



# Komparativna analiza citoloških i histopatoloških karakteristika melanocitnih tumora pasa

## Comparative Analysis of Cytological and Histopathological Characteristics of Canine Melanocytic Tumors

<sup>1</sup>Sunčana Vuković, dr. med. vet., Specijalistička veterinarska ambulanta – HOLYPET, Dragutina Albrechta 22, 10000 Zagreb

<sup>2</sup>dr. sc. Lidija Medven Zagradišnik, izv. prof. dr. sc. Ivan-Conrado Šoštarić-Zuckermann, prof. dr. sc. Andrea Gudan Kurilj, prof. dr. sc. Branka Artuković, dr. sc. Doroteja Huber, Ivana Mihoković Buhin, dr. med. vet., Dunja Vlahović, dr. med. vet., izv. prof. dr. sc. Marko Hohšteter, Zavod za veterinarsku patologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

<sup>3</sup>prof. dr. sc. Krešimir Severin, Zavod za sudsko i upravno veterinarstvo, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

\*e-adresa: suncanavukovic11@gmail.com

**Vuković, S.<sup>1\*</sup>, L. Medven Zagradišnik<sup>2</sup>, K. Severin<sup>3</sup>, I. C. Šoštarić-Zuckermann<sup>2</sup>, A. Gudan Kurilj<sup>2</sup>, B. Artuković<sup>2</sup>, D. Huber<sup>2</sup>, I. Mihoković Buhin<sup>2</sup>, D. Vlahović<sup>2</sup>, M. Hohšteter<sup>2</sup>**

### Sažetak

**M**elanocitni tumori pojavljuju se u velikog broja domaćih životinja te se klasificiraju kao maligne i benigne neoplazije. Kao i kod drugih tumora, kod melanocitnih su neoplazija istraživanja usmjerena prema boljem razumijevanju biološkog ponašanja tumora zbog poboljšanja dijagnostike i liječenja. U ovom su istraživanju analizirani rezultati citoloških i histopatoloških pretraga te je utvrđivana pouzdanost citološke metode u dijagnostici melanocitnih neoplazija. Utvrđena je važnost citološke dijagnostike kao orijentacijske metode u kliničkom liječenju, što pokazuje da je multidisciplinarni pristup uz pomoć citološke i patohistološke dijagnostike nužan za donošenje konačne dijagnoze.

### Abstract

**M**elanocytic tumors occur in a large number of domestic animals, and they are classified as malignant and benign neoplasms. As with other tumors, in melanocytic neoplasia, research has focused on a better understanding of tumor behavior in order to improve diagnosis and treatment. In this research, the results of cytological and histopathological examinations were analyzed, and the reliability of the cytological method in the diagnosis of melanocytic neoplasia was determined. The study identified the importance of cytological diagnostics as an orientation method in clinical treatment, which shows that a multidisciplinary approach, with the help of cytological and pathohistological diagnostics, is crucial for making a final diagnosis.

**Ključne riječi:** oralni melanom, kutani melanom, melanocitom, citološka pretraga, patohistološka pretraga

**Key words:** oral melanoma, cutaneous melanoma, melanocyte, cytological examination, pathohistological examination

### UVOD

Melanocitni tumori podrijetlom od kožnih melanocita najčešće pokazuju dobroćudno biološko ponašanje, dok su tumori sluznica, posebice oralne sluznice, većinom izrazito zloćudnog karaktera. Maligni melanocitni tumori, koji se nazivaju melanomima, svakim danom u veterinarskoj medicini dobivaju sve veće značenje, ponajviše u komparativnoj onkologiji. U odnosu na maligne, benigni se melanocitni tumori nazivaju melanocitomima (Goldschmidt

i Hendrick, 2002.). Postoje brojna istraživanja ovih tumora u ljudi, dok su u veterinarskoj medicini ona u manjem opsegu.

### Pasminska, dobna i spolna predispozicija

Nije uočena spolna predispozicija u melanocitnim neoplazijama iako postoje istraživanja u kojima su mužjaci učestaliji pacijenti. Također, češći su pacijenti crne dlake te srednje do starije dobi (Teixeira i sur., 2010.; Miller i sur., 2013.).

