

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU VETERINARSKI FAKULTET
VETERINARSKI FAKULTET

Neven Lončarić

Istraživanje sastava intracitoplazmatskih granula u citološkim uzorcima pasa i mačaka

Znanstveni rad

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Marka Hohštetera i dr. sc. Lidije Medven Zagradišnik te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./2023.

POPIS KARTICA

HE - hematoksilin i eozin

MMS - monocitno-makrofagni sustav

nm - nanometar

Ig - imunoglobulin

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. MAKROFAGI.....	1
1.2. PIGMENTI.....	1
1.2.1. HEMOSIDERIN.....	2
1.2.2. MELANIN.....	2
1.2.3. ŽUČNI PIGMENTI.....	3
2. CILJ RADA I HIPOTEZA.....	4
2.1. SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....	4
3. MATERIJALI I METODE.....	5
3.1. ODABIR I PRIPREMA UZORAKA.....	5
3.2. MIKROSKOPSKA ANALIZA.....	6
3.3. STATISTIČKA ANALIZA.....	6
4. REZULTATI.....	7
5. RASPRAVA.....	14
6. ZAKLJUČCI.....	15
7. ZAHVALE.....	16
8. POPIS LITERATURE.....	17
9. SAŽETAK.....	19
10. SUMMARY.....	20
11. ŽIVOTOPIS.....	21

1. UVOD

Citološka pretraga česta je dijagnostička metoda koja se upotrebljava u dijagnostici različitih patoloških stanja u životinja. Citološkom pretragom se u uzorcima često uočavaju intra- i ekstracitoplazmatske pigmentne granule čiji je sastav i porijeklo teško izdiferencirati (RASKIN, 2016.). Morfološki čest oblik granula su smeđe intracitoplazmatske granule u stanicama ovalnog, poligonalnog do vretenastog oblika čije porijeklo tj. kemijski sastav na standardnom citološkom preparatu upotrebom rutinskih citoloških metoda bojenja nije moguće odrediti. Identičan izgled mogu imati granule bilirubinskog, hemosiderinskog ili melaninskog sastava. Zbog ovog ograničenja je često nemoguće odrediti radi li se o makrofazima ili tumorskim stanicama koje u sebi sadrže melaninski pigment (FRENCH i sur., 2008.). Stoga postoji potreba za uspostavljanjem standardnih protokola kojima bi se dijagnostika lezija u kojima se uočavaju pigmenti učinila točnijom i pouzdanijom.

1.1. MAKROFAGI

Makrofagi su stanice mijeloidne loze, specijalizirane za fagocitozu, a također luče i odgovaraju na citokine i kemokine tijekom upalnog odgovora (WYNN i sur., 2013.). Fagocitozom makrofagi u svoju citoplazmu unose mikroorganizme, strane proteine i krute strane čestice kako bi od njih zaštitili organizam. Makrofagi se dijele u 2 skupine: fiksni tkivni makrofagi i slobodni tkivni makrofagi (KOZARIĆ, 1997.). Makrofagi crvene pulpe slezene fagocitiraju eritrocite i recikliraju hem za održavanje homeostaze željeza (CHOW i sur., 2013.). Alveolarni makrofagi od iznimne su važnosti u fagocitozi sitnih inhaliranih čestica koje dolaze u dodir s plućnim alveolama (BERRY i sur., 1997.). Makrofagi peritonealne šupljine reguliraju proizvodnju crijevnog imunoglobulina (Ig) A interakcijom s peritonealnim B1 stanicama (OKABE i MEDZHITOV, 2014.). Kupfferove stanice jetre su jedna od najbitnijih linija obrane od patogena koji portalnim krvotokom ulaze u jetru iz gastrointestinalnog trakta. Također su vrlo bitne u uklanjanju ostarjelih eritrocita i stanica jetrenog parenhima (DIXON i sur., 2013.). Obavljanjem prethodno navedenih funkcija, sve vrste makrofaga unutar svoje citoplazme u obliku intracitoplazmatskih granula nakupljaju različite pigmente.

1.2. PIGMENTI

Pigmenti su definirani kao supstance koje se javljaju u živoj materiji te absorbiraju vidljivu svjetlost odnosno elektromagnetsko zračenje valnih duljina između 400 i 800 nm.

Uvelike se razlikuju podrijetlom, kemijskom strukturom i biološkim značajkama (SUVARNA i sur., 2019.). Neki od njih su normalne komponente stanica dok su drugi u njima nakupljaju u patološkim okolnostima. S obzirom na njihovo podrijetlo, pigmenti se dijele na endogene, koje je stvorio sam organizam i egzogene, koji su u organizam ušli izvana (KUMAR i sur., 2020.).

1.2.1. HEMOSIDERIN

Najčešći oblik željeza koji se pojavljuje u citološkim uzorcima je hemosiderin (RADAKOVICH i OLVER, 2016.). Hemosiderin je zlatno-smeđi do crni pigment, nastao iz feritina, primarnog skladišnog oblika željeza (VAN WETTERE i BROWN, 2022.). U normalnim uvjetima hemosiderin nalazimo u slezeni, koštanoj srži, epitelu sluznice crijeva, a u starijih životinja (prvenstveno konja i ptica) može ga se naći u Kupferovim stanicama. U patološkim uvjetima hemosiderinska pigmentacija je uočljiva kao opća generalizirana pojava kao posljedica obilnog raspada eritrocita u krvotoku u organima u kojima postoje stanice MMS-a (GRABAREVIĆ, 1993.). Najčešće se uočava intracitoplazmatski unutar makrofaga, kod lezija kod kojih se pojavljuju krvarenja osobito ako su kroničnijeg tijeka. Nije rijetkost da se unutar makrofaga nalaze fagocitirani eritrociti zajedno s hemosiderinom. Također može biti uočljiv i u slobodnom obliku tj. izvan makrofaga.

Determinacija hemosiderina tj. diferencijacija od ostalih neželjeznih pigmenata sličnog izgleda najuspješnije se provodi bojanjem citoloških i histoloških uzoraka pruskim modrilom. To je specifična histokemijska metoda vrlo visoke osjetljivosti kojom se mogu detektirati vrlo male količine željeza (hemosiderina) u uzorku. Postupak je jednostavan i sastoji se od dodavanja klorovodične kiseline na nebojano ili prethodno obojeno stakalce kako bi se denaturirali proteini koji vežu željezo. Zatim se dodaje otopina kalij ferocijanida koji se veže na molekule feri željeza (Fe^{3+}), što rezultira netopljivim plavim pigmentom. Zatim se koristi crvena kontraboja za vizualizaciju drugih staničnih elemenata kao što su jezgre i citoplazma. Prisutno željezo vizualizira se kao jarko plavi pigment (RADAKOVICH i OLVER, 2017.).

