

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Lucija Kanižaj i Sara Klobučar

Analiza morfologije tumora i broja mastocita u pasa sa  
hemangiosarkomom

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Andree Gudan Kurilj, DipIECVP i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

## POPIS KRATICA

HSA - hemangiosarkom

MC - mastocit

T<sub>H</sub>2 – engl. T helper 2, pomoćnički T limfociti tipa 2

IgE – imunoglobulin E

BM – broj mastocita

HE – hematoksilin eozin

n – engl. number, broj

NP – nije poznato

## SADRŽAJ RADA

1. UVOD.....	1
Učestalost hemangiosarkoma, pasmina, dob i spol životinja .....	1
Kliničke karakteristike hemangiosarkoma.....	2
Makroskopske i histološke karakteristike hemangiosarkoma.....	2
Rast i metastaziranje hemangiosarkoma.....	3
Uloga mastocita u tumorima.....	3
2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	5
3. MATERIJAL I METODE.....	7
4. REZULTATI.....	9
Broj pasa sa visceralnim hemangiosarkomom, pasmina i dob oboljelih životinja.....	9
Organi zahvaćeni sa hemangiosarkomom i histološki tip tumora.....	10
Broj mastocita u hemangiosarkomima.....	16
5. RASPRAVA.....	20
6. ZAKLJUČCI.....	22
7. ZAHVALE.....	23
8. POPIS LITERATURE.....	24
9. SAŽETAK.....	27
10. SUMMARY.....	28

## 1. UVOD

Hemangiosarkom (HSA) je maligna neoplazija karakterizirana agresivnim rastom, ranim metastaziranjem i nepovoljnom prognozom. Hemangiosarkom se može razviti u bilo kojem vaskulariziranom tkivu, međutim najčešće primarno mjesto razvoja hemangiosarkoma u pasa je slezena. Također, u pasa se uz HSA slezene, mogu razviti i konkurentni tumori u supkutanom tkivu i srcu gdje najčešće zahvaćaju desni atrij ili aurikulu. U takvim slučajevima još uvijek nije jasno radi li se o metastazama tumora ili multicentričnoj pojavi tumora (LINDER, 2017.).

Pretpostavlja se da visceralni hemangiosarkomi u pasa mogu nastati iz diferenciranih vaskularnih endotelnih stanica ili iz matičnih (hematopoietskih) stanica koštane srži sa hemangioblastičnim potencijalom. Naime, pojedine neoplastične stanice pokazuju različite molekularne fenotipove, što sugerira podrijetlo od multipotentnih progenitorskih stanica hematopoietskog podrijetla (LINDER, 2017.). Točan uzrok HSA u pasa nije poznat, međutim pasminska predispozicija za razvoj ovih tumora ukazuje na utjecaj nasljednih genetskih čimbenika (HART i sur., 2014.). Čimbenici iz okoliša, kao što su ultraljubičasto ili ionizirajuće zračenje, mogu uzrokovati kutane hemangiosarkome, a psi izloženi radionukleotidima mogu razviti primarne HSA u plućima, kostima i jetri (LINDER, 2017.).

## UČESTALOST HEMANGIOSARKOMA, PASMINE, DOB I SPOL ŽIVOTINJA

Hemangiosarkomi se najčešće pojavljuju kod pasa starosti od 6 do 17 godina, a oboljevaju različite pasmine pasa uključujući i križane (LINDNER, 2017.). Nekoliko studija je pokazalo da najveći rizik za razvoj HSA imaju pasmine zlatni retriever, labrador retriever i njemački ovčar (SCHULTHEIS, 2004., BOSTON i sur., 2011.), a smatra se da povećani rizik imaju i pasmine bokser, baset i bernardinac (KIM i sur., 2015.). Za razvoj HSA ne postoji značajnija spolna predispozicija, a veća učestalost pojave HSA utvrđena je u kastriranih kuja u odnosu na nekastrirane (PRYMAK i sur., 1988.).

## KLINIČKE KARATERISTIKE HEMANGIOSARKOMA

Klinički znakovi kod pasa sa HSA mogu varirati s obzirom na lokaciju tumora, a mogu uključivati anoreksiju, letargiju, osjetljiv abdomen, povraćanje i proljev. Kod nekih životinja mogu se izmjenjivati epizode sinkope i kolpsa sa epizodama oporavka što se objašnjava pojavom hipovolemije i autotransfuzije zbog rupture tumora (PRYMAK i sur., 1988.). HSA u desnom atriju može rezultirati hemoperikardom i posljedičnom tamponadom srca (BOSTON i sur., 2011.). Najčešći uzrok smrti kod pasa sa HSA slezene je hipovolemija zbog rupture tumora, metastatska bolest, diseminirana intravaskularna koagulopatija i srčane aritmije (WOOD i sur., 1998.). Promjene u krvnoj slici kod pasa sa HSA uključuju regenerativnu anemiju i retikulocitozu. U 30 do 60% pasa sa HSA se nalazi i trombocitopenija, a može se naći i neutrofilna leukocitoza (LINDER, 2017.).

## MAKROSKOPSKE I HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE HSA

Hemangiosarkomi slezene najčešće se manifestiraju kao multiple, male ili velike mekane parenhimske mase. Na prereznoj površini najvećim dijelom su tamno crvene boje, ali se mjestimice mogu uočiti bjeličasta solidna područja tumora. Vrlo često veliki dio mase čini hematoma nastao kao posljedica ruptur tumora, što otežava nalaz samog tumora. Najbolji makroskopski dokaz da je masa u slezeni HSA je prisutnost metastaza u drugim organima, kao što su omentum, jetra, pluća ili mozak. U 70 do 80% pasa sa HSA slezene nastati će hemoabdomen (MALLINCKRODT i GOTTFRIED, 2011.).

Histološki, hemangiosarkome karakterizira proliferacija neoplastičnih endotelnih stanica koje stvaraju vaskularne prostore ispunjene krvlju. Rastu kao neinkapsulirani, invazivni tumori. Vaskularni prostori su različite veličine, a pregrađuju ih tanke kolagene trabekule ili više solidna područja tumorskih stanica. Obrasci rasta variraju, pa se tako mogu naći kapilarna, kavernoza i solidna područja (GÖRITZ i sur., 2013.). Ovakvi obrasci rasta su samo deskriptivni i ne koriste se u prognostičke svrhe (LINDER, 2017.). Morfologija neoplastičnih epitelnih stanica u hemangiosarkomima je općenito heterogena. One mogu biti vretenaste ili

poligonalne sa okruglim, ovalnim ili pleomornim jezgrama koje imaju prominentne jezgrice. Citoplazma može biti umjerena ili obilna, bazofilna ili ponekad vakuolizirana. Anizocitoza, anizokarioza i broj mitozna mogu varirati, ali su gotovo uvijek prisutni. Također, često se nalaze i veća područja nekroze, krvarenja i naslaga fibrina (GÖRITZ i sur., 2013., LINDER, 2017.). HSA su relativno tipični tumori te je nalaz pojedinačnih ili većih nakupina eritrocita između zbijenih neoplastičnih stanica obično dovoljan za postavljanje dijagnoze. Ukoliko se radi o slabije diferenciranim tumorima, za diferenciranje endotelnih stanica se mogu primijeniti imunohistokemijski biljezi i to faktoru VIII – pridruženi čimbenik (von Willebrand faktor) i CD31 (LINDER, 2017.).

## RAST I METASTAZIRANJE HSA

Hemangiosarkomi slezene imaju visoki metastatski potencijal i lošu prognozu. HSA mogu metastazirati u različite organe uključujući pluća, jetru, bubrege, srce, mozak, crijevo, ošit, peritoneum, omentum, mezenterij, nadbubrežne žlijezde i kožu/potkožje. Metastaze su često brojne, relativno uniformne veličine i najčešće promjera manjeg od 1 cm (SCHULTHEISS, 2004., GÖRITZ i sur., 2013., WENDELBURG i sur., 2015.). Prema istraživanjima, prosječno vrijeme preživljavanja pasa nakon operacije HSA je četiri mjeseca (WENDELBURG i sur., 2015.). U istraživanju SPANGLER i KASS (1977.) manje od 10% pasa sa HSA slezene je bilo živo jednu godinu nakon nalaza tumora.