## Citološke karakteristike

### Oralni i kutani melanomi

Citološki razmaz oralnih i kutanih melanoma sastoji se od neoplastičnih stanica okrugla do poligonalna, vretenasta ili kombinirana oblika sa staničnim pleomorfizmom te nuklearnom atipijom (Munday i sur., 2017.). Stanice su često pomiješane s krvlju, limfoidnim stanicama ili nekrotičnim stanicama (Murali i sur., 2007.). Katkad se unutar tumorskih stanica oralnih melanoma mogu uočiti granule melanina, no u brojnim slučajevima nije ih moguće uočiti, što otežava citološku dijagnostiku (Whitbread, 2015.) (slika 1). No kod kutanih melanoma, okrugle i epiteloidne stanice posjeduju određenu količinu, dok vretenaste stanice rijetko posjeduju granule melanina (Resende i sur., 2015.) (slika 2).

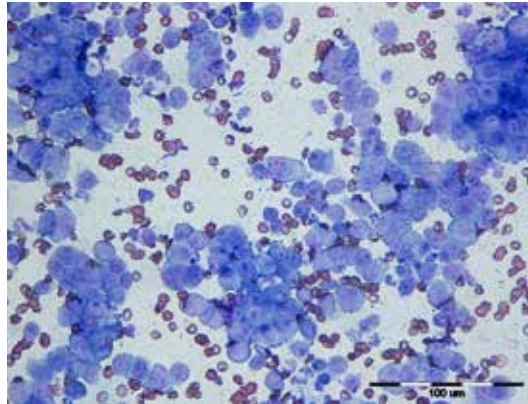
### Melanocitomi

Benigne melanocitne stanice često imaju povećane, vezikularne jezgre s malim jezgrićama. Unatoč velikim jezgrama, nuklearni je pleomorfizam minimalan. Stanice su najčešće vretenasta oblika (Vail i sur., 2007.). Melanocitomi često sadržavaju veliku količinu pigmenta unutar citoplazme te je teško u potpunosti procijeniti stanične detalje (Barger, 2012.).

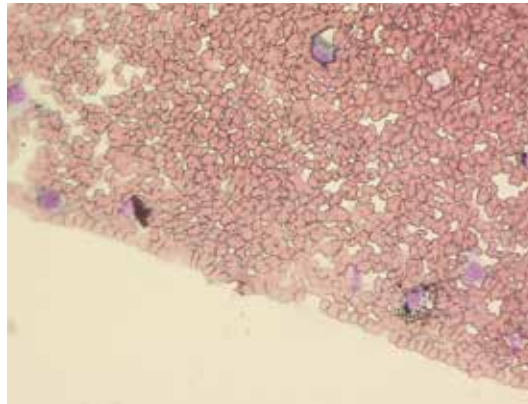
## Histopatološke karakteristike

### Oralni i kutani melanomi

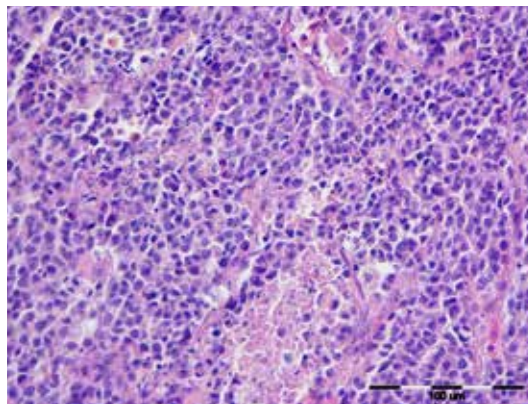
Histološki izgled oralnih i kutanih melanoma sastoji se od kombinacije okruglastih (tzv. epiteloidnih) stanica i vretenastih stanica. Oralni se melanomi mogu razlikovati od dobro diferenciranih i visoko pigmentiranih do izrazito anaplastično amelanotičnih tipova (slika 3). Vretenaste stanice kutanih melanoma slabo su pigmentirane, dok okrugle i epiteloidne stanice imaju umjerene do obilne količine melanina (Resende i sur., 2015.). Prisutan je izražen stanični pleomorfizam, izražena nuklearna atipija, a neoplastične stanice često imaju afinitet za urastanje u epidermis (tzv. spojna aktivnost). Također, često je prisutna tumorska nekroza i ulceracija (slika 4). Oralni melanomi s mitotskim indeksom  $< 4/10$  velikog povećanja mikroskopa (VPM) uglavnom odgovaraju tumorima niskog stupnja malignosti, a oni s mitotskim indeksom



**Slika 1.** Citološki izgled oralnog melanoma psa na povećanju 400 x, bojenje May-Grünwald-Giemsma (MGG). Izvor: arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.