1.2.2. MELANIN

Melanin je žuto-smeđi do smeđe-crni pigment koji se tipično nalazi unutar stanica bazalnog epitela kože, kose i substancii nigra mozga (DEY, 2022.). Njegova biosinteza vezana je uz oksidaciju tirozina enzimom tirozinazom (RILEY, 1997.). Vrlo je čest nalaz u raznim citološkim uzorcima uključujući melanome, tumore bazalnog sloja epidermisa i limfne čvorove

koji dreniraju jako pigmentirana područja. Melaninske granule unutar epitelnih stanica su uniformne, štapićastog oblika i zelene, smeđe ili žute boje. Kada melanina ima u izobilju makrofagi ga često fagocitiraju, a on se citološki uočava kao globularni zeleni do smeđe-crni intracitoplazmatski materijal. Razlikovanje melanofaga tj. makrofaga bogatih melaninom od melanocita temelji se na globularnoj prirodi citoplazmatskog melanina zbog njegovog upakiravanja u lizosome makrofaga. S druge strane, melanomakrofage je vrlo teško razlikovati od makrofaga bogatih hemosiderinom rutinskim citološkim bojanjem. Korištenjem pruskog modrila melanin se ne boji pozitivno tj. modro što je jedan od najboljih načina za razlikovanje globularnog melanina od hemosiderina u citološkim uzorcima (RADAKOVICH i OLVER, 2017.)

1.2.3. ŽUČNI PIGMENTI

Žučni pigmenti nastaju normalno iz hemoglobina uz uvjet da je jetra zdrava i da može obavljati normalnu preradu hemoglobina. U žučne boje ubrajaju se biliverdin (zeleni pigment) i bilirubin (žutosmeđi pigment). Biliverdin je prvi dok je bilirubin krajnji produkt razgradnje hema. Ovisno o vezanosti za albumine bilirubin može biti konjugirani ili nekonjugirani (KUMAR i sur., 2020.). U fiziološkim uvjetima dvije trećine žučnih boja stvara se u Kupfferovim stanicama jetre, a preostala trećina u ostalim organima, gdje ima stanica MMS-a (GRABAREVIĆ, 1993.). Prekomjerno nakupljanje žučnih pigmenta javlja se kao posljedica intrahepatične i ekstrahepatične kolestaze zbog koje dolazi do ikterusa i pojave zelenih diskoloracija po jetri (VAN WETTERE i BROWN, 2022.). Citološki i histološki vidljiva je ekstravazacija žučnih pigmenta zbog puknuća žučnih kanalića i njihovu fagocitozu od strane Kupfferovih stanica. (KUMAR i sur., 2020.).

2. CILJ RADA I HIPOTEZA

Ovim istraživanjem se u arhivskim citološkim uzorcima u kojima su ustanovljene prije opisane intracitoplazmatske pigmentne granule nastojao utvrditi njihov sastav pomoću specifične metode bojenja (prusko modrilo).

Hipoteza istraživanja je bila da je upotreba pruskog modrila na odbojanim citološkim uzorcima prethodno obojanim Giemsa metodom, korisna za objektivno razlikovanje sastava intracitoplazmatskih granula.

Cilj istraživanja je bio uspostavljanje metoda i kriterija diferencijacije intracitoplazmatskih granula u citološkim uzorcima kako bi se poboljšala točnost citološke dijagnostike te samim time pridonijelo boljem liječenju i postavljanju prognoze.

2.1. SPECIFIČNI CILJEVI RADA

1. Diferencijalno dijagnostički razlikovati sastav smeđih intracitoplazmatskih granula bojanjem pruskim modrilom.
2. Usporediti citološke uzorke s patohistološkim preparatima istih lezija obojenih pruskim modrilom radi veće sigurnosti i potvrde dijagnoze.
3. Uvidjeti razliku između hemosiderofaga i tumorskih stanica ispunjenih melaninom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ODABIR I PRIPREMA UZORAKA

Prvi dio istraživanja proveden je pretragom Issa baze podataka Zavoda za veterinarsku patologiju (ZVP), Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu s ciljem pronalaska pacijenata kod kojih je učinjena citološka pretraga uzoraka koji u svome opisu tj. nalazu moraju sadržavati ključne riječi „smeđe granule“ i „intracitoplazmatske granule“. Pronađeno je 72 pacijenta kod kojih je utvrđena pojava smeđih intracitoplazmatskih granula dijagnosticiranih u razdoblju od 1. siječnja 2013. do 31. prosinca 2022. godine. Od prethodno navedenog broja za daljnju analizu je odabrano 26 uzoraka koji su imali barem jedan duplikat zbog obveze ZVP za čuvanjem određenog minimalnog broja uzoraka. Osim navedenih parametara, prikupljeni su podatci o vrsti životinje, uzorkovanom organu i citološkoj dijagnozi. Za 22 od 26 slučajeva je ustanovljeno da je provedena i patohistološka pretraga te su njeni rezultati uspoređivani s rezultatima citološke pretrage. Iz arhive ZVP su izvađeni prethodno spomenuti citološki uzorci te pripadajući parafinski blokovi.

Citološki preparati iz Arhive su bili obojeni standardnom Giemsa metodom pa ih je bilo potrebno odbojati prije bojenja pruskim modrilom. Odbojavanje je provedeno rehidracijom uzoraka u padajućim koncentracijama alkohola (100% i 95%), a nakon toga uranjanjem u kiseli alkohol nekoliko sekundi (dok uzorak ne izgubi boju). Odabrani parafinski blokovi rezani su mikrotomom na debljinu 5 μm te su zatim dobiveni rezovi deparafinizirani u ksilolu i dehidrirani u rastućem nizu etanola. Odbojani citološki uzorci i narezani patohistološki uzorci su zatim obojeni pruskim modrilom. Bojanje citoloških i patohistoloških preparata pruskim modrilom provedeno je korištenjem kita ab150674 tvrtke Abcam. Ono podrazumijeva miješanje otopine natrijevog ferocijanida i klorovodične kiseline u omjeru 1:1 kako bi se dobila potrebna radna otopina. Zatim se stakalca urone u radnu otopinu 3 minute. Nakon uranjanja slijedi temeljito ispiranje destiliranom vodom. Potom je stakalca potrebno uroniti u nuclear fast red otopinu. Slijedi dehidriranje preparata u 95 %-tnom, a odmah zatim i u 100 %-tnom etanolu. Na kraju se stakalca ispiru četiri puta za redom destiliranom vodom i ostave sušiti na zraku. Citološki uzorci nisu pokriveni dok su histološki uzorci pokriveni pokrovnim stakalcima.

