnu raspodjelu korišten je Kruskal–Wallisov test. Statističke hipoteze su testirane na razini signifikantnosti od $p=0,05$, odnosno razlika među uzorcima smatrana je značajnom ako je $p < 0,05$.

Rezultati

Radi lakšeg praćenja, rezultati su podijeljeni na dio koji se odnosi na histopatološku analizu i na rezultate imunohistokemijske analize te su odvojeno prikazani rezultati za pse i muškarce. Dio rezultata koji se odnosi na pse prikazan je u radu Hohštetera i sur. (27).

Histopatološka analiza

Sjemenici obduciranih pasa

Od ukupno 85 obduciranih pasa kod kojih je rađena patohistološka pretraga testisa kod 44 (52%) psa utvrđeni su tumori testisa od čega u 12 pasa (14%) u oba testisa, s time da su u 28 (41%) makroskopski utvrđeni tumori, a u 6 (11%) su histološki utvrđeni samostalni GCNIS. Pri tome je bilo 56 (33%) neoplastično promijenjenih testisa od ukupno 170 testisa. Dob obduciranih pasa bila je u rasponu od 1 do 18 godina s time da za jednog psa (1%) nisu bili dostavljeni podatci o dobi. Prosječna dob svih obduciranih pasa je bila 8,29 godina, dok je prosječna dob pasa s tumorima sjemenika bila 10,16 godina, a prosječna dob obduciranih pasa koji nisu imali tumore testisa bila je 6,46 godina. Od svih obduciranih životinja samo je jedna bila kriptorhid (desni, abdominalni) i kod te životinje nisu ustanovljene nikakve neoplastične promjene. Udio pojedinih tipova tumora sjemenika i prosječna dob pasa prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Udio pojedinih histoloških tipova tumora kod obduciranih i operiranih (biopsije) pasa i prosječna dob pasa

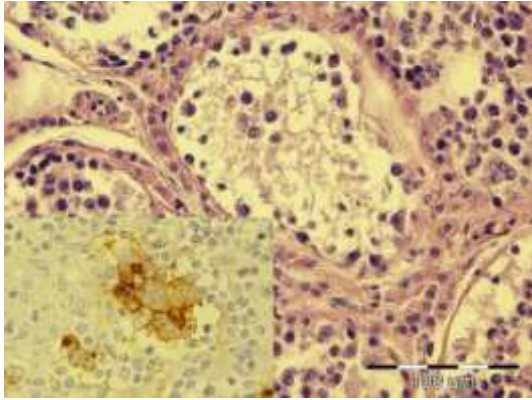
Histološki tip tumora	Postotak		Postotak GCNIS od tipa tumora		Prosječna dob psa (u godinama)	
	Obducirani	Biopsirani	Obducirani	Biopsirani	Obducirani	Biopsirani
Jednostavni tumori (ukupno)	77	84	26	17	10,12	10,06
LCT	34	9	37	60	11,95	11,25
SCT	13	28	29	0	10,29	9,50
IT SEM	13	4	29	0	5,71	10,00
DIF SEM	7	35	0	20	9,00	10,34
GCNIS	11	4	/	/	10,00	11,00
PNST	0	4	0	0	/	9,00
Teratom	0	2	0	100	/	8,00
Mješoviti tumori (ukupno)	21	16	25	33	11,25	10,36
LCT/SCT	9	2	40	0	12,00	9,00
LCT/ IT SEM	5	2	33	100	11,80	10,40
LCT/DIF SEM	4	5	0	33		
SCT/DIF SEM	4	7	0	25	8,00	10,67
Metastatski tumori (ukupno)	2	/	0	/	/	/
Metastaza limfoma	2	/	0	/	5,00	/
Ukupno	100	100	7	19	10,16	10,24

LCT, tumor Leydigovih stanica; SCT, tumor Sertolijevih stanica; IT SEM, intratubularni seminom; DIF SEM, difuzni seminom; GCNIS, tumor zametnih stanica *in situ*; PNST, tumor ovojnice perfernih živaca

Od svih obduciranih životinja samo je jedna bila kriptorhid (desni, abdominalni) i kod te životinje nisu ustanovljene nikakve neoplastične promjene. Udio pojedinih tipova tumora sjemenika i prosječna dob pasa su prikazani u tablici 1.

Kod dva psa je utvrđeno metastaziranje tumora sjemenika i to seminoma u epididimis i tumora Sertolijevih stanica po peritoneum i bubreg.

U 10 testisa od 9 obduciranih pasa utvrđene su PAS pozitivne stanice koje morfološki odgovaraju GCNIS (sl. 1), dok su kod 9 testisa od 9 pasa utvrđene PAS pozitivne stanice koje su ocjenjene kao GCNIS suspektne. Prosječna dob pasa koji su bili PAS i GCNIS pozitivni je bila 10,35 godina, dok je kod suspektnih testisa prosječna dob bila 13,89 godina.



Sl. 1. Pas, sjemenik, GCNIS, intratubularne, velike, vakuolizirane tumorske stanice, HE, x400. Umetak: GCNIS, imunohistokemijski PLAP pozitivne stanice, x400.

Biopsirani sjemenici pasa

Ukupno je od 52 psa koji su operirani dostavljeno 59 testisa, a kod 51 (98%) psa su utvrđeni tumori testisa, s time da su kod 6 pasa (12%) tumori utvrđeni u oba testisa te je ukupno bilo 57 (97%) neoplastično promijenjenih testisa. Pritom su u 55 (93%) testisa makroskopski bile vidljive tumorske promjene, a u 2 (4%) testisa su utvrđeni samostalni GCNIS. U istraživanom razdoblju ukupna pojavnost svih tumora u muških pasa bila je u 717 slučajeva pa je tako udio tumora sjemenika u ukupnom broju tumora bio 7 %. Ukupno je 5 (10%) biopsiranih testisa bilo kriptorhidnih i to 4 desna i jedan lijevi. Od ovih testisa u 3 su dijagnosticirani difuzni seminomi, dok su u 2 dijagnosticirani tumori Sertolijevih stanica. Prosječna dob pasa s kriptorhidnim testisima bila je 9,00 godina. Ukupno analizirani psi bili su u dobi od 1 do 15 godina s time da za jednog psa (2 %) nisu bili dostavljeni podatci o dobi. Prosječna dob svih pasa od kojih su bili dostavljeni testisi je bila 10,06 godina, dok je prosječna dob pasa s tumorima sjemenika bila 10,24 godina, dok je pas kod kojega nisu utvrđene neoplazme u dostavljenim testisima imao 1 godinu.