## ULOGA MASTOCITA U TUMORIMA

Mastociti (MC) potječu i diferenciraju se iz CD34+ prekursorske stanice u koštanoj srži. U sisavaca su normalno rasprostranjeni u vezivnom tkivu oko malih krvnih i limfnih žila i u sluznicama. Sluznički mastociti se nalaze u sluznicama dišnog i probavnog sustava, a njihov broj raste tijekom nekih tipova imunskog odgovora, kao što je onaj posredovan pomoćničkim T limfocitima tipa 2 (T<sub>H</sub>2). Za razliku od njih, vezivnotkivni mastociti nisu ovisni o T limfocitima. Mastociti imaju najvažniju ulogu u reakcijama preosjetljivosti posredovanima sa imunoglobulinima E (IgE) (ACKERMANN, 2017.).

Osim u upalnim reakcijama, poznato je da mastociti imaju važnu ulogu i u progresiji i angiogenezi kod nekih humanih tumora. Tako je dokazano da potiču angiogenezu u karcinomima bazalnih stanica (AOKI i sur., 2003.), plazmacitomima (NAKAYAMA i sur., 2004.), planocelularnim karcinomima i adenokarcinomima pluća (TOMITA i sur., 2000.). Što se tiče uloge mastocita u tumorima životinja, takve spoznaje su malobrojne. MUKARATIRWA i sur. (2006.a i b) su istraživali povezanost između područja velike vaskularne gustoće i broja mastocita u pasa sa melanomima i transmisivnim veneričnim tumorima. SCHULTHEISS (2004.) je utvrdila povećan broj mastocita u kutanim i nekutanim hemangiomima i hemangiosarkomima kod domaćih životinja, ali nije utvrđena povezanost između stupnja diferencijacije tumora i broja mitozu s brojem mastocita. SABATTINI i BETTINI (2009.) su utvrdili veći broj mastocita u kutanim hemangiomima i pretpostavili njihovu moguću ulogu u patogenezi benignih vaskularnih neoplazija. WOLDEMESKEL i RAJEEV (2010.) su utvrdili da je veći broj mastocita u karcinomima mliječne žlijezde kuja također povezan sa angigenezom, a nisu pronašli značajniju razliku u broju mastocita između kutanih HSA i hemangioma. Povezanost angiogeneze i broja mastocita utvrđena je i u limfomima pasa (WOLDEMESKEL i sur., 2014.).



## 2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

### HIPOTEZA

Iz dosadašnjih relativno malobrojnih istraživanja hemangiosarkoma u pasa, razvidno je da oni predstavljaju vrlo maligne i agresivne tumore, slabo razjašnjene etiologije i patogeneze. Stoga ne postoje niti relevantni histološki čimbenici koji bi se koristili u prognostičke svrhe. Nadalje, potencijalna uloga mastocita u ovim tumorima vrlo je slabo istražena te se uglavnom svodi na zaključke o većem broju mastocita u kutanim hemangiomima u odnosu na kutane hemangiosarkome.

Pretpostavljamo da mastociti imaju određenu ulogu i u patogenezi visceralnih HSA. Obzirom da je kod nekih tipova tumora dokazana njihova veza sa angiogenezom, pretpostavljamo da je u visceralnim HSA pasa broj mastocita (BM) možda povezan sa razvojem određenog tipa HSA ili se broj mastocita u tumoru razlikuje s obzirom na zahvaćeni organ. Također, pretpostavljamo da je broj mastocita u HSA možda povezan i sa nekim drugim histološkim karakteristikama tumora, kao npr. količinom strome odnosno stupnjem fibroze.

### OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći ciljevi ovoga rada su u određenom vremenskom periodu utvrditi broj pasa sa visceralnim hemangiosarkomima, dob i pasminu oboljelih životinja te broj HSA obzirom na zahvaćene organe (jedan organ ili konkurentni tumori i metastaze u više organa). Nadalje, odrediti će se i histološki tipovi HSA u zahvaćenim organima.

Specifični ciljevi rada su:

1. Utvrditi broj mastocita u parenhimu tumora.
2. Utvrditi broj mastocita u stromi tumora i na njegovim rubnim dijelovima (okolina tumora).
3. Utvrditi stupanj razvijenosti strome, odnosno stupanj fibroze u tumorima.

4. Utvrditi eventualnu povezanost između broja mastocita i histološkog tipa tumora.
5. Utvrditi eventualnu povezanost između broja mastocita i razvijenosti strome, odnosno fibroze u tumorima.

### 3. MATERIJAL I METODE

U istraživanju su korišteni arhivski uzorci hemangiosarkoma pasa iz arhive Zavoda za veterinarsku patologiju, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, dobiveni nakon operacije istih ili izuzetih prilikom obdukcije, u razdoblju od 1. siječnja 2013. do 31. prosinca 2017. godine.

#### Histopatološka analiza

U svrhu histopatološke analize tumora, uzorci su fiksirani u 4 ili 10% - tnom puferiranom formalinu i uklopljeni u parafin. Izrezani presjeci debljine 4  $\mu$ m su obojeni hematoksilin i eozinom (HE) metodom.

Kako bi se što objektivnije odredio histološki tip HSA, svaki od autora i mentor prvo je zasebno (individulano) odredio histološki tip za svaki tumor prema histološkom obrascu rasta i načinu opisanom u GÖRITZ i sur., 2013., te su na kraju histološki tipovi tumora usuglašeni za svaki pojedini tumor i prezentirani kao: solidni, kapilarni, kavernozni ili svi tipovi (ukoliko je tumor sadržavao dva ili sva tri obrasca rasta s time da su u prikazu rezultata tipovi poredani od dominantnog do najmanje raširenog, a u svrhu statističke obrade rezultata stavljeni su u skupinu mješoviti HSA).

U svrhu vizualizacije mastocita, dodatni presjeci debljine 4  $\mu$ m su bojani i specijalnim histokemijskim bojenjem toluidinskim modrilom na sljedeći način: (1) deparafinizacija i rehidracija narezanog tkiva; (2) bojenje u radnoj otopini toluidinskog modrila (10 minuta); (3) ispiranje destiliranom vodom; (4) dehidracija uzorka; (5) bistrenje u ksilolu; (6) pokrivanje uzorka pokrovnim stakalcem.

Broj mastocita koji infiltriraju tumor ili stromu i okolno tkivo određivan je u 10 vidnih polja na povećanju x400, kako je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Određivanje broja mastocita

BROJ MASTOCITA (BM)	BODOVI
Nema mastocita	0
Rijetki mastociti (1 do 9)	1
Osrednji BM (10 do 24)	2
Veliki BM (24 do 50 ili više)	3

Za određivanje razvijenosti strome, odnosno stupnja fibroze u tumorima, svaki od autora i mentor prvo je zasebno (individulano) odredio stupanj fibroze, a zatim su stupnjevi usuglašeni za svaki pojedini tumor i prezentirani kao: (1) vrlo slaba stroma/ fibroza, (2) umjereno razvijena stroma/ fibroza, (3) vrlo razvijena stroma/ fibroza.