3.2. MIKROSKOPSKA ANALIZA

Odabrani citološki i histopatološki preparati su pregledavani pomoću Olympus CX23 mikroskopa na različitim povećanjima (40x-400x) pod nadzorom mentora. Preparati su prvo pregledani u izvornom obliku (Giemsa i HE bojani preparati), a zatim nakon bojenja pruskim modrilom. Analizirani su slijedeći parametri: prisutnost intracitoplazmatskih smeđih granula unutar stanica te njihov sastav (melanin, žučni pigmenti ili hemosiderin).

Određivanje vrste pigmenta nakon bojenja pruskim modrilom provedeno je prema određenim pravilima:

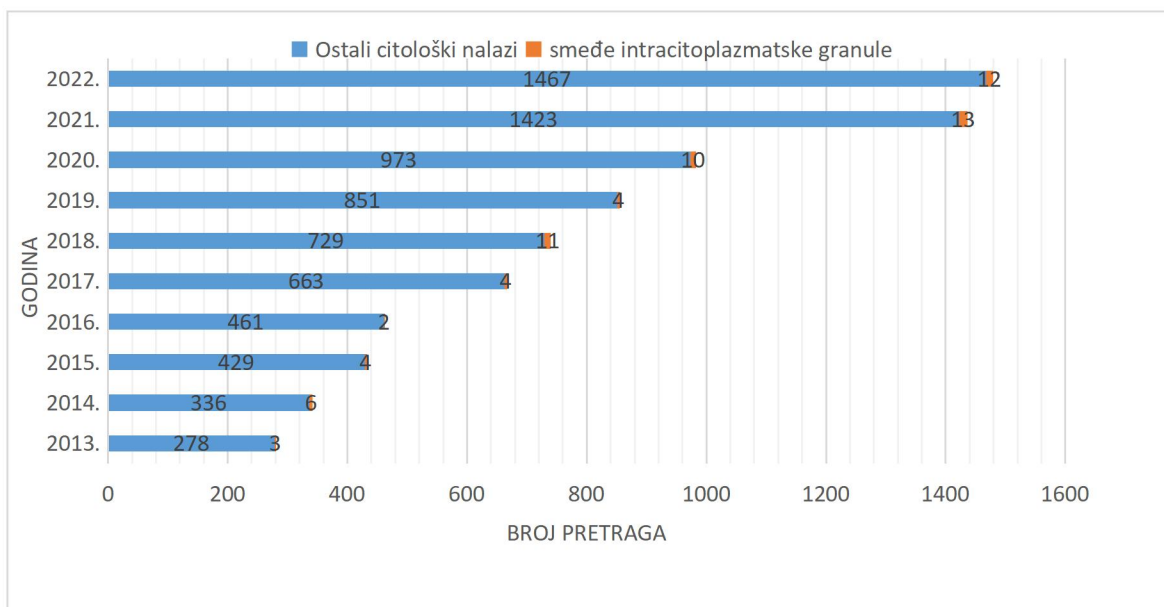
1. Granule pozitivne na prusko modriilo neovisno o tkivu su ocijenjene kao hemosiderinski pigment
2. Granule u uzorcima kože koje su bile negativne na prusko modriilo su svrstane u melaninski pigment
3. Granule u uzorcima jetre koje su bile negativne na prusko modriilo su svrstane u žučne pigmente.

3.3. STATISTIČKA ANALIZA

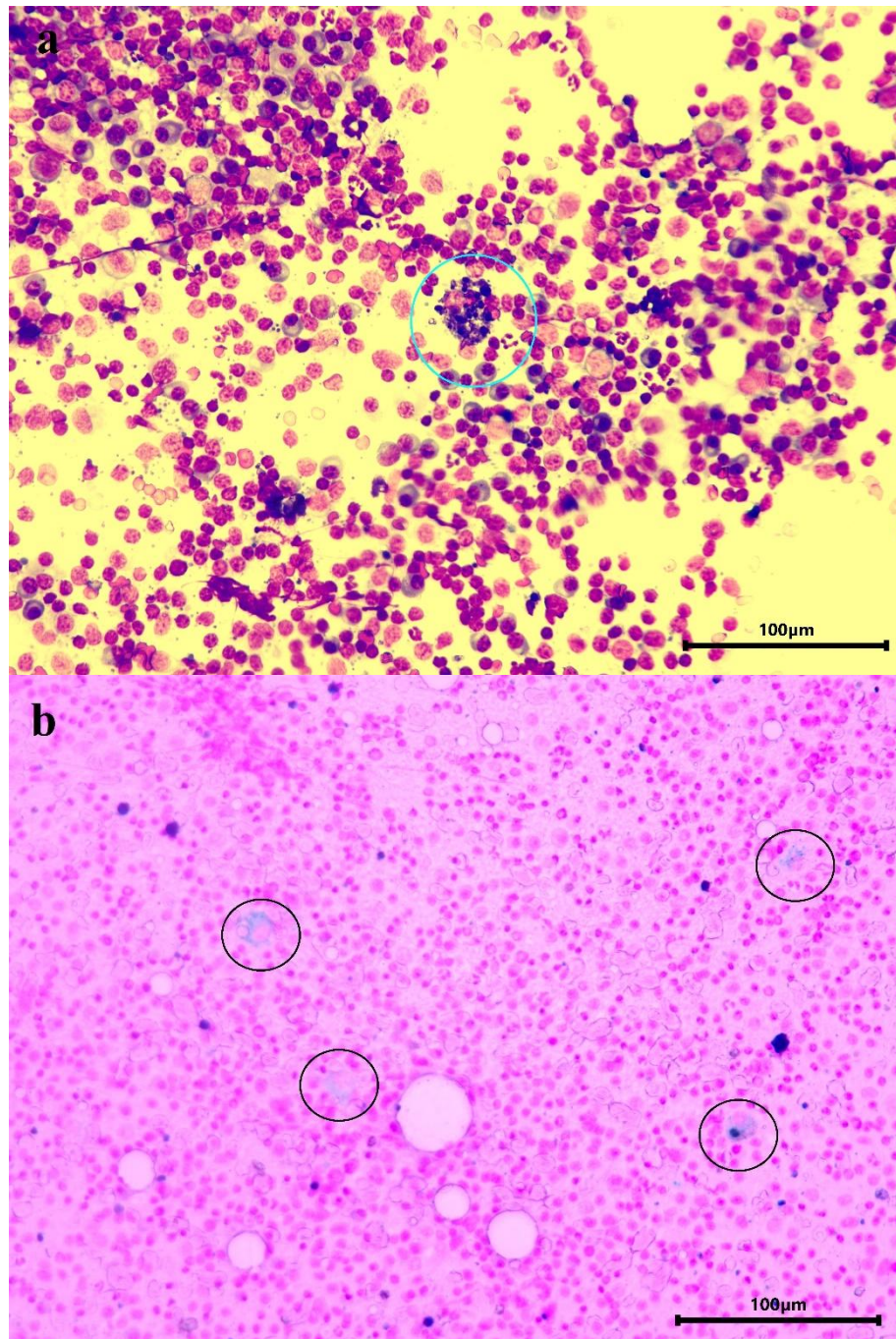
Dobiveni podaci su obrađeni pomoću Excell računalnog programa.