U 6 biopsiranih testisa od 6 pasa utvrđene su PAS pozitivne stanice koje morfološki odgovaraju GCNIS, dok su kod 9 testisa od 9 pasa utvrđene PAS pozitivne stanice koje

su ocjenjene kao GCNIS suspektne. Prosječna dob pasa koji su bili PAS i GCNIS pozitivni je bila 11,5 godina, dok je kod suspektnih testisa prosječna dob bila 9,38 godina.

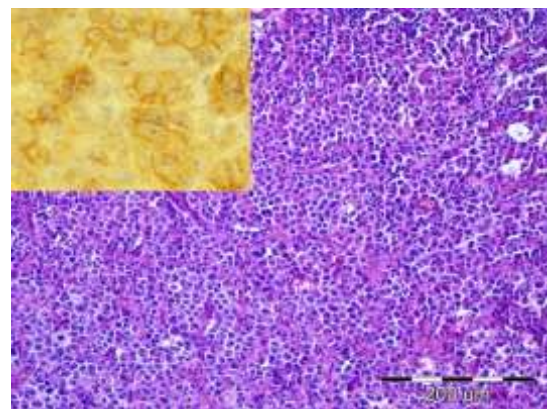
Sjemenici muškaraca

Ukupno su od 51 muškarca analizirani uzorci od po jednog testisa za histološku pretragu. U svim uzorcima utvrđeni su tumori testisa. Muškarci kod kojih su utvrđeni tumori sjemenika bili su u dobi od 15 do 64 godine, a prosječna dob im je bila 33,35 godina. Udio pojedinih tipova tumora i prosječna dob muškaraca s dijagnosticiranim tumorima prikazana je u tablici 2. Uz ove tumore su još dodatno, u 33 testisa (65%), utvrđene i GCNIS. Pri tome su GCNIS utvrđene u 15 (68 %) mješovitih tumora zametnih stanica, 15 (71%) seminoma i u 3 (60%) embrionalna karcinoma dok kod teratoma u tkivu testisa nisu utvrđene GCNIS.

Imunohistokemijska analiza

Sjemenici pasa

U obje skupine tumora pasa ekspresija c-KIT i PLAP biljega očitovale se bojenjem citoplazmi i staničnih membrana zametnih tumorskih stanica (sl. 2), a PLAP je ekspresiran i u GCNIS (sl. 3) te je intenzitet bojenja uglavnom bio umjeren s time da je u biopsiranim tumorima c-KIT ekspresiran umjereno do slabije (tablica 3).



Sl. 2. Pas, sjemenik, difuzni seminom, HE, x 200. Umetak: seminom, imunohistokemijski c-KIT pozitivne stanice, x 400.

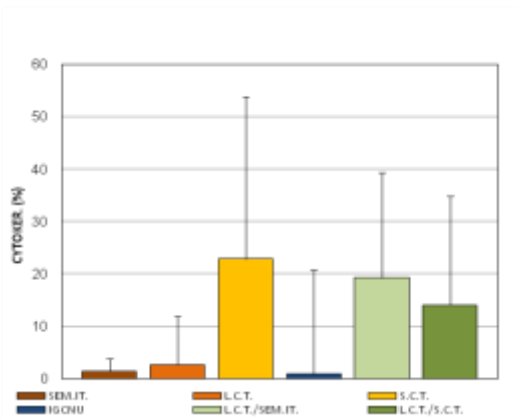
U skupini obduciranih pasa udio c-KIT pozitivnih stanica iznosio je do 90 % u difuznim te 5-20% u intratubularnim seminomima, GCNIS i mješovitim tumorima. U biopsiranim uzorcima je c-KIT eksprimiran u do 43% stanica difuznih seminoma, do 26% u mješovitim seminomima, 20% teratomima i do 5% u tumorima Sertolijevih stanica. PLAP je eksprimiran uglavnom u oko 5% stanica

intratubularnih seminoma i GCNIS, te 5-10% u mješovitim i difuznim seminoma. Ekspresija citokeratina AE1/AE3 se u obje skupine tumora očitovala bojenjem citoplazmi neoplastičnih epitelnih stanica, a intenzitet bojenja uglavnom je bio slabiji do umjeren, dok su neoplastične germinativne stanice bile negativne (tablica 3).

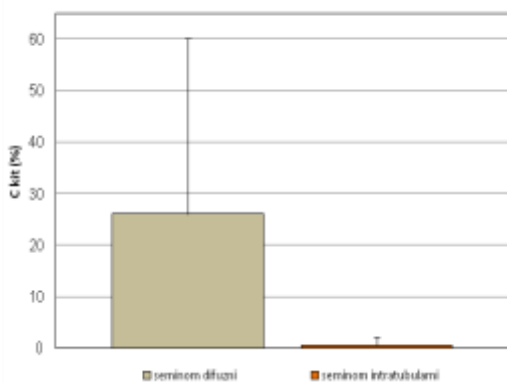
Tablica 2. Udio pojedinih histoloških tipova tumora i prosječna dob muškaraca