**Slika 2.** Citološki izgled kutanog melanoma psa na povećanju 200 x, bojenje May-Grünwald-Giemsma (MGG). Izvor: arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.



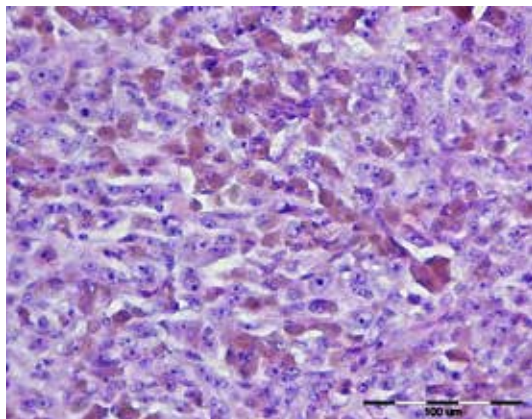
**Slika 3.** Prikaz oralnog amelanotičnog melanoma psa na povećanju 400 x, HE bojenje. Izvor: arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

$\geq 4/10$  VPM povezani su s malignijim biološkim ponašanjem (Munday i sur., 2017.). Mitotski indeks kutanih melanoma koji je veći od  $3/10$  VPM znatno korelira s kraćim preživljenjem jedinke (Campagne i sur., 2013.).

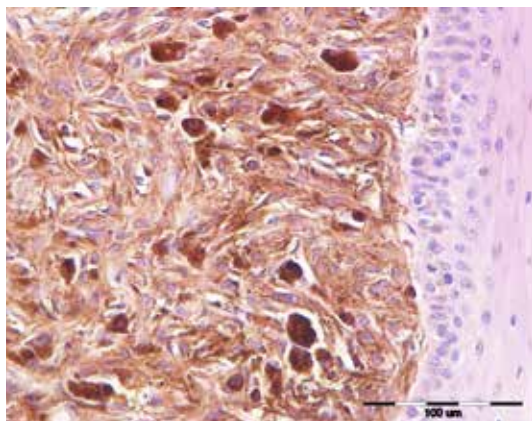
### Melanocitomi

Melanocitomi su obično sastavljeni od vretenastih stanica raspoređenih u snopove, gnjezda i vrtloge, umjereno su celularni i nedostaje im stromalni kolagen. Benigne melanocitne

**Slika 4.** Prikaz kožnog melanoma psa na povećanju 400 x, HE bojenje. Izvor: arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.



**Slika 5.** Prikaz kožnog melanocitoma psa na povećanju 400 x, HE bojenje. Izvor: arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.



stanice često imaju povećane, vezikularne jezgre s malim nukleolusima (slika 5). Unatoč velikim jezgrama, nuklearni je pleomorfizam minimalan (Hargis i Ginn, 2008.). Mitotski je indeks manji nego kod malignih tumora (< 1/10 VPM), a mitotska se atipija ne opaža. Nuklearna morfologija može biti prikrivena velikom količinom pigmenta, a pojedini melanocitomi mogu biti amelanotični.

## MATERIJALI I METODE

Za ovo su istraživanje korišteni arhivski citološki i histopatološki preparati te arhivski citološki i histopatološki nalazi dobiveni tijekom redovitog rutinskog obavljanja obdukcija, citoloških i histopatoloških pretraga na Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su analizirani od 1. siječnja 2013. do 1. ožujka 2020. godine. Citološki su materijali dobiveni punkcijom tankom iglom (*fine needle aspiration*, FNA). Analizirane su spolne, dobne te pasminske karakteristike pojedine životinje. Analizirani su rezultati cito-

loške i histopatološke pretrage te je utvrđena njihova podudarnost. Svi su podaci statistički analizirani računalnim programom MICROSOFT EXCEL 2010. Utvrđivani su postotni udjeli za navedene parametre te su na taj način uspoređivani rezultati citološke i histopatološke pretrage.