4. REZULTATI

Provedbom ovog istraživanja ustanovljeno je da je u periodu od 1. siječnja 2013. do 31. prosinca 2022. pregledano 7667 citoloških uzoraka. U 72 jedinice (0.93 %) utvrđena je pojavnost smeđih intracitoplazmatskih granula. Tijekom istraživanog perioda broj uzoraka s utvrđenim intracitoplazmatskim granulama je varirao od 3 uzorka 2013. godine do 13 uzoraka 2021. godine (Grafikon 1). Od 72 uzorka 26 ih je obojano pruskim modrilom te je 21 (80.8%) od 26 uzoraka bio pozitivan dok je 5 (19.2%) uzoraka bilo negativno na ovu metodu bojenja.



Grafikon 1. Prikaz broja dijagnosticiranih smeđih intracitoplazmatskih granula po godinama u odnosu na ostale citološke nalaze. Narandžasta boja prikazuje broj dijagnosticiranih smeđih intracitoplazmatskih granula po godini, a plava broj ostalih citoloških nalaza u godini.



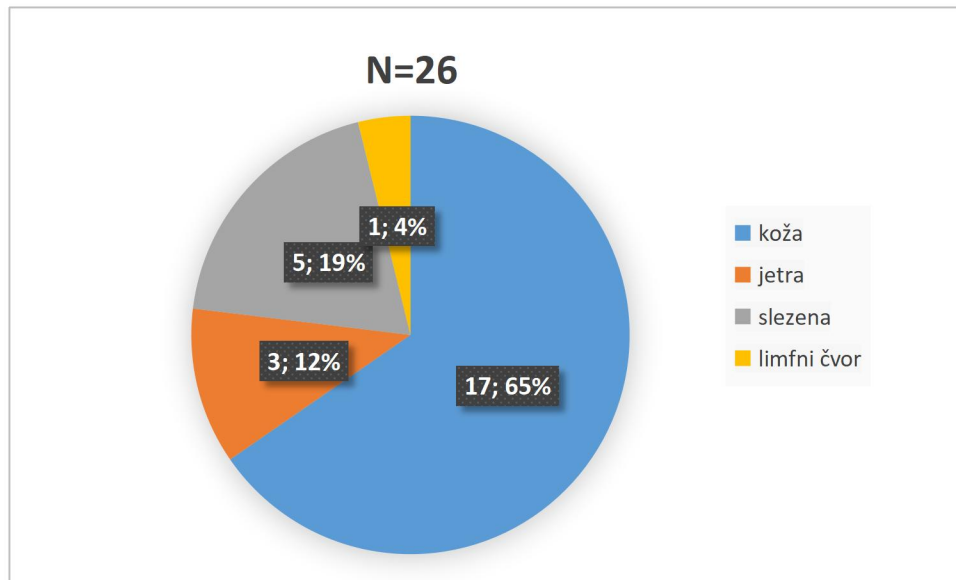
Slika 1. Usporedba klasičnog bojanja citološkog uzorka limfnog čvora po Giemsi (slika a) s bojanjem Pruskim modrilom (slika b). 400x povećanje. a) Makrofag koji sadrži intracitoplazmatske granule (zaokružen plavo). b) Makrofazi s granulama pozitivnim na Prusko modrilo (zaokruženi crno).

VRSTA

U istraživanje su bile uključene 2 vrste životinja, psi i mačke. Broj pasa bio je 24, dok je broj mačaka bio 2. Uzorci su birani prema prethodno navedenim kriterijima (vidi Odabir i priprema uzoraka).

ANATOMSKA LOKACIJA, POSTOJANJE SMEĐIH INTRACITOPLAZMATSKIH GRANULA I DIJAGNOZA

Smeđe intracitoplazmatske granule makrofaga dijagnosticirane su u uzorcima kože, jetre, slezene te limfnom čvoru (grafikon 2). Koža je organ koji je bio zastupljen s najviše uzoraka 68% (N=17). U 41.2% (N=7) uzoraka nije utvrđena dijagnoza, u 29.4% (N=5) uzoraka je postavljena dijagnoza melanocitne neoplazije, 17,6% (N=3) neoplazija epitelnog porijekla dok je 5.9% (N=1) uzoraka bilo bez promijena. Od ovih uzoraka 29.4%(N=5) je bilo negativno na prusko modrilo, od kojih su 3 uzorka još sadržavala i melaninski pigment. Na prusko modrilo je bilo pozitivno 70.6% (N=12) uzoraka, a od tih uzoraka je 91.6% (N=11) još sadržavalo i drugi smeđi pigment koji je zbog toga i lokalizacije bio identificiran kao melanin (slika 2.). Kod svih uzoraka slezene (N=5) reakcija na prusko modrilo bila je pozitivna. U 20% (N=1) uzoraka slezene postavljena je dijagnoza krvarenja dok je 80% (N=4) uzoraka slezene bilo bez promjena. Svi uzorci jetre (N=3) su bili pozitivni na prusko modrilo, ali su također sadržavali i drugi smeđi pigment koji je identificiran kao žučni pigment. U jednom uzorku jetre dijagnosticirana je mikrovakuolarna degeneracija, u drugom krvarenje dok je treći uzorak bio bez promjena. U uzorku limfnog čvora utvrđena je pozitivna reakcija na prusko modrilo, a postavljena dijagnoza odgovarala je reaktivnoj hiperplaziji limfnog čvora (slika 1).