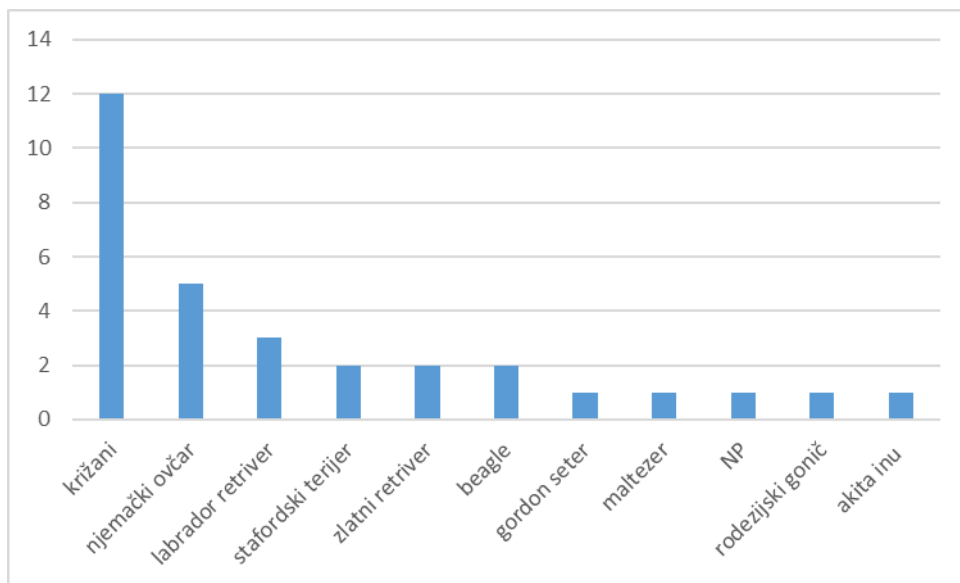
#### Statistička obrada podataka

Prikupljeni podatci statistički su obrađeni u računalnim programima Microsoft Excel 2013 i STATISTICA (data analysis software sistem), StatSoft, Inc. (2011.), version 10 [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com). Signifikantnost razlika između različitih skupina se utvrđivala pomoću analize varijance te Pearsonovog Hi-kvadrat testa. Kao statistički značajnima smatrane su p vrijednosti niže od 0,05 ( $p < 0,05$ ).

#### 4. REZULTATI

##### BROJ PASA SA VISCERALNIM HSA, PASMINA I DOB OBOLJELIH ŽIVOTINJA

U periodu od 1. siječnja 2013. do 31. prosinca 2017. godine u arhivi Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pronađen je ukupno 31 pas sa dijagnozom visceralnog hemangiosarkoma. Od toga je od 19 pasa (61,3%) na histopatološku pretragu dostavljen po jedan organ zahvaćen tumorom, a 12 pasa (38,7%) je dostavljeno na obdukciju te su kod njih utvrđeni konkurentni tumori i metastaze u više organa. Prosječna dob oboljelih životinja je bila 10 godina, s rasponom između 7 i 15 godina. Pasmina u koje je utvrđen najveći broj HSA je bila križana (n = 12, 38,7%), a zatim njemački ovčar (n = 5, 16,1%) i labrador retriever (n = 3, 9,7%). Po dva slučaja (6,5%) HSA utvrđena su u pasmina stafordski terijer, zlatni retriever i beagle, a po jedan slučaj (3,2%) u pasmina gordon seter, maltezer, rodezijski gonič i akita inu. Za jednog psa nisu bili poznati podaci o pasmini. Pojavnost HSA obzirom na pasminu prikazana je na slici 1.



Slika 1. Pojavnost HSA u pojedinim pasmina pasa. (NP – nije poznato)

## ORGANI ZAHVAĆENI SA HSA I HISTOLOŠKI TIP TUMORA

Organi zahvaćeni sa HSA i histološki tip tumora kod pasa dostavljenih na obdukciju te pojedinačno zahvaćeni organi pasa (koji su u trenutku operacije i dijagnoze HSA bili živi) i histološki tip tumora dostavljeni na histopatološku pretragu prikazani su u tablicama 2. i 3.

Tablica 2. Organi zahvaćeni sa HSA i histološki tip tumora kod pasa dostavljenih na obdukciju.

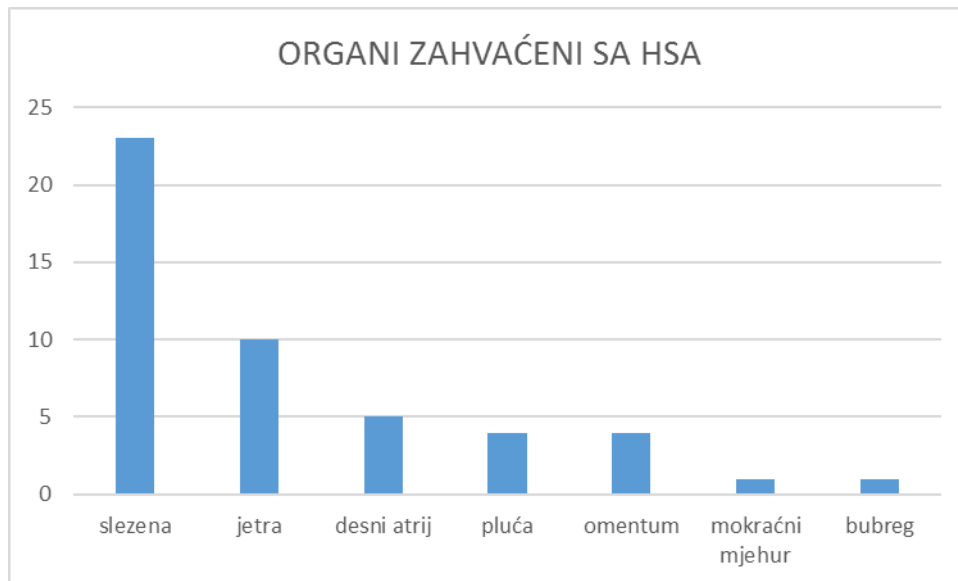
<b>PASMINA</b>	<b>ORGAN</b>	<b>HISTOLOŠKI TIP HSA</b>
<b>njemački ovčar</b>	slezena	kavernozni>kapilarni>solidni
	jetra	kapilarni
	pluća	kavernozni
<b>stafordski terijer</b>	slezena	solidni
	omentum	kavernozni
<b>njemački ovčar</b>	mokraćni mjehur	kavernozni>solidni
	jetra	kavernozni>solidni
	slezena/ranija splenektomija	
<b>gordon seter</b>	slezena	kavernozni>kapilarni>solidni
	jetra	kapilarni
<b>njemački ovčar</b>	pluća	solidni>kapilarni
	desni atrij	solidni
	slezena/ranija splenektomija	
<b>labrador retriever</b>	desni atrij	solidni>kavernozni
	jetra	kavernozni
	bubreg	kavernozni
	slezena	solidni>kavernozni
<b>križani</b>	desni atrij	kavernozni>kapilarni>solidni
	slezena	kavernozni
	omentum	kavernozni
<b>zlatni retriever</b>	jetra	kavernozni>kapilarni
	desni atrij	kapilarni>solidni
	pluća	kapilarni
	omentum	kapilarni
<b>križani</b>	slezena/ranija splenektomija	
	desni atrij	kavernozni>solidni
	jetra	kavernozni
<b>beagle</b>	pluća	kavernozni
	slezena	kavernozni> solidni
	jetra	solidni
<b>njemački ovčar</b>	slezena	solidni>kavernozni

<b>križani</b>	jetra	kapilarni
	slezena/ranija splenektomija	

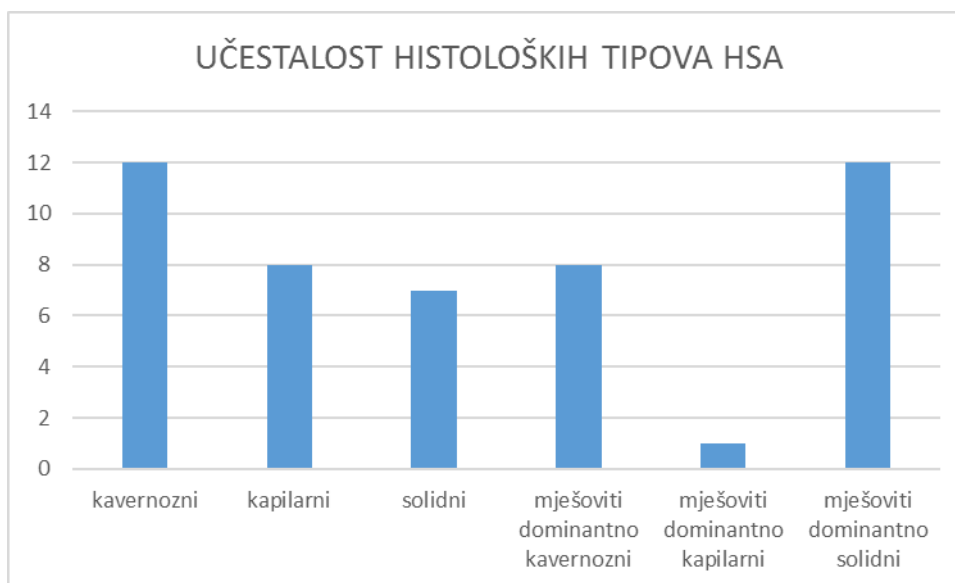
Tablica 3. Pojedinačni organi zahvaćeni sa HSA i histološki tip tumora kod pasa koji su bili živi u trenutku operacije i dijagnoze tumora.