## REZULTATI

Ukupno su obuhvaćene 63 životinje kojima je citološkom pretragom postavljena dijagnoza ili sumnja na melanocitnu neoplaziju. Ukupno je u 21 životinje dijagnosticiran melanocitni tumor, od toga 18 melanoma (10 oralnih i 8 kutanih) te 3 melanocitoma, neovisno o tipu obavljene pretrage, dok je u ostalim slučajevima postavljena sumnja na melanocitnu neoplaziju (tablica 1). Prosječna starost pasa s melanocitnim tumorom iznosila je 9,62 godine. Od ukupnog broja pasa 81 % su činili mužjaci, a 19 % ženke. Melanomi su najčešće dijagnosticirani u križanaca (n = 8), rotvajlera (n = 2) i pasmine bigl (n = 2). Citološki je u 11 slučajeva postavljena konačna dijagnoza melanoma, a u 52 slučaja sumnja na melanocitnu neoplaziju te je za postavljanje konačne dijagnoze preporučena histopatološka pretraga. Broj odrađenih patohistoloških pretraga bio je 22. Nakon patohistološke pretrage u 13 je slučajeva utvrđeno da se radi o melanocitnom tumoru. U taj broj pripada 10 melanoma te 3 melanocitoma, dok se u 9 slučajeva utvrdilo da se ne radi o melanocitnom tumoru. Također, za 3 je slučaja citološkom pretragom dijagnosticiran melanom te se dodatno potvrdila točnost dijagnoze. Od 63 ukupna slučaja, u 33 slučaja nije postavljena konačna dijagnoza. U taj su broj uključeni slučajevi citološke sumnje na melanocitnu neoplaziju te slučajevi kod kojih nije provedena patohistološka pretraga.

## RASPRAVA

### *Pasminska, spolna, dobna distribucija*

Zastupljenost pasmina i dob pasa s melanocitnim tumorima odgovaraju prijašnjim istraživanjima (Teixeira i sur., 2010.; Miller i sur., 2013.). Rezultati analize spolne distribucije pokazuju mnogo veći udio mužjaka u odnosu na ženke (oko 1 : 5) pa iako se općenito smatra da ne postoji spolna predispozicija za razvoj mela-

**Tablica 1.** Prikaz dijagnosticiranih melanocitnih neoplazija, pasmina, dobi i spola jedinki.

Redni broj jedinke	Tip melanoc. neoplazije	Pasmina	Dob	Spol	Odrađena pretraga
1.	Oralni melanom	Križanac	5	m	C+H
2.	Oralni melanom	Križanac	14	m	C
3.	Oralni melanom	Križanac	14	ž	C
4.	Oralni melanom	Bigl	12	m	C+H
5.	Oralni melanom	Bigl	15	m	C
6.	Oralni melanom	Labrador retriever	10	m	C+H
7.	Oralni melanom	Ravnodlaki retriever	9	m	C+H
8.	Oralni melanom	Maltezer	11	m	C
9.	Oralni melanom	Eng. koker španijel	12	m	C+H
10.	Oralni melanom	Tornjak	12	m	C+H
11.	Kutani melanom	Križanac	7	m	C+H
12.	Kutani melanom	Križanac	9	m	C
13.	Kutani melanom	Križanac	15	m	C+H
14.	Kutani melanom	Rotvajler	8	ž	C
15.	Kutani melanom	Rotvajler	11	m	C+H
16.	Kutani melanom	Francuski buldog	2	m	C+H
17.	Kutani melanom	Mekodlaki pšenični terijer	7	m	C
18.	Kutani melanom	Cane canario	6	ž	C+H
19.	Melanocitom (dermalni)	Križanac	6	ž	C+H
20.	Melanocitom (dermalni)	Križanac	10	m	C+H
21.	Melanocitom (dermalni)	Labrador retriever	7	m	C+H

\* m – muški spol; ž – ženski spol

\*\* C – citološka pretraga; C+H – citološka + histopatološka pretraga

nocitnih tumora (Nishiya i sur., 2016.), u našem je istraživanju, kao i u nekih drugih autora, vidljiva češća pojava melanocitnih tumora u mužjaka (Resende i sur., 2015.).