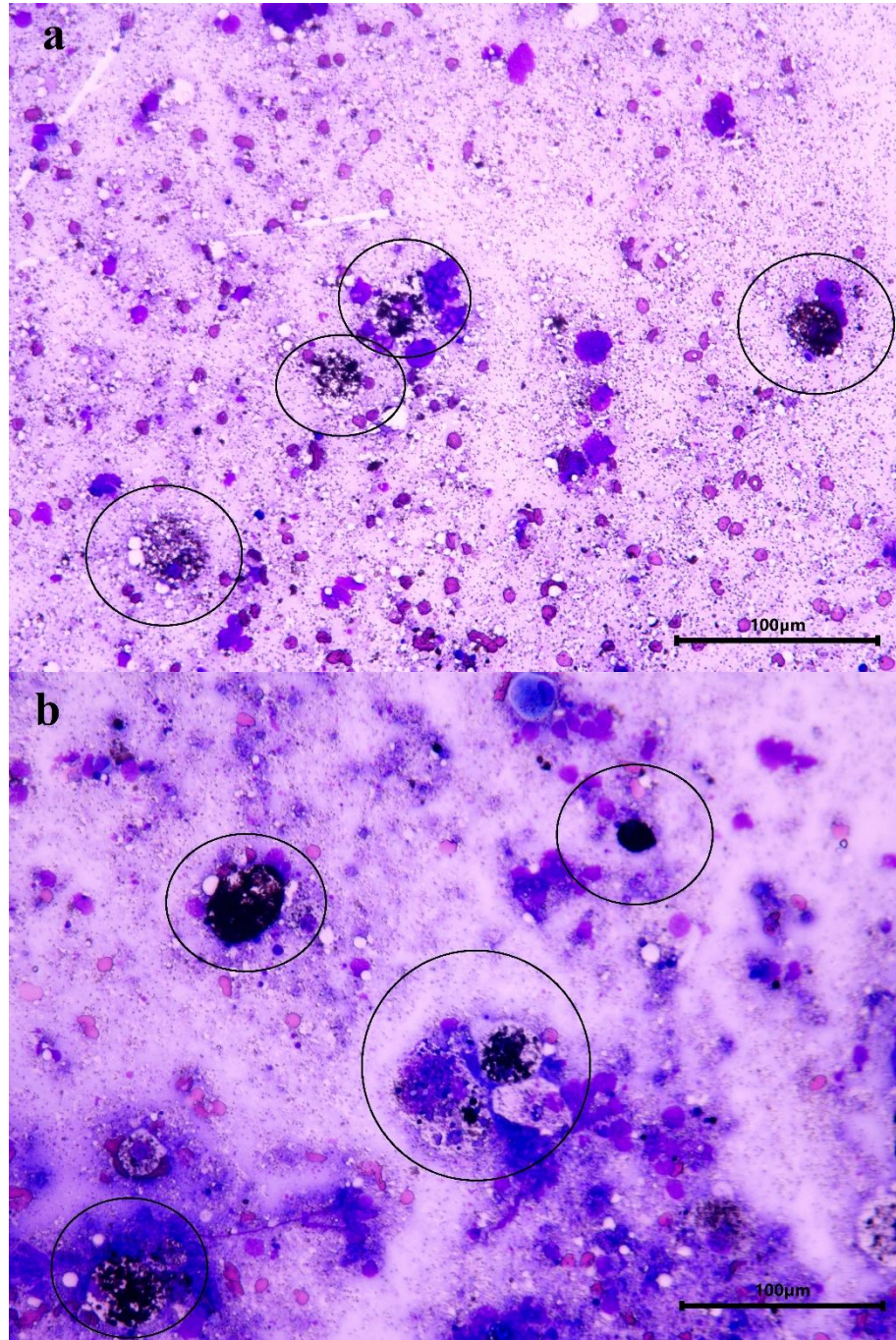


Grafikon 2. Prikaz udjela i raspodjele smeđih intracitoplazmatskih granula po pojedinim organima.