<b>PASMINA</b>	<b>ORGAN</b>	<b>HISTOLOŠKI TIP HSA</b>
<b>križani</b>	slezena	kavernozni
<b>križani</b>	slezena	solidni>kavernozni
<b>križani</b>	slezena	solidni>kavernozni
<b>maltezer</b>	slezena	solidni>kavernozni
<b>NP</b>	slezena	solidni
<b>beagle</b>	slezena	solidni
<b>rodezijski gonič</b>	slezena	kapilarni
<b>labrador retriever</b>	slezena	solidni>kavernozni
<b>labrador retriever</b>	slezena	kapilarni
<b>akita inu</b>	slezena	kavernozni
<b>križani</b>	slezena	solidni>kavernozni
<b>križani</b>	slezena	kavernozni
<b>zlatni retriever</b>	slezena	solidni
<b>njemački ovčar</b>	slezena	solidni>kavernozni
<b>križani</b>	slezena	kapilarni
<b>stafordski terijer</b>	jetra	solidni
<b>križani</b>	omentum	solidni>kavernozni
<b>križani</b>	jetra	kavernozni

Organ koji je u najvećem broju slučajeva bio zahvaćen sa hemangiosarkomom je slezena (n = 23, 47,9%), a slijedili su jetra (n = 10, 20,8%) i desni atrij (n = 5, 10,4%). Pluća i omentum su bili zahvaćeni u 4 slučaja (8,3%), a mokraćni mjehur i bubreg u po jednom slučaju (2,0%). Gledajući zastupljenost histoloških tipova HSA ukupno u svim zahvaćenim organima, u 27 tumora (56,3%) utvrđen je jedan obrazac rasta, a najučestaliji tip HSA je bio kavernozni (n = 12, 25%). Mješoviti tipovi tumora sa pojavom dva ili sva tri obrasca rasta utvrđeni su u 21 tumoru (43,7%), a najčešći su bili tipovi sa dominacijom solidnog i kavernoznog obrasca rasta. Zahvaćenost pojedinih organa sa HSA i učestalost pojedinih histoloških tipova HSA ukupno u svim organima prikazani su na slikama 2. i 3.



Slika 2. Organi zahvaćeni sa hemangiosarkomom.



Slika 3. Učestalost pojedinih histoloških tipova HSA ukupno u svim organima.

Što se tiče učestalosti pojedinih histoloških tipova HSA u pojedinim organima, najučestaliji tipovi HSA u slezeni su bili kavernozni (slika 6.) i solidni (slika 7.) ( $n = 4$ , 17,4% svaki), dok je kapilarni tip utvrđen u tri slučaja (13%) (slika 8.). Mješoviti tipovi HSA u slezeni su činili ukupno 52,2%, a najučestaliji je bio mješoviti dominantno solidni tip HSA ( $n = 9$ , 39,1%). Učestalost pojedinih histoloških tipova HSA u slezeni prikazana je na slici 4.





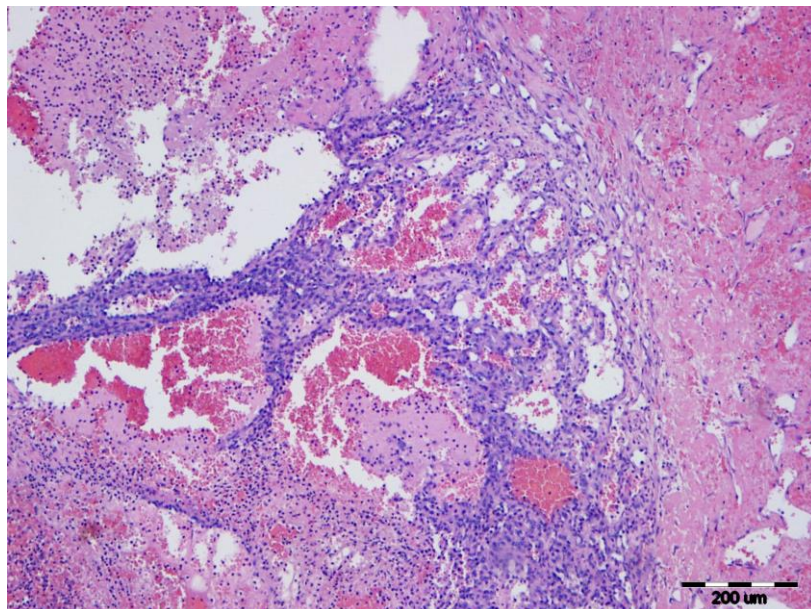
Slika 4. Učestalost pojedinih histoloških tipova HSA u slezeni.

Najučestaliji tipovi HSA u jetri su bili kavernozni i kapilarni (n = 3, 30 % svaki); solidni tip HSA u jetri je utvrđen u dva slučaja (20%), dok su mješoviti tipovi utvrđeni također u 20% slučajeva i to kao dominantni kavernozni tip. Učestalost pojedinih histoloških tipova HSA u jetri prikazana je na slici 5.

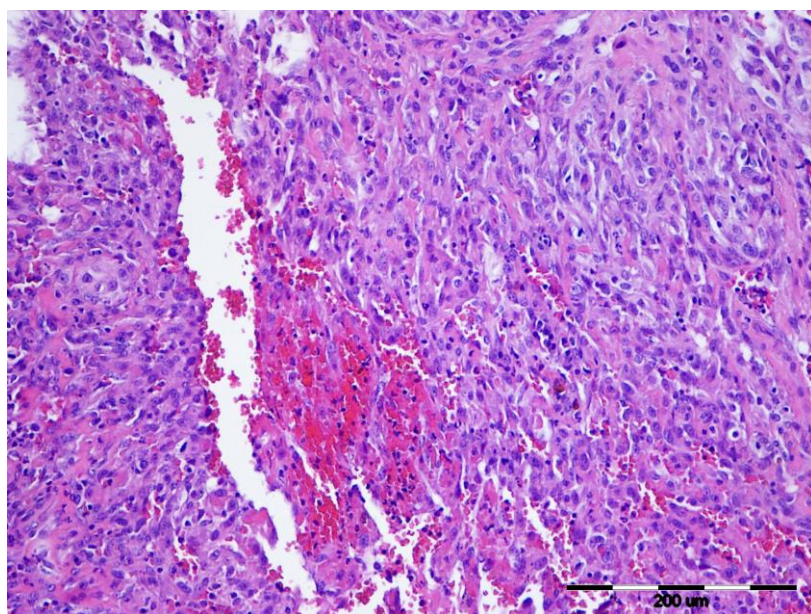


Slika 5. Učestalost pojedinih histoloških tipova HSA u jetri.