Histološki tip tumora	Udio (%)	Broj tumora s GCNIS	Prosječna dob (u godinama)
Jednostavni tumori (ukupno)	57	18	37,84
SEM	41	15	39,60
EMB CA	10	3	25,60
TER	4	0	27,50
GCNIS (samostalan)	2	0	33,00
Mješoviti tumori (ukupno)	43	15	30,19
EMB CA/teratom	10	3	29,83
EMB CA/SEM	8	3	28,50
SEM/teratom	4	2	41,00
TER/TŽV	2	1	-
Teratom/EMB CA/ TŽV	2	1	29,00
Teratom/EMB CA/SEM /TŽV	2	0	26,00
SEM/KOR CA	2	0	33,00
Teratom/EMB CA/KOR CA	4	2	26,00
EMB CA/KOR CA	2	1	29,00
EMB CA/KOR CA/SEM	2	0	28,00
TŽV/SEM	2	1	40,00
EMB CA/teratom/SEM	2	1	27,00
Teratom/EMB CA/KOR CA/TŽV	2	0	26,00
Ukupno	100,00	33	33,35

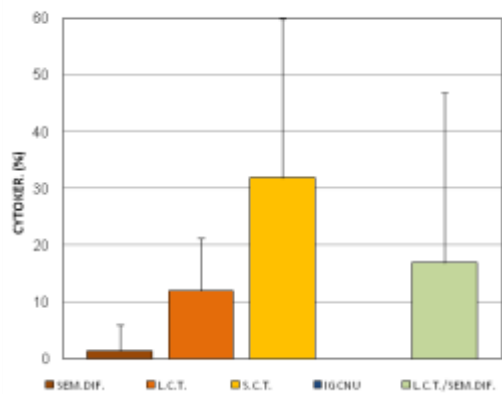
SEM, seminom; EMB CA, embrionalni karcinom; TER, teratom; GCNIS, tumor zametnih stanica *in situ*; TŽV, tumor žumanjčane vrećice; KOR CA, koriokarcinom



Sl. 3. Ekspresija citokeratina AE1/AE3 u odnosu na histološki tip tumora kod obduciranih pasa.



Sl. 4. Ekspresija c-KIT kod intratubularnih i difuznih seminoma iz skupina testisa obduciranih i biopsiranih testisa pasa



Sl. 5. Ekspresija citokeratina AE1/AE3 u odnosu na histološki tip tumora kod biopsiranih tumora testisa pasa

Udio pozitivnih stanica je u obje skupine bio 5–12% u tumorima zametnih stanica, a u stromalnim tumorima bio je najviši u tumorima Sertolijevih stanica i njihovim mješovitim oblicima (40-65%). Nešto je niži postotak bio kod tumora Leydigovih stanica (16-60%) te teratoma (do 50%).

U obje se skupine tumora ekspresija CD 30 očitovala bojenjem citoplazmi i staničnih membrana neoplastičnih stanica epitelnog porijekla, a intenzitet bojenja je uglavnom bio slabiji do umjeren, dok su neoplastične stanice germinativnog podrijetla bile negativne (tablica 3). CD 30 je eksprimiran samo u manjem broju stanica (manje od 1%).

Statistički nije utvrđena značajnost u ekspresiji c-KIT, PLAP i CD30 biljega u odnosu na histološki tip tumora iz obje skupine pasa. Osim između pojedinih tipova tumora testisa kod obduciranih pasa te biopsiranih testisa obavljena je analiza ekspresije c-KIT između intratubularnih i difuznih seminoma iz obje skupine. Utvrđena je statistički značajna razlika, u ekspresiji c-KIT. Tako je kod difuznih seminoma prosječni broj pozitivnih stanica bio 26% u odnosu na intratubularne seminome gdje je bio 0,56 % (sl. 4).

Statistički je značajno, na razini $p=0,05$, promijenjena ekspresija citokeratina u odnosu na histološki tip tumora u obduciranih pasa i to između tumora Sertolijevih stanica i intratubularnih seminoma, tumora Sertolijevih stanica i tumora Leydigovih stanica te tumora Leydigovih stanica i mješovitih tumora Leydigovih stanica i intratubularnih seminoma (sl. 3), a biopsiranim tumorima između difuznih seminoma i tumora Sertolijevih stanica (sl. 5).

Tablica 3. Ekspresija imunohistokemijskih biljega u biopsiranim tumorima sjemenika i sjemenicima obduciranih pasa u odnosu na histološki tip tumora

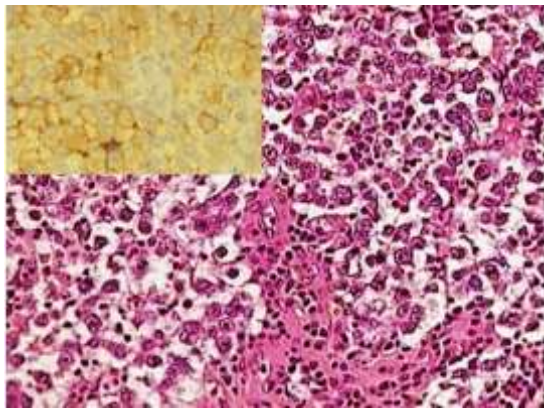
Histološki tip tumora	c-KIT pozitivni tumori (%)		PLAP pozitivni tumori (%)		Citokeratin pozitivni tumori (%)		CD 30 pozitivni tumori (%)	
	Biopsirani	Obducirani	Biopsirani	Obducirani	Biopsirani	Obducirani	Biopsirani	Obducirani
Jednostavni tumori (Σ)	11	22	23	27	27	33	7	8
Mješoviti tumori (Σ)	33	44	25	22	66	44	8	11
LCT	5	0	21	16	15	20	5	6
LCT/SCT	20	0	40	0	60	100	20	0
LCT/ IT SEM	33	100	0	100	60	100	0	0
LCT/ DIF SEM	50	75	0	0	40	0	0	0
SCT	0	6	28	31	71	62	14	12
SCT/LCT	20	0	40	0	60	100	20	0
SCT/ DIF SEM	50	0	50	25	100	50	0	25
IT SEM	14	0	14	33	28	33	0	0
IT SEM/LCT	33	100	0	100	60	100	0	0
DIF SEM	50	45	25	15	25	10	25	0
DIF SEM/SCT	50	0	50	25	100	50	0	25
DIF SEM/ LCT	50	75	0	0	40	0	0	0
PNST	0	0	0	0	0	0	0	0
Teratom	0	0	0	0	0	100	0	100
GCNIS	16	0	33	100	16	0	0	0
Metastski limfom	0	0	0	0	0	0	0	0
Ukupno	16	26	23	26	35	29	7	8