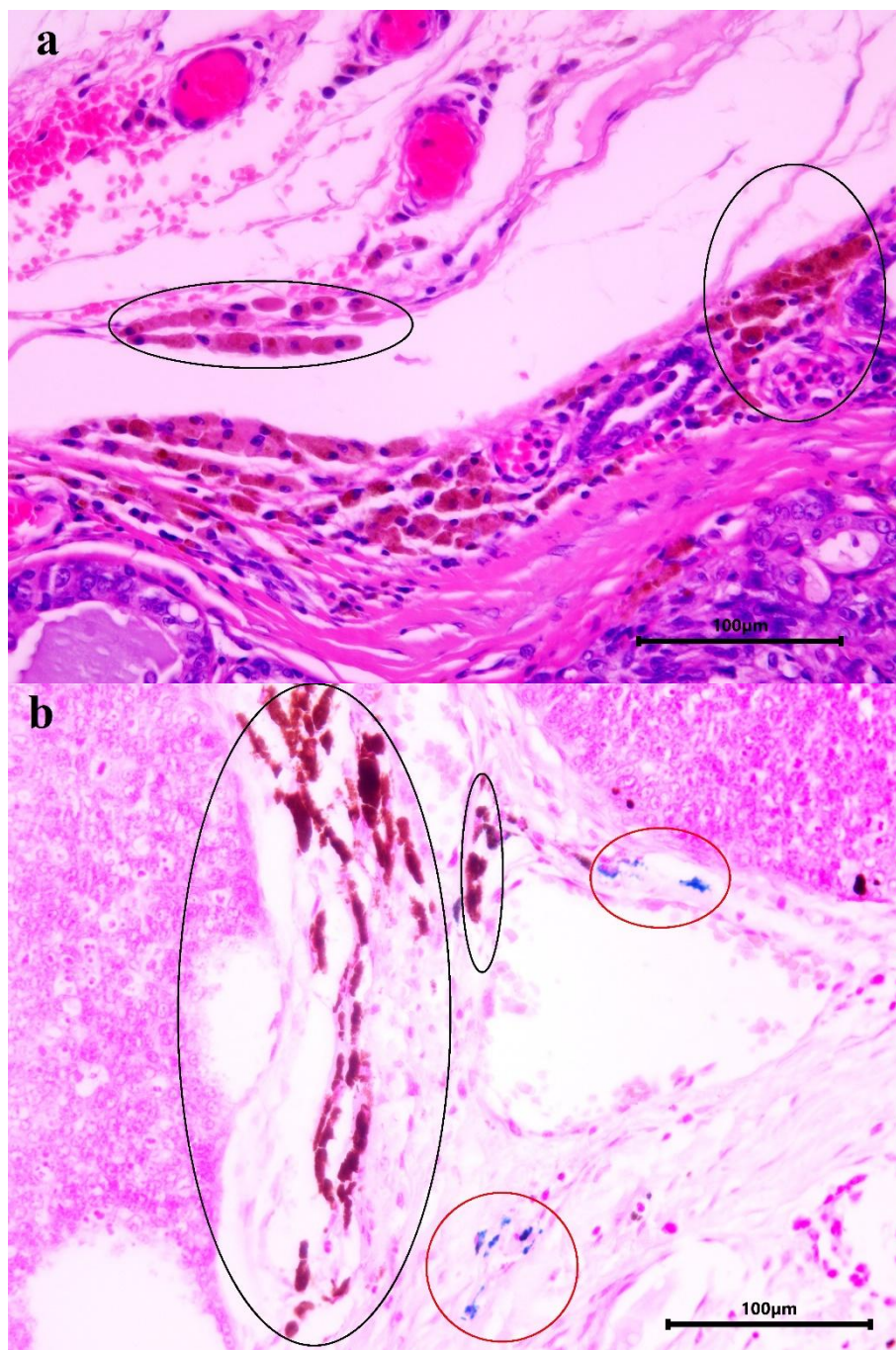
Histopatološkom pretragom pretraženo je 22 uzorka koji su predstavljali nastavak dijagnostike na prethodno obavljene citološke pretrage kod nekih pacijenata (slika 3). Od histopatoloških uzoraka 81.8 % (18/22) je bilo pozitivno na prusko modriilo tj. svi uzorci kod kojih je citološka pretraga bila pozitivna. Podudarnost između prije postavljenih citoloških i histopatoloških dijagnoza je iznosila 40.9% (N=9), nepotpuno ili u potpunosti se nije podudaralo 59.1% (N=13) dijagnoza. Kod organa, najveći postotak nepotpuno podudarnih dijagnoza je bio u uzorcima jetre (2/3, 66.67%) i slezene (2/3, 66.67%), dok je kod uzoraka kože to bilo u 56.3% (9/16) uzorka (tablica 1).

Tablica 1. Usporedni prikaz podudaranja citoloških i histopatoloških dijagnoza. U lijevo stupcu je organ, u srednjem citološka dijagnoza, a u desnom stupcu histopatološka dijagnoza. Citološke i histopatološke dijagnoze koje se ne podudaraju u potpunosti su istaknute plavom bojom.

organ	citološka dijagnoza	histopatološka dijagnoza
koža	neoplazija epitelnog porijekla	Trihoepiteliom
koža	melanocitna neoplazija	Melanom
koža	melanocitna neoplazija	Melanom
koža	rezidentne stanice kože	Koža bez promjena
koža	melanocitna neoplazija	Melanocitom
koža	melanocitna neoplazija	Melanocitom
koža	nakupine ovalnih stanica, s blijedoplavom citoplazmom i smeđim pigmentom, ghost stanice	Maligni pilomatrikom
koža	melanocitna neoplazija	Anaplastični nediferencirani sarkom
koža	melanocitna neoplazija	furunkuloza i piogranulomatozna upala
koža	folikularna cista/ neoplazija epitelnog porijekla	Trihoepiteliom
koža	neoplazija epitelnog porijekla	Hemangiosarkom
koža	krvarenje	Melanom
koža	pilomatrom/trihoepiteliom	Apokrini duktalni karcinom
koža	proliferacija pigmentnih stanica	Dermalni melanocitom
koža	proliferacija pigmentnih stanica	Furunkuloza
koža	keratinski materijal i smeđi slobodni pigment	Folikularna cista i sekundarna upala
jetra	mikrovakuolarna degeneracija	Difuzna mikrovakuolarna degeneracija
jetra	rezidentne stanice jetre	Portalna i periportalna fibroza sa perivaskularnom infiltracijom mastocita; mikrovezikularna hepatocelularna degeneracija
jetra	krvarenje	Sitnovakuolarna degeneracija hepatocita, multifokalni milijarni (embolijski) gnojni hepatitis
slezena	krvarenje	Hematom
slezena	rezidentne stanice slezene	Hematom
slezena	zdrava slezena	Kongestija visokog stupnja i hemosideroza



Slika 2. Usporedba klasičnog bojanja citološkog uzorka kože bojane po Giemsi (slika a) s bojanjem Pruskim modrilom (slika b). 400x povećanje. a) stanice koje sadrže smeđe intracitoplazmatske granule (zaokružene crno). b) diferencijalno vidljiva razlika između plavih pozitivnih i smeđih negativnih granula na prusko modriilo (zaokruženo crno).



Slika 3. Usporedba histopatološkog uzorka kože obojanog standardnom HE metodom (slika a) i istog histološkog uzorka obojanog pruskim modrilom (slika b). 400x povećanje. a) stanice koje sadrže smeđe intracitoplazmatske granule (zaokružene crno). b) vidljiva razlika između plavih željeznih na prusko modriilo pozitivnih (zaokružene crveno) i smeđih negativnih granula na prusko modriilo (zaokruženo crno).