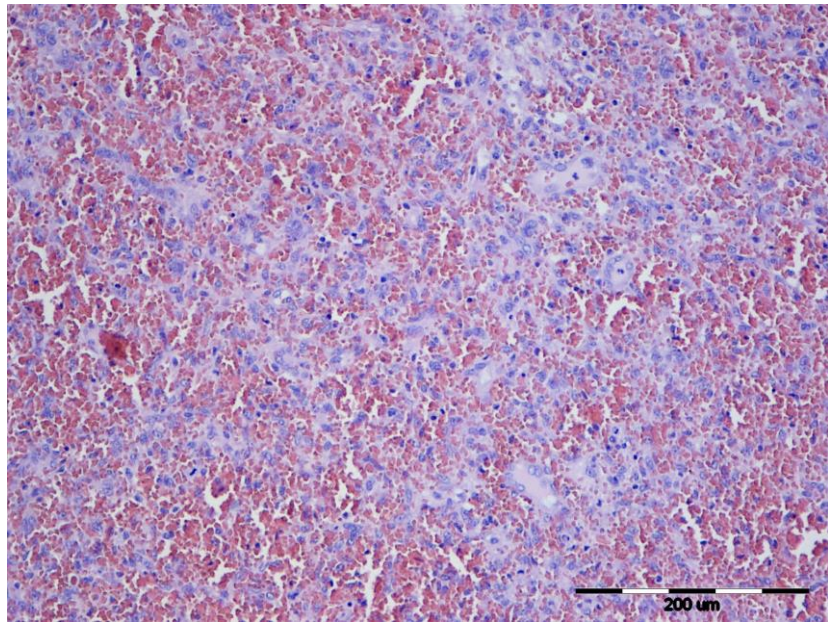
U desnom atriju su utvrđeni pretežno mješoviti tipovi HSA, a u omentumu pretežno pojedinačni tipovi i to kavernozni, no zbog malog broja uzoraka ovih tumora, oni nisu dalje obrađivani.



Slika 6. Slezena, kavernozni obrazac rasta HSA. HE x 10.



Slika 7. Slezena, solidni obrazac rasta HSA. HE x 20.

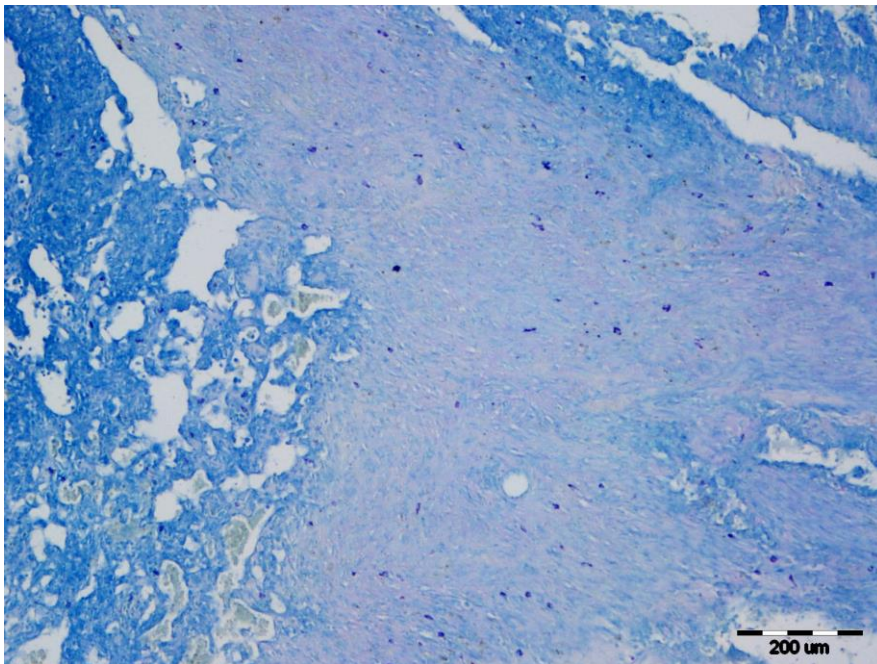


Slika 8. Slezena, kapilarni obrazac rasta HSA. HE x 10.

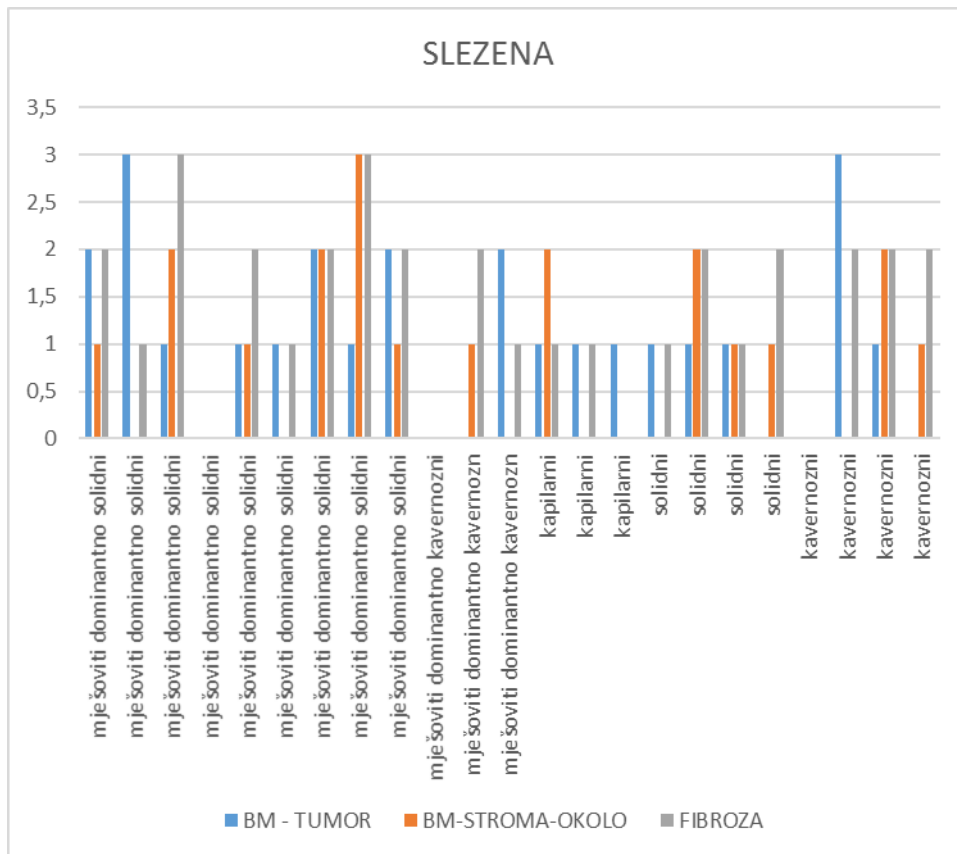


## BROJ MASTOCITA U HEMANGIOSARKOMIMA

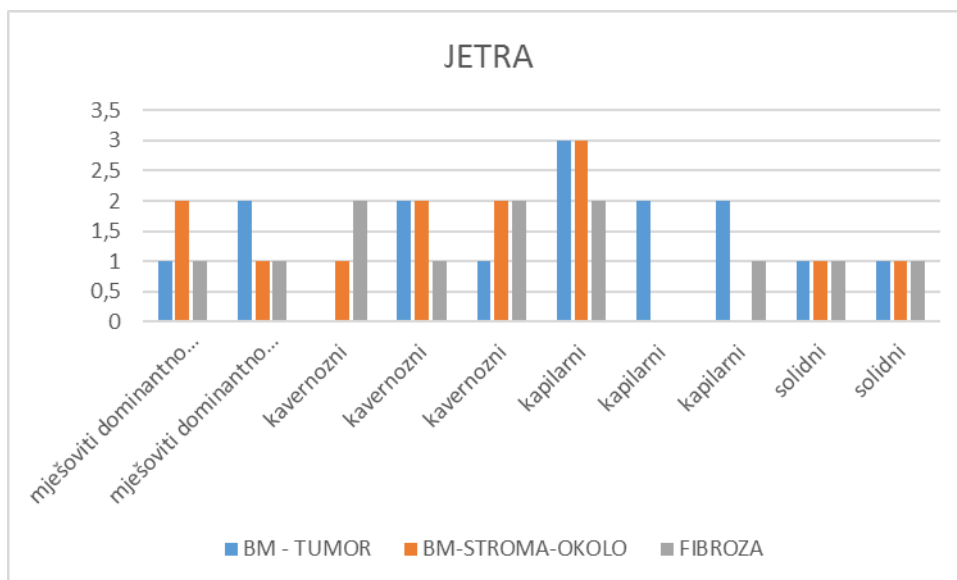
Od ukupno 48 uzoraka tumora, mastociti su utvrđeni u 42 tumora (87,5%). U samom parenhimu tumora (između tumorskih stanica), u svim zahvaćenim organima broj mastocita je bio najmanji, a veći broj mastocita je uočen u stromi tumora te mjestimice na periferiji tumora (slika 9.). Gledajući organe zahvaćene tumorom, veći broj mastocita u samom parenhimu tumora te u stromi i okolini tumora je utvrđen u jetri, omentumu i desnom atriju, a manje u slezeni. Stupanj razvijenosti strome odnosno stupanj fibroze tumora je bio jače izražen u omentumu i desnom atriju, podjednak u jetri i slezeni, a najslabiji u plućima. Odnos broja mastocita u parenhimu tumora, stromi i okolini (rubnim dijelovima) tumora te stupanj fibroze za svaki pojedini zahvaćeni organ prikazani su na slikama 10.-14.