### **Citološka pretraga**

U ovom je istraživanju citološkom pretragom od 63 melanocitna tumora u 11 slučajeva dijagnosticiran melanom, dok se sumnja na melanocitni tumor bez definiranja biološkog ponašanja utvrdila u 52 slučaja. Ovakav je rezultat očekivan i pokazuje kako je citološka metoda preciznija u slučaju kada tumorske stanice imaju jasno izražene kriterije malignosti, što je u skladu s literaturnim podacima (Tyler i sur., 2008.). Unatoč brojnim prednostima, poput brzine i neinvazivnosti, citološki razmaz često nije reprezentativan zbog niske staničnosti, degenerativnih promjena na stanicama, prisutnosti nekroze, cističnih promjena i slabije izražene stanične atipije, što otežava dijagnostiku (Murali i sur., 2007.). Pogreške u citološkim zaključcima mogle bi se izbjeći poboljšanjem tehnika dobivanja i bojenja citološkog materijala (Simeonov, 2010.). Usprkos svemu, zbog svoje brzine i ekonomičnosti citološka je dijagnostika od velike pomoći kao orijentacijska pretraga koja nas može usmjeriti prema daljnjim dijagnostičkim i terapijskim postupcima (Murali i sur., 2007.).

### **Patohistološka pretraga**

Ovim je istraživanjem u 22 od ukupno 63 analizirana slučaja obavljena histopatološka pretraga. Broj patohistoloških uzoraka relativno je malen u odnosu na sveukupan broj uzoraka, a mogući je razlog tomu to što se vlasnici nakon postavljanja sumnje na melanocitnu neoplaziju odlučuju samo na uklanjanje tvorbe, bez histopatološke pretrage. Nakon provedene patohistološke pretrage u 9 od 22 se slučaja utvrdilo da se ne radi o melanocitnom tumoru. U 13 od 22 slučaja patohistološkom je pretragom dijagnosticiran melanocitni tumor. U 3 od navedenih 13 slučajeva histopatološkom je pretragom dijagnosticiran melanocitom, dok je prethodnom citološkom pretragom postavljena dijagnoza melanocitnog tumora. Visoko podudaranje u citološkim i histopatološkim dijagnozama kod melanocitoma u skladu je s lite-

rturnim podacima, što je vjerojatno posljedica dobre diferenciranosti i prisutnosti velike količine melaninskih granula u tumorskim stanicama (Ghisleni, 2006.). S obzirom na to da se karakteristike malignosti melanocitnih tumora, koje uključuju kapsularnu invaziju, invaziju mekog tkiva i invaziju krvnih žila, mogu identificirati samo patohistološkom pretragom (Vail i sur., 2007.; Grabarević, 2016.), ovaj je rezultat očekivan jer je mogućnost raspoznavanja benignih od malignih melanocitnih neoplazija pomoću citološke pretrage uglavnom otežana (Whitbread, 2015.). Za ostatak tumora nije utvrđena konačna histopatološka dijagnoza jer uzorci tumora nisu dostavljeni na histopatološku pretragu. Razlozi su za to moguće slični onima iz istraživanja koje je proveo Griffiths (1984.), koji je zaključio da se u brojnim slučajevima kliničari oslanjaju samo na citološku dijagnostiku kako bi što prije proveli eksciziju tumora i pravodobnu terapiju.

### **ZAKLJUČAK**

Pasminska, dobna i spolna raspodjela melanocitnih tumora pasa u ovom istraživanju odgovara dosadašnjim literaturnim podacima. Citološka se pretraga pokazala vrijednom kao važna klinička dijagnostička metoda. Unatoč tome, rezultati ovog istraživanja pokazuju da je patohistološka pretraga presudna u donošenju konačne dijagnoze melanocitne neoplazije. Provedeno istraživanje upućuje na potrebu za daljnjim istraživanjima i poboljšanjima dijagnostike melanocitnih neoplazija kako bi se omogućilo rano otkrivanje te adekvatno liječenje koje će produžiti i poboljšati kvalitetu života pasa s melanocitnim neoplazijama.