LCT, tumor Leydigovih stanica; SCT, tumor Sertolijevih stanica; IT SEM, intratubularni seminom; DIF SEM, difuzni seminom; GCNIS, tumor zametnih stanica *in situ*; PNST, tumor ovojnica perfernih živaca; Σ, ukupno

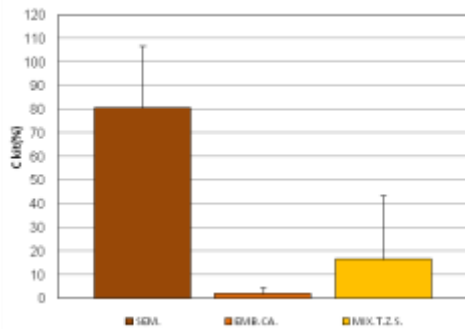
Pozitivna imunohistokemijska reakcija na c-KIT i PLAP se očitovala bojenjem citoplazmi i staničnih membrana zametnih stanica tj. spermatogonija u tumorozno

promijenjenih testisa muškaraca (sl. 6), a intenzitet bojenja bio je uglavnom umjeren, dok je za c-KIT bio umjeren do jači. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na citokeratin AE1/AE3 se

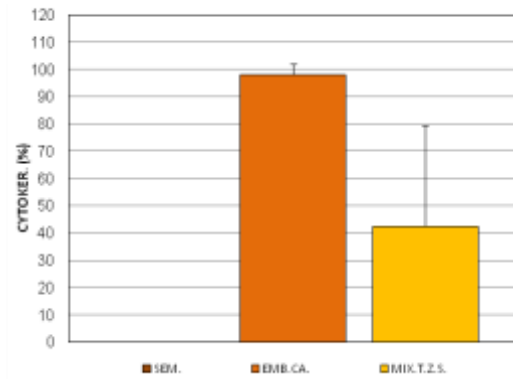
očitovala bojenjem citoplazmi neoplastičnih stanica epitelnog podrijetla, a intenzitet bojenja uglavnom je umjeren do jači, dok su neoplastične stanice germinativnog porijekla bile negativne. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na CD 30 očitovale se bojenjem citoplazmi i staničnih membrana neoplastičnih stanica epitelnog porijekla, ponajprije embrionalnih karcinoma, a intenzitet bojenja bio je uglavnom umjeren do jači, dok su neoplastične stanice germinativnog podrijetla bile negativne (tablica 4).



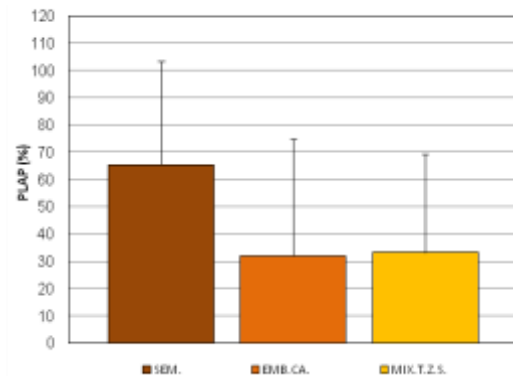
Sl. 6. Muškarac, sjemenik, seminom, HE, x400. Umetak: seminom, imunohistokemijski c-KIT pozitivne stanice, x 400.



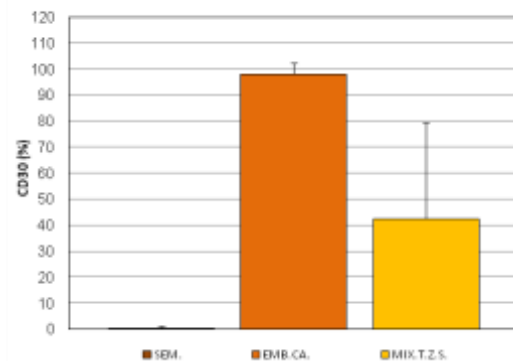
Sl. 7. Ekspresija c-KIT u odnosu na histološki tip tumora kod tumora testisa muškaraca.



Sl. 8. Ekspresija citokeratina AE1/AE3 u odnosu na histološki tip tumora kod tumora testisa muškaraca.



Sl. 9. Ekspresija PLAP u odnosu na histološki tip tumora kod tumora testisa muškaraca.



Sl. 10. Ekspresija CD 30 u odnosu na histološki tip tumora kod tumora testisa muškaraca

Tablica 4. Ekspresija imunohistokemijskih biljega u tumorima sjemenika muškaraca u odnosu na histološki tip tumora.