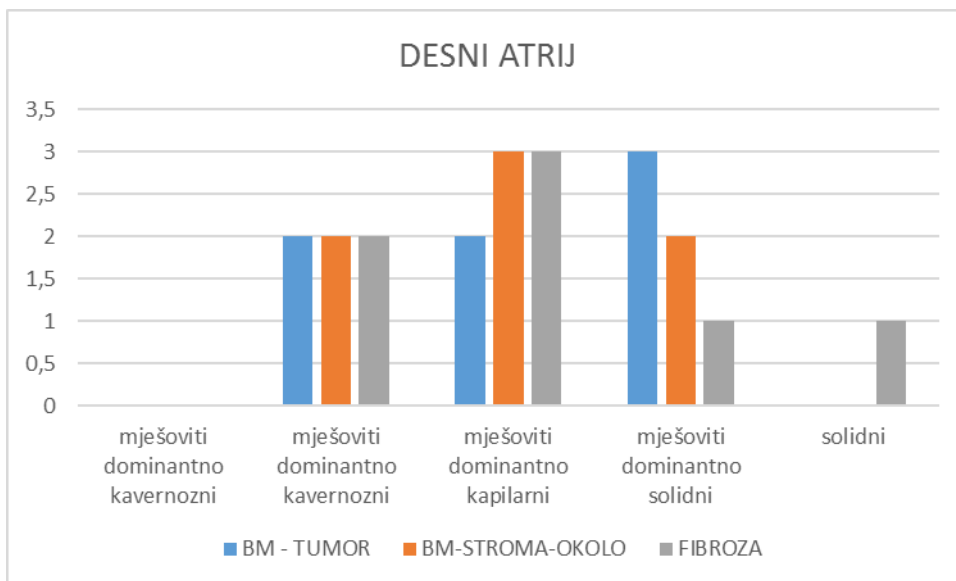
Slika 9. Slezena, veći broj mastocita u stromi tumora. Toluidin x 10.



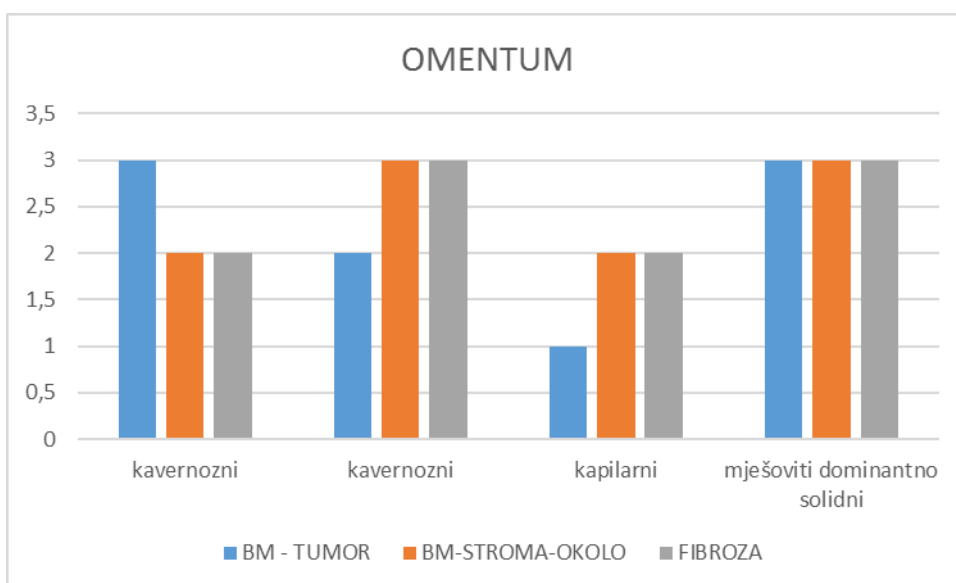
Slika 10. Odnos broja mastocita u samom parenhimu HSA (tumor), stromi i okolini tumora te fibroze u slezeni. (*BM – broj mastocita*).



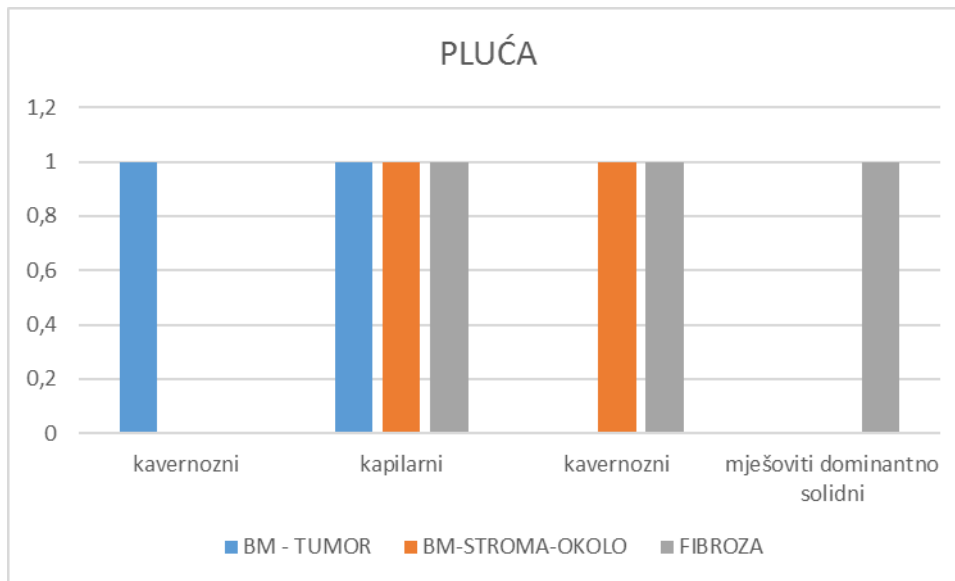
Slika 11. Odnos broja mastocita u samom parenhimu HSA (tumor), stromi i okolini tumora te fibroze u jetri.



Slika 12. Odnos broja mastocita u samom parenhimu HSA (tumor), stromi i okolini tumora te fibroze u desnom atriju.



Slika 13. Odnos broja mastocita u samom parenhimu HSA (tumor), stromi i okolini tumora te fibroze u omentumu.



Slika 14. Odnos broja mastocita u samom parenhimu HSA (tumor), stromi i okolini tumora te fibroze u plućima.

Statistička obrada rezultata u svrhu utvrđivanja povezanosti između broja mastocita i histološkog tipa tumora te broja mastocita i razvijenosti strome odnosno fibroze u tumorima, zbog malog broja uzoraka nije provedena za jetru, omentum, pluća i desni atrij, već su obrađeni svi uzorci ukupno, a jedino je slezena zbog većeg broja uzoraka dodatno obrađena i zasebno. Statistički nije utvrđena značajna povezanost između broja mastocita i histološkog tipa odnosno obrasca rasta HSA niti u slezeni, niti u svim organima ukupno. Statistički je utvrđena značajna povezanost između većeg broja mastocita u stromi i okolini tumora te višeg stupnja fibroze u slezeni ( $p=0,002$ ) i svim tumorima ukupno ( $p=0,000001$ ).