### **LITERATURA**

- BARGER, A. (2012): Cytology of Neoplasia: An Essential Component of Diagnosis. URL: <https://todaysveterinarypractice.com/wp-content/uploads/sites/4/2016/06/T1209F01.pdf>. (1.11.2021.)
- BERGMAN, P. J. (2007): Canine Oral Melanoma. Clin. Tech. Small Anim. Pract. 22, 55-60.
- CAMPAGNE, C., S. JULE, C. ALLEAUME, F. BERNEX, J. EZAGAL, S. CHATEAU-JOUBERT, M. ESTRADA, G. AUBIN-HOUZELSTEIN, J. J. PANTHI-

- ER, G. EGIDY (2013): Canine melanoma diagnosis: RACK1 as a potential biological marker. *Vet. Pathol.* 50, 1083-1090.
- GHISLENI, G., P. ROCCABIANCA, R. CERUTI, D. STEFANELLO, W. BERTAZZOLO, U. BONFANTI, M. CANIATTI (2006): Correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology in the evaluation of cutaneous and subcutaneous masses from dogs and cats. *Vet. Clin. Pathol.* 35, 24-35.
  - GOLDSCHMIDT, M. H., M. J. HENDRICK (2002): Tumors of the skin and soft tissues. U: Tumors in Domestic Animals. (Meuten, D. J., ur.). Iowa State Press. Ames. str. 78-83.
  - GRABAREVIĆ, Ž. (2016.): Uvod. U: Osnove razudbe domaćih životinja. (Grabarević, Ž., R. Sabočanec, ur.). Medicinska naklada. Zagreb. str. 3-4.
  - GRIFFITHS, G. L., J. H. LUMSDEN, V. E. O. VALLI (1984): Fine Needle Aspiration Cytology and Histologic Correlation in Canine Tumors. *Vet. Clin. Pathol.* 13, 13-17.
  - HARGIS, A. M., E. P. GINN (2008): Koža. U: Specijalna veterinarska patologija, 4<sup>th</sup> ed. (Zachary, J. F., M. D. McGavin, Ž. Grabarević, ur.). Stanek. Varaždin. str. 949.
  - MILLER, W. H., I. GRIFFIN, K. L. CAMPBELL (2013): Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, Elsevier Mosby. St. Louis. str. 774-843.
  - MUNDAY, J. S., C. V. LÖHR, M. KIUPEL (2017): Tumors of the Alimentary Tract. U: Tumors in Domestic Animals, 5<sup>th</sup> ed. (Meuten, D. J., ur.). John Wiley & Sons Inc. Ames. str. 499-601.
  - MURALI, R., A. DOUBROVSKY, G. F. WATSON, P. R. MCKENZIE, C. SOON LEE, D. J. MCLEOD, R. F. UREN, J. R. STRECH, R. P. M. SAW, J. F. THOMPSON, R. A. SCOLYER (2007): Diagnosis of Metastatic Melanoma by Fine-Needle Biopsy: Analysis of 2,204 Cases. *Am. J. Clin. Pathol.* 127, 385-397.
  - NISHIYA, A. T., C. O. MASSOCO, C. R. FELIZOLA (2016): Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Vet. Sci.* 3, 7. doi: <https://doi.org/10.3390/vetsci3010007>. (1.11.2021.)
  - RESENDE, L., J. MOREIRA, J. PRADA, F. L. QUEIROGA, I. PIRES (2015): Current Insights Into Canine Cutaneous Melanocytic Tumours Diagnosis. U: Melanoma. (Murph, M. ur.). InTech. London. str. 159-195.
  - SIMEONOV, R. S. (2010): The accuracy of fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of canine skin and subcutaneous masses. *Comp. Clin. Pathol.* 12, 143-147.
  - TEIXEIRA, T. F., T. C. SILVA, B. COGLIATI, N. K. NAGAMINE, M. L. Z. DAGLI (2010): Retrospective study of melanocytic neoplasms in dogs and cats. *Braz. J. Vet. Pathol.* 3, 100-104.
  - TYLER, R. D., R. L. COWELL, J. H. MEINKOTH (2008): Cutaneous and subcutaneous lesions. U: Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat, 3<sup>rd</sup> ed. (Cowell, R. L., R. D. Tyler, J. H. Meinkoth, D. B. DeNicola, ur.). Mosby Elsevier. St. Louis. str. 78-111.
  - VAIL, D. M., S. J. WITHROW (2007): Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 4<sup>th</sup> ed., W. B. Saunders. St. Louis. str. 375-401.
  - WHITBREAD, T. J. (2015): Cytology. The Merck Veterinary Manual. URL: <https://www.merckvetmanual.com/clinical-pathology-and-procedures/diagnostic-procedures-for-the-private-practice-laboratory/cytology> (1.11.2021.)