Histološki tip tumorA	Testisi muškaraca			
	c-KIT pozitivni tumori (%)	PLAP pozitivni tumori (%)	Citokeratin pozitivni tumori (%)	CD 30 pozitivni tumori (%)
Jednostavni tumori (Σ)	86	93	17	38
Mješoviti tumori (Σ)	82	95	77	95
SEM	100	100	0	5
EMB CA	40	80	100	100
TER	50	50	0	100
GCNIS	100	100	0	0
EMB CA/TE.	80	100	100	100
EMB CA/SEM	100	100	100	100
SEM/TE.	100	100	0	100
TER/TŽV	0	100	100	100
TER/EMBCA/TŽV	0	100	0	100
TER/EMBCA/SEM/ TŽV	100	100	100	100
SEM/KOR CA	100	100	100	0
TER/EMBCA/KOR CA	50	100	50	100
EMB CA/KOR CA	100	100	100	100
EMB CA/KOR CA/SEM	100	100	100	100
TŽV/SEM	100	100	0	100
EMB CA/TER/SEM	100	100	100	100
TER/EMBCA KOR CA/TŽV	100	0	100	100
Ukupno	84	94	43	57

SEM, seminom; EMB CA, embrionalni karcinom; TER, teratom; GCNIS, tumor zametnih stanica *in situ*; TŽV, tumor žumanjčane vrećice; KOR CA, koriokarcinom; Σ, ukupno

Statistički je značajno, na razini od $p=0,05$, promijenjena ekspresija c-KIT u odnosu na histološki tip tumora i to između seminoma i embrionalnih karcinoma, te seminoma i mješovitih tumora zametnih stanica (sl. 7), dok za samostalne GCNIS i teratome nije

utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji ovog protutijela. Statistički je značajno, na razini od $p=0,05$, promijenjena ekspresija PLAP u odnosu na histološki tip tumora i to između seminoma i mješovitih tumora zametnih stanica, dok

između drugih tipova tumora nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji ovog protutijela (sl. 9). Statistički je značajno, na razini od $p=0,05$, promijenjena ekspresija citokeratina i CD30 u odnosu na histološki tip tumora i to između seminoma i embrionalnih karcinoma, te seminoma i mješovitih tumora zametnih stanica (sl. 8 i 10), dok za samostalne GCNIS i teratome nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji ovog protutijela.

Rasprava

S obzirom na dosad poznate podatke naši rezultati pokazuju veću incidenciju tumora testisa u obduciranih pasa u Republici Hrvatskoj što je vjerojatno posljedica više životne dobi obduciranih pasa, a vjerojatno djelomično posljedica povećanja incidencije tumora testisa kako u pasa tako i u muškaraca od sredine 20.-tog stoljeća te razlika u geografskoj distribuciji pasa s tumorima sjemenika (1,2,6,28,29). Razlog za visoku incidenciju tumora testisa u našem istraživanju može se tražiti i u činjenici da prigodom utvrđivanja incidencije dosadašnja istraživanja nisu u tumore testisa ubrajala GCNIS, dok su u našem slučaju uključeni i GCNIS. Utvrđena incidencija multiplih tumora u testisima te učestalost tumora u testisima dostavljenih s operacija u odnosu na druge tumore muških pasa podudara se s podacima iz literature, a podudaraju se i rezultati vezani za dob životinja s dijagnosticiranim tumorima sjemenika (10,16 godina obducirani psi; 10,24 godina operirani psi) (7, 29). Kod svih analiziranih uzoraka testisa muškaraca utvrđene su tumorske promjene, a prosječna dob im je bila 33,35 godina. Ovi podaci se podudaraju s podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (5) te podacima iz drugih istraživanja prema kojima su tumori sjemenika među tri najčešća tumora muškaraca u dobi do 19 godina, najčešći tumori od 20 do 29 godina starosti te čine

oko 20% svih tumora muškaraca u dobi od 20 do 39 godina (5).

I u našem istraživanju potvrđeno je da je prosječna dob kriptorhidas tumorima sjemenika bila niža (9,00 godina) u odnosu na prosječnu dob svih pasa s tumorima sjemenika (10,24 godine) što pokazuje da je kriptorhizam važan predisponirajući čimbenik za razvoj seminoma i tumora Sertolijevih stanica koji se kod kriptorhidnih pasa javljaju u ranijoj životnoj dobi (8).

Rezultati histopatološke analize tumora testisa obduciranih pasa pokazali su da je 77% bilo jednostavnih tumora i to 34% tumora Leydigovih stanica, 20% bilo je seminoma i to 13 % intratubularnih i 7% difuznih, 13 % tumora Sertolijevih stanica, te 11% GCNIS. Mješovitih tumora bilo je 21%. Samo je u jednom testisu utvrđen tumor koji nije bio primaran već se radilo o metastazi limfoma. Ovakvi rezultati se gotovo u potpunosti podudaraju s literaturnim podacima (3, 10, 18) osim što u dosadašnjim istraživanjima nisu analizirani GCNIS pa ni podaci o njihovoj incidenciji nisu uvršteni u dosadašnje analize incidencije tumora sjemenika pasa.

Iako do sada postoji malo istraživanja o GCNIS kod pasa (30, 31) te nisu poznati podaci o incidenciji GCNIS kod pasa dostavljenih na obdukciju već je rađena analiza učestalosti GCNIS u biopsiranim testisima (31) naši podaci prema kojima je u 12% analiziranih testisa utvrđena prisutnost GCNIS bilo kao samostalne neoplastične promjene ili kao dodatne promjene u neoplastičnom testisu pokazuju da kod pasa kao i kod muškaraca, GCNIS je česta neoplastična promjena u testisima te vjerojatno ima ulogu u razvoju invazivnih tumora testisa.

Samo je kod dva psa utvrđeno metastaziranje tumora sjemenika što se podudara s literaturnim podacima o malom broju zloćudnih u odnosu na ukupan broj tumora testisa kod pasa (10).