5. RASPRAVA

Smeđe intracitoplazmatske granule predstavljaju širok spektar kemijski različitih pigmenata. Njihova determinacija klasičnim citološkim bojanjima (Giemsa) ne daje nam odgovor o kojim se konkretno pigmentima u uzorcima radi pa primjena pruskog modrila omogućuje potvrdu željeznog pigmenta, a istovremeno negativan rezultat bojenja i lokacija pigmenta omogućuje determinaciju ostalih pigmenata (RASKIN, 2016.). Našim istraživanjem smo željeli ustanoviti da li je moguća primjena ove metode bojenja na citološkim uzorcima koji su prethodno bili bojani Giemsa metodom te se nakon nje pokazala potreba za diferencijacijom tipa pigmenta. Temeljem naših rezultata, vidljivo je da je prusko modrilo moguće primijeniti i na odbojanim Giemsa uzorcima što se podudara s rezultatima dosadašnjih istraživanja (MARCOS i sur., 2009). Pozitivan nalaz bojanjem pruskim modrilom tj, nalaz hemosiderina utvrđen je u 80.8% uzoraka što je vrlo velik udio s obzirom na broj uzetih uzoraka. Uzorci kože najčešće su bili pozitivni na prusko modrilo, slijede uzorci slezene i jetre dok je limfni čvor bio najrijeđe pozitivan. Ovakav rezultat je vjerojatno posljedica toga što većina citoloških uzoraka i jesu uzorci s površine tijela što je dominantno koža. Uz melanin ili žučni pigment ovisno o organu iz kojeg potječe uzorak, prisutnost hemosiderina se u 68% uzoraka klasičnim bojanjima ne bi mogla objektivno utvrditi što je vrlo značajan postotak. Ovdje posebnu pažnju treba pridodati uzorcima jetre kod kojih se uvijek postoji velika vjerojatnost pronalaska više različitih vrsta pigmenata, a samim time i postavljanja krive citološke dijagnoze bez uporabe pruskog modrila što je u ovom istraživanju i dokazano.

Kao što neki autori navode podudarnost između citološkog i histopatološkog nalaza kod neoplastičnih i neneoplastičnih lezija iznosi samo 33-66%. U našem slučaju podudarnost je bila 40.9%, a nakon primjene pruskog modrila ona je iznosila 50% što je značajan porast te se slaže s rezultatima drugih autora (COHEN i sur., 2003.). Također, u dijagnostici kožnih melanocitnih neoplazmi, primjena pruskog modrila pokazala nam je podudarnost u 100% slučajeva između citološke pretrage upotrebom pruskog modrila i histopatološke dijagnoze što je za 9.1% više nego što je utvrđeno u pregledanom istraživanju (GHISLENI i sur., 2006.). Ova spoznaja još više pridaje na važnosti upotrebe pruskog modrila citoloških uzoraka kod sumnje na neoplaziju melanocitnog porijekla.

6. ZAKLJUČCI

1. Bojanje citoloških preparata pruskim modrilom vrlo je jeftina i učinkovita metoda u diferencijaciji smeđih intracitoplazmatskih granula.

2. Moguća je primjena pruskog modrila na odbojanim citološkim preparatima prethodno obojanim Giemsa metodom što je važno jer nama potrebe za ponovnim uzorkovanjem citološkog uzorka što je veliki stres za životinju i dodatan trošak za vlasnika.

3. Poznavanje afiniteta određenih smeđih pigmenata za primijenjenu tehniku bojanja omogućuje patologu da se odredi točan sastav smeđeg pigmenta. Navedena spoznaja vrlo je važna jer omogućuje objektivan dokaz, puno sigurnije postavljanje dijagnoze, a samim time povećava mogućnost točnijeg i uspješnijeg liječenja različitih patoloških stanja.

4. Smatramo da postoji potencijal za češće korištenje ove tehnika bojanja, posebice u dijagnostici kožnih promjena, gdje se melanocitne neoplazije mogu točnije izdiferencirati od ostalih promjena jer često sadržavaju akumulacije smeđeg pigmenta koji se ovom metodom može jeftino, lako i objektivno diferencirati.

7. ZAHVALE

Zahvalan sam mentoru, izv. prof. dr. sc. Marku Hohšteteru na ukazanoj prilici bez koje moj prvi izlet u svijet znanosti ne bi postojao. Korisni savjeti, puno strpljenja i prijateljski odnos tijekom izrade ovog rada pamtit ću do kraja života. Zahvaljujem i drugoj mentorici dr. sc. Lidiji Medven Zagradišnik na pomoći kod izrade rada.

Za kraj, zahvaljujem se i ostalim djelatnicima Zavoda za patologiju Veterinarskog Fakulteta koji su sudjelovali u sakupljanju, bojanju i označavanju citoloških i histopatoloških uzoraka.

8. POPIS LITERATURE

- BERRY, J. P., L. ZHANG, P. GALLE, E., ANSOBORLO, M. H. HENGÉ-NAPOLI & M. DONNADIEU-CLARAZ (1997): Role of alveolar macrophage lysosomes in metal detoxification u *Microscopy Research and Technique*, 36(4), 313–323.
- CHOW A., M. HUGGINS, J. AHMED, D. HASHIMOTO, D. LUCAS, Y. KUNISAKI, S. PINHO, M. LEBOEUF, C. NOIZAT, N. VAN ROOIJEN (2013): CD169+ macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress u *Nature. Medicine*.19:429–436.
- COHEN, M., M.W. BOHLING, J.C. WRIGHT, E.A. WELLES & SPANO, J. S. (2003): Evaluation of sensitivity and specificity of cytologic examination: 269 cases (1999-2000) u *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(7), 964–967.
- DEY, P. (2022): *Special Stains for the Carbohydrate, Protein, Lipid, Nucleic Acid and Pigments*. U: Dey, P.: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. 2nd ed., Springer Nature Singapore, Singapore, 96-97.
- DIXON, L. J., M. BARNES, H. TANG, M. T. PRITCHARD & L. E. NAGY, (2013): Kupffer Cells in the Liver u *Comprehensive Physiology*, 785-787.
- FRENCH, T.W., T. STOKOL, D. MEYER (2008): *The Liver*. U. Cowell, R.L., R.D. Tyler, J.H. Meinkoth, D.B. DeNicola: *Diagnostic Cytology ana Hematology of the Dog and Cat*, 3rd edition, Mosby Elsevier St. Louis, Missouri, 312-329.
- 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 u *Veterinary Clinical Pathology*, 35: 24-30.
- GRABAREVIĆ, Ž. (1993): Poremetnje mijena tvari, oštećenje i smrt stanice- regresijski procesi. U: *Opća veterinarska patologija*. (Ur. Čuljak K., Grabarević Ž., Sabočanec R.), Horetzky nakladničko poduzeće, Zagreb, 92-95.
- SUVARNA S., R., C. LAYTON, D. JOHN (2019): *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, Elsevier, Philadelphia, SAD, pp. 198-204.
- KOZARIĆ, Z. (1997) : *Veterinarska histologija*, Naklada Karolina, Zagreb, pp 63.