## 5. RASPRAVA

Rezultati ranijih studija vezanih uz distribuciju dobi i pasmina pasa oboljelih od hemangiosarkoma (SABATTINI i BETTINI, 2009., GÖRITZ i sur., 2013.) još jednom su potvrđeni i ovim istraživanjem, gdje je u populaciji od 31 psa prosječna dob oboljelih pasa iznosila 10 godina. Najčešća pasmina kod koje su utvrđeni HSA je bila križana, a zatim njemački ovčar i labrador retriever. Nešto veći broj pasa križane pasmine u našem istraživanju vjerojatno je posljedica veće zastupljenosti ove pasmine u populaciji pasa u Republici Hrvatskoj.

Organ koji je najčešće bio zahvaćen sa HSA je slezena (47,9%) što je također u skladu s ranijim istraživanjima (BOSTON i sur., 2011., GÖRITZ i sur., 2013., LINDER, 2017.) i ukazuje na veliku vjerojatnost da su visceralni HSA primarni tumori slezene. Što se tiče histoloških tipova odnosno obrazaca rasta HSA, u istraživanju GÖRITZ i sur., 2013. je dominirala visoka histološka heterogenost ovih tumora. U našem istraživanju su neznatno dominirali pojedinačni obrasci rasta (56,3%) sa kavernoznim tipom rasta kao najčešćim, dok su mješoviti tipovi utvrđeni u 43,7% tumora. Ovakav relativno visoki postotak mješovitog obrasca rasta govori u prilog tome da su HSA histološki heterogeni tumori što ima i dijagnostički značaj, naročito kod kavernoznih tipova tumora koji se ne smiju zamijeniti sa hemangiomom ili hematomom te kod kapilarnih tipova koji se ne smiju zamijeniti za granulacijsko tkivo (GÖRITZ i sur., 2013.).

SABATTINI i BETTINI, 2009. su u svom istraživanju koje je uključivalo 40 HSA od čega 29 visceralnih, utvrdili mali do osrednji broj mastocita u 10 tumora, dok u 72,5% tumora nisu uočili MC. Za razliku od njih, u našem istraživanju su MC utvrđeni u znatno većem broju tumora i to u 42/48 (87,5%). Navedeni autori nisu precizirali distribuciju mastocita u HSA. U našem istraživanju, manji broj mastocita je utvrđen u parenhimu tumora, dok je veći broj utvrđen u stromi i na periferiji pojedinih tumora. Ovakav nalaz je sličan nalazu SCHULTHEISS, 2004. koja je također utvrdila infiltraciju mastocita u malom broju HSA (16/ 76), ali je akumulacija MC bila najveća u stromi tumora. Naš nalaz sličniji je distribuciji MC kod kutanih hemangioma i hemangiosarkoma koju su utvrdili WOLDEMESKEL i RAJEEV, 2010. Isti autori utvrdili su veći broj MC u kutanim HSA i adenokarcinomima mliječne žlijezde nego u



kutanim hemangiomima i adenomima mliječne žlijezde te sugerirali da broj MC u tumorima raste sa malignošću. Osim toga, veći broj mastocita u hemangiomima i HSA nego u tumorima mliječne žlijezde, sugerira da su mastociti brojniji u vaskularnim neoplazijama (WOLDEMESKEL i RAJEEV, 2010.).

U našem istraživanju nije utvrđena značajna povezanost između broja mastocita i histološkog tipa odnosno obrasca rasta HSA niti u slezeni, niti u svim organima ukupno. Prisutnost mastocita u HSA također nije bila povezana sa stupnjem diferencijacije, mitotskim indeksom niti drugim istraživanim parametrima niti u istraživanju SCHULTHEISS, 2004. Međutim, u našem istraživanju je utvrđena značajna povezanost između većeg broja mastocita u stromi i okolini tumora te višeg stupnja fibroze u slezeni ( $p=0,002$ ) i svim tumorima ukupno ( $p=0,000001$ ). Moguće je da mikrokoliš i stromalne komponentne variraju u različitim tkivima i imaju utjecaj na rast neoplastičnih i ne-neoplastičnih stanica i na infiltraciju mastocita u takva područja. Neki autori sugeriraju da u određenim tumorima broj malih krvnih žila i broj mastocita mogu biti povezani sa stromalnim komponentama pa posljedično, tumori sa više strome možda imaju razvijeniju mikrocirkulaciju i više mastocita (ELPEK i sur., 2001.). S druge strane, poznato je da se mastociti tijekom proliferativne faze cijeljenja infarkta miokarda, nakupljaju u području infarkta i moguće reguliraju depoziciju fibroznog tkiva i angiogenezu lučeći čimbenike rasta, angiogene čimbenike i proteaze (FRANGOIANNIS i ENTMAN, 2006.). Stoga nije isključeno da i u tumorima, osim što vjerojatno utječu na angiogenezu, mastociti možda potiču i stvaranje strome.

Sama spoznaja o broju mastocita u visceralnim HSA ima još jedan dijagnostički značaj. Naime, u slučaju punkcije tumora i citološke pretrage, moguće je da se u uzorku nađe samo krv pomiješana sa manjim brojem mastocita. U tom slučaju se nalaz mastocita ne smije zamijeniti za mastocitom (SCHULTHEISS, 2004.).

Razvidno je da mastociti mogu biti prisutni u visceralnim HSA u većem broju i da imaju određenu ulogu u patogenezi hemangiosarkoma. Rezultati dosadašnjih studija, uključujući i našu, ukazuju na potrebu daljnjih istraživanja njihove uloge i čimbenika koje otpuštaju u razvoju i progresiji tumora.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Visceralni hemangiosarkomi najčešće su se pojavljivali kod starijih pasa (prosječne starosti 10 godina). Najčešće zahvaćene pasmine su bile križana, njemački ovčar i labrador retriever.
2. Organ u kojem su najčešće utvrđeni hemangiosarkomi je slezena.
3. Najčešći histološki tip odnosno obrazac rasta HSA je bio kavernozni. Visoka zastupljenost dva ili sva tri obrasca rasta u jednom tumoru ukazuje na veliku histološku heterogenost visceralnih HSA.
4. Mastociti su utvrđeni u 87,5% visceralnih HSA. Manji broj mastocita infiltrira sam parenhim tumora, a veći broj se nalazi u stromi i okolini (rubnim dijelovima) tumora.
5. Broj mastocita u tumorima nije bio značajnije povezan sa histološkim tipom tumora što govori u prilog tome da mastociti nemaju utjecaj na morfologiju visceralnih HSA.
6. Broj mastocita u tumorima je bio značajno povezan sa obilnijom stromom odnosno višim stupnjem fibroze u slezeni ( $p=0,002$ ) i svim tumorima ukupno ( $p=0,000001$ ) što ukazuje na to da su mastociti povezani sa razvojem stromalnih komponenti u visceralnim HSA.

## 7. ZAHVALE

Zahvaljujemo mentorici izv. prof. dr. sc. Andrei Gudan Kurilj, DipIECVP na strpljenju, pomoći i vodstvu prilikom izrade ovog rada. Također, zahvaljujemo i doc. dr. sc. Ivanu-Conradu Šoštarić-Zuckermann na pomoći prilikom statističke obrade rezultata.

## 8. POPIS LITERATURE

ACKERMANN M. R. (2017): Inflammation and Healing. In: Pathologic Basis of Veterinary Disease. (Zachary J. F. Ed.). 6th edition. Elsevier. pp. 83-84.

AOKI, M., R. PAWANKAR, Y. NIIMI, S. KAWANA (2003). Mast cell in basal cell carcinoma expresses VEGF, IL-8 and RANTES. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 130: 216-223.

BOSTON, S. E., G. HIGGINS, G. MONTEITH (2011): Concurrent Splenic and Right Atrial Mass at Presentation in Dogs with HSA: A Retrospective Study. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 47(5): 336-341.

ELPEK, G. Ö., T. GELEN, N. H. AKSOY, A. ERDOGAN, L. DERTSIZ, A. DEMIRCAN, N. KELES (2001): The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J. Clin. Pathol.* 54: 940–944.

FRANGOIANNIS, N. G., M. L. ENTMAN (2006): Identification of Mast Cells in the Cellular Response to Myocardial Infarction. *Methods Mol. Biol.* 315: 91-101.