Od uzoraka testisa pasa koji su dostavljeni s operacijom 84% bilo je jednostavnih tumora i to seminoma 39% (35% difuznih; 4% intratubularnih), tumora Sertolijevih stanica 28%, a tumora Leydigovih stanica 9% te GCNIS u 4% slučajeva, a teratom je dijagnosticiran kod jednog psa kao i tumor ovojnice perifernih živaca (PNST). Mješovitih tumora bilo je 16%. Rezultati histopatološke analize tumora biopsiranih sjemenika donekle se razlikuju od rezultata dosadašnjih istraživanja i naše analize tumora testisa obduciranih pasa (3, 10, 18, 32). Naši podaci pokazuju da se tumori Leydigovih stanica javljaju najčešće ilis otprilike istom učestalošću kao seminomi i tumori Sertolijevih stanica u pasa. Znatno niža incidencija tumora Leydigovih stanica u odnosu na ostale tumore u testisa dostavljenih s operacije najvjerojatnije je posljedica toga što se tumori Leydigovih stanica javljaju u obliku znatno manjih proliferacija nego seminomi i tumori Sertolijevih stanica (10). Zato je i klinički puno teže ustanoviti ove promjene. Posljedično tome te se testise mnogo rjeđe operira i dijagnosticira u biopsiranih testisa. Isti je razlog vjerojatno uzrok tome da su kod biopsiranih testisa znatno rjeđe ustanovljeni intratubularni seminomi u odnosu na difuzne, jer i oni barem u svojoj početnoj fazi ne uzrokuju značajnije kliničke promjene tj. povećanje testisa.

Utvrđena incidencija GCNIS kao samostalnog tumora u biopsiranim testisima od 4% je očekivana, jer psi s takvim tumorima obično ne pokazuju kliničke znakove pa se njihovi testisi vrlo rijetko biopsiraju, što odgovara istraživanju Grieco i sur. (29). Visoka incidencija GCNIS u seminomatozno promijenjenim testisima najvjerojatnije je potvrda da se kao i kod muškaraca neki seminomi mogu razviti od prekursorskih promjena, tj. od GCNIS (11, 30).

Rezultati histološke klasifikacije tumora sjemenika muškaraca pokazuju da je od analiziranih tumora 57% bilo jednostavnih tumora i to seminoma 41%, 10%

embrionalnih karcinoma te 4% teratoma i jedan (2%) samostalan GCNIS. Mješovitih tumora je bilo 43% od toga su svi bili mješoviti tumori zametnih stanica. Iako je u ovom istraživanju analiziran relativno mali uzorak tumora sjemenika muškaraca koji su nasumice odabrani iz arhive KBC Zagreb te vjerojatno nije u potpunosti reprezentativan u odnosu na cjelokupnu populaciju muškaraca s testikularnim neoplazamama, vidljivo je da rezultati našeg istraživanja gotovo u potpunosti odgovaraju onima iz literature. Tako su svi analizirani tumori bili podrijetla zametnih stanica što odgovara literaturnim podacima prema kojima je više od 90% svih primarnih tumora sjemenika muškaraca porijekla zametnih stanica (33). Također se visoki udio mješovitih tumora zametnih stanica (43%) iz našeg istraživanja slaže s podacima dosadašnjih istraživanja prema kojima su oni vrlo česti pa njihova incidencija može biti od 32% do 54% svih tumora zametnih stanica (33, 34). Udio i učestalost pojedinih tumora u mješovitim tumorima zametnih stanica analiziranih u našem radu podudara se s literaturnim podacima što vrijedi i za učestalost seminoma, embrionalnih karcinoma i teratoma (11). Ustanovljena visoka incidencija GCNIS (65%) u tumorski promijenjenim sjemenicima muškaraca podudara se s istraživanjem koje su proveli Giwerzman i sur. (35) gdje je učestalost GCNIS u testisima muškaraca s tumorima zametnih stanica iznosila od 63% do 99%.

Sumirajući rezultate imunohistokemijske analize navedenih tumorskih biljega može se vidjeti da je njihova upotreba korisna u svrhu točnije diferencijacije tumora testisa pasa što potvrđuje dosadašnja istraživanja tumora testisa pasa, a također potvrđuje i literaturne podatke prema kojima su ovi biljezi među najvažnijima u dijagnostici tumora testisa muškaraca (11,15,20,34-37).

Rezultati analize ekspresije c-KIT u testisima pasa su pokazali da postoje razlike u ekspresiji ovog biljega unutar

skupine seminoma što ide u prilog hipotezi koja se u zadnje vrijeme pojavljuje u znanstvenoj literaturi, da u pasa kao i kod muškaraca postoje klasični seminomi i spermatocitični seminomi, tj. spermatocitni tumori (15,18,38). Rezultati analize c-KIT ekspresije kod muškaraca su potvrdili literaturne podatke o dominaciji tzv. klasičnih seminoma u odnosu na spermatocitne tumore (11).

Analiza ekspresije PLAP je kod pasa potvrdila hipotezu Grieco i sur. (31) da kod pasa kao i kod muškaraca u tumorima testisa te u testisima koji nemaju invazivne oblike tumora postoje stanice koje odgovaraju GCNIS te eksprimiraju PLAP i time opovrgla istraživanje koje su 1994. god. proveli Looijenga i sur. (30). Također je pokazala da i pojedini seminomi pokazuju njegovu ekspresiju što također potvrđuje teoriju o dva tipa seminoma u pasa (15,18,37) za razliku od rezultata Looijenga i sur.(30) koji su utvrdili samo jedan tip seminoma koji bi odgovarao humanim spermatocitnim tumorima. Rezultati analize ekspresije PLAP kod muškaraca se u potpunosti podudaraju s literaturnim podacima (11,24) te su potvrdili opravdanost korištenja PLAP u svrhu dijagnostike GCNIS te diferencijacije seminoma od ostalih tumora zametnih stanica testisa.

Što se tiče analize ekspresije citokeratina AE1/AE3 u tumorima testisa pasa potvrđena su dosadašnja istraživanja prema kojima je ovaj biljeg koristan za razlikovanje u prvom redu tumora Sertolijevih stanica testisa od tumora zametnih stanica te njihovih mješovitih oblika (21,37,38). Također su i kod muškaraca potvrđeni literaturni navodi prema kojima se ovaj biljeg može koristiti za diferencijaciju seminoma od embrionalnih karcinoma i tumora žumanjčane vrećice tj. za razlikovanje pojedinih komponenti u mješovitim tumorima (11).