KUMAR, V., A. ABBAS, J. ASTER (2020): Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. 10th ed. Elsevier, Philadelphia, SAD, pp. 52, 65, 659-661.

MARCOS, R., M. SANTOS, N. SANTOS, F. MALHÃO, F. FERREIRA, R. A. MONTEIRO, , & E. ROCHA (2009): Use of destained cytology slides for the application of routine special stains u *Veterinary Clinical Pathology*, 38(1), 94–102.

OKABE, Y., & R. MEDZHITOV (2014): Tissue-Specific Signals Control Reversible Program of Localization and Functional Polarization of Macrophages u *Cell*, 157(4), 832–844.

RADAKOVICH, L. B. & C.S. OLVER, (2017): Pigments: Iron and Friends u *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 47(1), 17–29.

RASKIN, E. R. (2016): General categories of cytologic interpretation. U: Raskin, E., R., D. J. Meyer: *Canine and Feline Cytology*, 3rd edition. Saunders Elsevier. Philadelphia, SAD, 16-33.

RILEY, P. A. (1997): Melanin u *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(11), 1235–1239.

WYNN, T.A., A. CHAWLA & J.W. POLLARD (2013): Macrophage biology in development, homeostasis and disease u *Nature* 496, 445–455.

VAN WETTERE, A. J., BROWN. L. D.,(2022): Hepatobiliary System and Exocrine Pancreas. U: Zachary, J. F. (2022): *Pathologic Basis od Veterinary Disease*. Elsevier, St. Louis, Missouri, SAD (512-513).

9. SAŽETAK

Neven Lončarić - ISTRAŽIVANJE SASTAVA INTRACITOPLAZMATSKIH GRANULA U CITOLOŠKIM UZORCIMA PASA I MAČAKA

Provedenom studijom se istraživala mogućnost diferencijacije smeđih intracitoplazmatskih granula u citološkim uzorcima bojenjem pruskim modrilom jer je sastav teško izdiferencirati standardnim metodama bojanja. U istraživanju su korišteni arhivirani podatci i uzorci citoloških i histopatoloških pretraga pasa i mačaka analizirani na Zavodu za veterinarsku patologiju, Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.

U istraživanju je pregledano 7667 arhiviranih uzoraka, a smeđe intracitoplazmatske granule su utvrđene u 72 uzorka (0.93%) od kojih je 26 odbojano te ponovo obojano pruskim modrilom. Pozitivan nalaz na prisustvo hemosiderinskog pigmenta je utvrđen u 21 uzorku. Najveći dio uzoraka pozitivnih na prusko modriilo činili su uzorci kože (46.2%), a najčešća dijagnoza bila je melanocitna neoplazija (23.8%). U 66.7% uzoraka pozitivnih na prusko modriilo dijagnosticirano je više različitih vrsta pigmenata koje je klasičnim bojanjima gotovo nemoguće izdiferencirati. Usporednom analizom utvrđena je podudarnost u 40.9% uzoraka između postavljenih citoloških i histopatoloških dijagnoza, a nakon primjene pruskog modrila podudarnost je porasla na 50% čime se potvrđuje korisnost ove dijagnostičke metode.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da se upotrebom pruskog modrila, na odbojenim uzorcima analiziranim klasične metodama bojanja, može bolje diferencirati sastav pigmenata u patološkim lezijama. Samim time se može znatno povećati točnost postavljenih dijagnoza, što posebice dolazi do izražaja u diferencijaciji melanocitnih neoplazija bez dodatnih stresnih zahvata na životinji i uz minimalne troškove za vlasnika. Posljedično tome rezultat ovakve pretrage može biti od znatne koristi u dijagnostici, određivanju prognoze te terapiji bolesti.

KLJUČNE RIJEČI: citologija, smeđe granule, prusko modriilo, diferencijacija

10. SUMMARY

Neven Lončarić - INVESTIGATION OF THE COMPOSITION OF INTRACYTOPLASMIC GRANULES IN CANINE AND FELINE CYTOLOGICAL SAMPLES

The conducted study investigated the possibility of differentiation of brown intracytoplasmic granules in cytological samples with the Prussian blue reaction, since the composition is difficult to differentiate with standard staining methods. The research used archived data and cytological and histopathological examinations of dogs and cats analyzed in the Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine in Zagreb.

In the research, 7667 archived samples were examined, and brown intracytoplasmic granules were determined in 72 samples (0.93%), of which 26 were selected and re-stained with Prussian blue. A positive finding for the presence of hemosiderin pigment was found in 21 samples. Most of the samples positive for Prussian blue were skin samples (46.2%), and the most common diagnosis was melanocytic neoplasia (23.8%). In 66.7% of samples positive for Prussian blue, several different types of pigments were diagnosed, which are almost impossible to differentiate with standard staining. The comparative analysis established the coincidence of the cytological and histopathological diagnoses in 40.9% of the samples. After applying the Prussian blue, the agreement increased to 50%, which confirms the usefulness of this diagnostic method.

The results of this research showed that the composition of pigments in pathological lesions can be better differentiated by using Prussian blue on stained samples analyzed by classical staining methods. This alone can significantly increase the accuracy of established diagnoses, which is especially evident in the differentiation of melanocytic neoplasia without additional stressful interventions on the animal and with minimal costs for the owner. The result of such a test can be of considerable use in the diagnosis, determining the prognosis and therapy of the disease.

KEY WORDS: cytology, brown granules, Prussian blue, differentiation

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 20.7.1999. u Varaždinu. Nakon završene 4. Osnovne škole u Varaždinu i škole stranih jezika u Varaždinu u kojoj sam učio engleski jezik 2014. godine upisujem prirodoslovno-matematički smjer Prve gimnazije Varaždin. Tijekom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja sudjelujem na brojnim natjecanjima iz područja prirodoslovlja i matematike. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisujem 2018. godine. Od 2022. godine član sam volonterskog tima Klinike za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2007. godine pa sve do danas aktivno se bavim plivanjem u kojem redovito sudjelujem na državnim prvenstvima te osvajam brojna odličja na natjecanjima unutar, ali i izvan granica Hrvatske.