GÖRITZ, M., K. MÜLLER, D. KRASTEL, G. STAUDACHER, P. SCHMIDT, M. KÜHN, R. NICKEL, H.- A. SCHOON (2013): Canine Splenic Haemangiosarcoma: Influence of Metastases, Chemotherapy and Growth Pattern on Post-splenectomy Survival and Expression of Angiogenic Factors. *J. Comp. Path.* 149: 30-39.

HART, B. L., L. A. HART, A. P. THIGPEN, N. H. WILLITS (2014): Long-Term Health Effects of Neutering Dogs: Comparison of Labrador Retrievers with Golden Retrievers. *PLoS ONE* 9(7): e102241. doi:10.1371/journal.pone.0102241.

KIM, J. H., A. J. GRAEF, E. B. DICKERSON, J. F. MODIANO (2015): Pathobiology of Hemangiosarcoma in Dogs: Research Advances and Future Perspectives. *Vet. Sci.* 2: 388-405.

LINDER, K. E. (2017): Tumors of the Spleen. In: Tumors in Domestic Animals. (Meuten D. J., Ed.). Wiley Blackwell. pp. 309-314.

MALLINCKRODT, M. J., S. D. GOTTFRIED (2011): Mass-to-splenic volume ratio and splenic weight as a percentage of body weight in dogs with malignant and benign splenic masses: 65 cases (2007–2008). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 239(10): 1325-7.

MUKARATIRWA, S., L. CHIKAFU, R. DLIWAYO, N. MOYO (2006. a): Mast cells and angiogenesis in canine melanomas: malignancy and clinicopathological factors. *Vet Dermatol.* 17(2): 141-6.

MUKARATIRWA S, T. CHIWOME, S. CHITANGA, E. BHEBHE (2006. b): Canine transmissible venereal tumour: assessment of mast cell numbers as indicators of the growth phase. *Vet. Res. Commun.* 30(6): 613-21.

NAKAYAMA, T., L. YAO, G. TOSATO (2004): Mast Cell-derived angiopoietin-1 plays a critical role in the growth of plasma cell tumor. *J. Clin. Invest.* 114: 1317-1325.

PRYMAK, C., L. J. McKEE, M. H. GOLDSCHMIDT (1988): Epidemiologic, clinical, pathologic, and prognostic characteristics of splenic hemangiosarcoma and splenic hematoma in dogs: 217 cases (1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193: 706-712.

SABATTINI, S., G. BETTINI (2009): An Immunohistochemical Analysis of Canine Haemangioma and Haemangiosarcoma. *J. Comp. Pathol.* 140, 158-168.

SCHULTHEISS, P. C. (2004): A retrospective study of visceral and nonvisceral hemangiosarcoma and hemangiomas in domestic animals. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 522–526.

SPANGLER, W. L., P. H. KASS (1977): Pathologic Factors Affecting Postsplenectomy Survival in Dogs. *J. Vet. Int. Med.* 3: 166-171.

TOMITA, M., Y. MATSUZAKI, T. ONITSUKI (2000): Effect of mast cells on tumor angiogenesis in lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* 69: 1686-1690.

WENDELBURG, K. M., L. L. PRICE, K. E. BURGESS, J. A. LYONS, F. H. LEW, J. BERG (2015): Survival time of dogs with splenic hemangiosarcoma treated by

splenectomy with or without adjuvant chemotherapy: 208 cases (2001–2012). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 247(4): 393-403.

WOLDEMESKEL, M., E. MANN, L. WHITTINGTON (2014): Tumor microvessel density–associated mast cells in canine nodal lymphoma. *SAGE Open Med.* Doi: 10.1177/2050312114559575.

WOLDEMESKEL, M., S. RAJEEV (2010): Mast cells in canine cutaneous hemangioma, hemangiosarcoma and mammary tumors. *Vet. Res. Commun.* 34: 153–160.

WOOD, C. A., A. S. MOORE, J. M. GLIATTO, L. A. ABLIN, R. J. BERG, W. M. RAND (1998): Prognosis for Dogs with Stage I or II Splenic Hemangiosarcoma Treated by Splenectomy Alone: 32 Cases (1991–1993). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 34: 417-421.

## 9. SAŽETAK

Lucija Kanižaj i Sara Klobučar

### **Analiza morfologije tumora i broja mastocita u pasa sa hemangiosarkomom**

Hemangiosarkom (HSA) je maligna neoplazija karakterizirana agresivnim rastom, ranim metastaziranjem i nepovoljnom prognozom. Etiologija i patogeneza visceralnih hemangiosarkoma je vrlo slabo istražena, kao i potencijalna uloga mastocita u razvoju i progresiji ovih tumora.

U ovome radu napravljena je analiza visceralnih hemangiosarkoma iz arhive Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od ukupno 31 psa. Histološki se u preparatima obojenima hemalaun eozinom u tumorima određivao histološki tip odnosno obrazac rasta (kavernozni, kapilarni, solidni) te stupanj razvijenosti strome odnosno fibroze. Uzorci su dodatno bojeni toluidinskim modrilom u svrhu detekcije mastocita te je određivan njihov broj u parenhimu tumora te u stromi i okolini tumora. Najveći broj visceralnih HSA utvrđen je u slezeni. Prosječna dob oboljelih životinja je bila 10 godina, a dominirale su križana pasmina, njemački ovčar i labrador retriever. Najčešći histološki tip odnosno obrazac rasta HSA je bio kavernozni uz visoku zastupljenost dva ili sva tri obrasca rasta u jednom tumoru. Mastociti su utvrđeni u 87,5% visceralnih HSA. Manji broj mastocita je utvrđen u parenhimu tumora, a veći broj u stromi i okolini tumora. Broj mastocita u tumorima nije bio značajnije povezan sa histološkim tipom tumora, ali je bio značajno povezan sa obilnijom stromom odnosno višim stupnjem fibroze u slezeni ( $p=0,002$ ) i svim tumorima ukupno ( $p=0,000001$ ).

Ovi rezultati govore u prilog tome da mastociti nemaju utjecaj na morfologiju visceralnih HSA, ali su vjerojatno povezani sa razvojem stromalnih komponenti i svakako ukazuju na potrebu daljnjih istraživanja njihove uloge i čimbenika koje otpuštaju u razvoju i progresiji hemangiosarkoma.

Ključne riječi: pas, hemangiosarkom, mastociti, stroma

## 10. SUMMARY

Lucija Kanižaj and Sara Klobučar

### **Analysis of tumor morphology and mast cell count in canine hemangiosarcoma**

Hemangiosarcoma (HSA) is malignant neoplasia characterized by aggressive growth, early metastasis, and unfavorable prognosis. The etiology and pathogenesis of visceral hemangiosarcoma is poorly investigated as well as the potential role of mast cells in the development and progression of these tumors.

In this study, visceral hemangiosarcomas from the Department of Veterinary Pathology Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb were analyzed from a total of 31 dogs. Histologically in hemalaun eosin stained sections the histological type or growth pattern (cavernous, capillary, solid) and the level of stroma or fibrosis development was investigated. Additionally, sections were stained with toluidine blue for the purpose of mast cell detection and their number was determined in the tumor parenchyma, stroma and tumor edges. The highest number of visceral HSAs was found in the spleen. The average age of animals was 10 years, and dominant breeds were cross breeds, German Shepherd Dog and Labrador Retriever. The most common histological type or growth pattern of HSA was cavernous with high percentage of two or all three growth patterns in one tumor. Mast cells were found in 87.5% of visceral HSA. A smaller number of mast cells was found in the tumor parenchyma, and higher number was found in the stroma and tumor edges. The number of mast cells in tumors was not significantly associated with the histological type of tumor, but was significantly associated with more abundant stroma or higher degree of fibrosis in the splenic HSA ( $p = 0.002$ ) and total number of tumors ( $p = 0.000001$ ).

These results suggest that mast cells have no effect on the morphology of visceral HSA, but are probably associated with the development of stromal components and certainly point the need for further research on their role and the factors they release in the development and progression of hemangiosarcoma.

Key words: dog, hemangiosarcoma, mast cell, stroma