Analizirajući rezultate ekspresije CD 30 u testisima pasa vidljivo je da su njome

potvrđeni rezultati histopatološke analize u kojoj nisu utvrđeni embrionalni karcinomi u testisima pasa što odgovara i podacima o njihovoj niskoj incidenciji u pasa (10) dok je naprotiv kod humanih tumora CD 30 pokazao visoku važnost u diferencijaciji vrlo učestalih embrionalnih karcinoma i njegovih komponenti u mješovitim tumorima zametnih stanica (11,20,24,32, 39).

Zaključci

Nakon provedene analize može se zaključiti da su incidencija i udio pojedinih histoloških tipova tumora sjemenika u muškaraca i pasa približno jednaka onoj iz literaturnih podataka. Utvrđeno je da analizirani tumorski biljezi mogu poslužiti za diferencijaciju tumora testisa pasa, a također je potvrđena njihova svrhovitost pri diferencijaciji tumora testisa muškaraca. Osobito se dobrim kod pasa pokazao citokeratin AE1/AE3 koji pokazuje dobre rezultate u diferencijaciji stromalnih tumora testisa, posebice tumora Sertolijevih stanica, od tumora zametnih stanica. c-KIT i PLAP pokazali su veću ekspresiju u tumorima zametnih stanica, a PLAP je pokazao dobru ekspresiju u GCNIS. CD 30 je u tumorima testisa pasa pokazao slabu ekspresiju što je očekivani rezultat s obzirom na to da je njegova ekspresija izražena u embrionalnih karcinoma koji nisu dijagnosticirani ni u jednoj skupini pasa. Obavljenom histopatološkom analizom i na temelju ekspresije tumorskog biljega c-KIT utvrđeno je da se seminomi pasa mogu kao i kod muškaraca svrstati u dvije skupine: c-KIT pozitivne klasične seminome te c-KIT negativne spermatocitične seminome.

Literatura

1. Dobson, JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract* 2002; 43: 240-6.
2. Reif JS. The Epidemiology and Incidence of Cancer. U: Withrow SJ, Vai DM, ur. Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 4th ed. , St. Louis: Saunders, 1996, 68-76.
3. Nødtvedt A, Gamlem H, Gunnes G, Grotmol T, Inderbø A, Moe L. Breed differences in the proportional morbidity of testicular tumours and distribution of histopathologic types in a population-based canine cancer registry. *Vet Comp Oncol* 2011; 9: 45-54.
4. North S, Banks T, Straw R. Tumors of the urogenital tract. U: North S, Banks T, Straw R, urednici. *Small Animal Oncology, an introduction*. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto: Elsevier Saunders, 2009, 151-72.
5. Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Incidencija raka u Hrvatskoj - Bilten br. 22. (1997). <http://www.hzjz.hr/rak/bilten97.htm> Pristup [5.12.2009.].
6. Wilson SS. Genitourinary malignancies. *Update Cancer Ther* 2006; 1, 443-66.
7. Fan TM, De Lorimer LP. Tumors of the male reproductive system. U: Withrow SJ, Vail DM, ur.). *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4th ed. St. Louis: Saunders. 2007., 799-804.
8. Withrow SI, Reeves N. Tumors of the Male Reproductive Tract. Withrow SJ, MacEwen EG, ur. *Withrow and MacEwen's Small Animal Oncology* 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders, 1996, 373-9.
9. Hayes HM, Tarone RE, Casey HW. A cohort study of the effects of Vietnam service on testicular pathology of US military working dogs. *Mil Med* 1995; 160: 248-55.
10. Foster RA, Ladds PW. Male genital system. U: Grant Maxie M, ur. Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of Domestic Animals. 5th ed. Vol. 3. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2007, 565-619.
11. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics. Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon, France, IARC Press, 200:
12. Strohsnitter WC, Noller KL, Hoover RN i sur. Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *J Natl Cancer Inst* 2001; 4: 545-51.
13. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA i sur. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 2016; 70: 93-105.
14. Del Vecchio MT, Epistolato MC, Tripodi SA, Montironi R, Giordano A. Intratubular germ cell neoplasia of unclassified type. *Anal Quant Cytol Histol* 2006; 28: 157-70.
15. Grieco V, Banco B, Giudice C, Mosca F, Finazzi M. Immunohistochemical Expression of the KIT Protein (CD117) in Normal and Neoplastic Canine Testes. *J Comp Pathol* 2010; 142: 213-17.
16. Kim JH, Yu CH, Yhee YH, Im KS, Kim NH, Sur JH. Canine classical seminoma: a specific malignant type with human classifications is highly correlated with tumor angiogenesis. *BMC Cancer* 2010; 10: 243.
17. Thorvaldsen TE, Nødtvedt A, Grotmol T, Gunnes G. Morphological and immunohistochemical characterisation of seminomas in Norwegian dogs. *Acta Vet Scand* 2017; 17: 1-8.
18. Grieco V, Riccardi E, Rondena M, Ciampi V, Finazzi M. Classical and spermatocytic seminoma in the dog: histochemical and immunohistochemical findings. *J Comp Pathol* 2007; 137: 41-6.
19. Saegusa Y, Hayashi H, Taniai E i sur. Spermatocytic seminoma with neuroectodermal differentiation and Sertoli cell tumor in a dog. *Vet Pathol* 2011; 48: 1024-8.
20. Yu CH, Hwanq DN, Yhee YH i sur. Comparative immunohistochemical characterization of canine seminomas and Sertoli cell tumors. *J Vet Sci* 2009; 10: 1-7.
21. Banco B, Giudice C, Veronesi MC, Gerosa E, Grieco V. An immunohistochemical study of normal and neoplastic canine sertoli cells. *J Comp Pathol* 2010; 143: 239-47.
22. Gómez-Laguna J, Millán Y, Reymundo C, Domingo V, Martín De Las Mulas J. Bilateral retiform Sertoli-Leydig cell tumour in a bitch. Alpha-inhibin and epithelial membrane antigen as useful tools for differential diagnosis. *J Comp Pathol* 2008; 139: 137-40.
23. Gopalan A, Dhall D, Olgac S i sur. Testicular mixed germ cell tumors: a morphological and

- immunohistochemical study using stem cell markers, OCT3/4, SOX2 and GDF3, with emphasis on morphologically difficult-to-classify areas. *Mod Pathol* 2009; 22: 1066-74.
24. Emerson RE, Ulbright TM. The use of immunohistochemistry in the differential diagnosis of tumors of the testis and paratestis. *Semin Diagn Pathol* 2005; 22: 33-50.
 25. World Health Organisation: Histological Classification of Tumors of the Genital System of Domestic Animals 1999. <http://www.afip.org/consultation/vetpath/who/whogenet.html> [9.12.2009].
 26. Blackhall FH, Pinitilie M, Michael M i sur. Expression and prognostic significance of kit, protein kinase B, and mitogen-activated protein kinase in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2241-7.
 27. Hohšteter M, Artuković B, Severin K i sur. Canine testicular tumors: two types of seminomas can be differentiated by immunohistochemistry. *BMC Vet Res* 2014; 6: 1-9.
 28. Dow C. Testicular tumours in the dog. *J Comp Pathol* 1962; 72: 247-65.
 29. Grieco V, Riccardi E, Greppi GF, Teruzzi F, Termano V, Finazzi M. Canine Testicular Tumours: a Study on 232 Dogs. *J Comp Path* 2008; 138: 86-9.
 30. Looijenga LH, Olie RA, Van Der Gaaq I i sur. Seminomas of the canine testis. Counterpart of spermatocytic seminoma of men? *Lab Invest* 1994; 71: 490-6.
 31. Grieco V, Riccardi E, Veronesi MC, Giudice C, Finazzi M. Evidence of testicular dysgenesis syndrome in the dog. *Theriogenology* 2008; 70: 53-60.
 32. Maclachlan NJ, Kennedy PC. Tumors of the Genital systems. U: Meuten DJ, ur. *Tumors in Domestic Animals*, 4th ed. Ames, Iowa, Iowa: Sate Press. 2002, 547-74.
 33. Bahrami A, Ro JL, Ayala AG. An overview of testicular germ cell tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1267-80.
 34. Epstein JI. The Lower Urinary Tract and Male Genital System. U: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, ur. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, god; 971-1004.
 35. Giwerzman A, Lindenberg S, Kimber SJ, Andersson T, Müller J, Skakkebaek NE. Monoclonal antibody 43-9F as a sensitive immunohistochemical marker of carcinoma in situ of human testis. *Cancer* 1990; 65: 1135-42.
 36. Ulbright TM. Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. *Mod Pathol* 2005; 18: S61-79.
 37. Owston MA, Ramos-Vara JA. Histologic and Immunohistochemical Characterization of a Testicular Mixed Germ Cell Sex Cord-Stromal Tumor and Leydig Cell Tumor in a Dog. *Vet Pathol* 2007; 44: 936-43.
 38. Banco B, Giudice C, Ghisleni G, Romussi S, Behar DK, Grieco V. Immunohistochemical study of mixed germ cell sex cord stromal tumours in 13 canine testes. *J Comp Pathol* 2015; 152: 182-7.
 39. Hittmair A, Rogatsch H, Hobisch A, Mikuz G, Feichtinger H. CD30 expression in seminoma. *Hum Pathol* 1996; 27: 1166-71.

Summary

Comparative analysis of testicular tumors in men and dogs in the Republic of Croatia

Marko Hohšteter¹, Branka Artuković¹, Marijana Ćorić², Krešimir Severin³, Andrea Gudan Kurilj¹, Ana Beck¹, Ivan-Conrado Šoštarić-Zuckermann¹, Željko Grabarević¹

¹*Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia*

²*University Hospital Centre Zagreb, Department of Pathology and Cytology, Zagreb, Croatia*

³*Department of Forensic and State Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia*

Testicular tumors are among most prevalent tumors in men and dogs. Germ cell tumors have different biological behavior, but are morphologically similar and very frequent in both species.

Material and methods: Testicles from necropsied dogs and the samples of biopsed canine tumors, from the Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb, are analyzed. Analyzed are also samples of biopsed men tumors from the Pathology Department, University Hospital Centre Zagreb.

Results: Testicular tumors were found in 52% of necropsied, and regarding other biopsed tumors testicular comprised 7% of all biopsed canine tumors. Median age of necropsied dogs with testicular tumors was 10,16 and for biopsed dogs 10,24 years. Human patients developed testicular tumors at a medium age of 33,35 years. In the necropsied dogs group most frequent were Leydig cell tumors, and in biopsed group most common were seminomas. Additionally in both groups very frequent were also Sertoli cell tumors, mixed tumors and GCNIS. GCNIS are additionally found in 25% of necropsied and 19% of biopsed dog testicles. In the human testicles, most frequently diagnosed were seminomas, embrional carcinomas, teratomas, GCNIS and mixed germ cell tumors. GCNIS as additional alterations were diagnosed in 65% of human testicular tumors. Performed immunohistochemical analysis showed that investigated markers are useful for differentiation of canine testicular tumors. In dogs, cytokeratin AE1/AE3 showed particularly good results in differentiation of stromal tumor, especially Sertoli cell tumors from the germ cell tumors. c-KIT and PLAP showed higher expression in germ cell tumors, and PLAP showed expression in GCNIS of the dogs. CD 30 was weakly expressed in canine tumors.

Discussion and conclusions: Conducted histopatological analysis and application of PLAP proving existance of GCNIS in canine testicles. Expression of c-KIT confirmed that canine seminomas can be, like in human, classified into two groups: c-KIT positive classical seminomas and c-KIT negativne spermatocytic tumors.

Keywords: dog; human; tumor; testis; pathology; immunohistochemistry