

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE  
Katedra za patološku morfologiju



mr Ivana VUČIĆEVIĆ

EKSPRESIJA ANTIGENA ĆELIJSKE  
PROLIFERACIJE NA MASTOCITIMA I NJIHOV  
ZNAĀAJ ZA GRADACIJU MASTOCITOMA  
PASA  
doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETRINARY MEDICINE  
Department of Pathology



mr Ivana VUČIĆEVIĆ

EXPRESSION OF PROLIFERATING CELL  
ANTIGENS ON MAST CELLS AND THEIR  
SIGNIFICANCE FOR MAST CELL TUMOR  
CLASSIFICATION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentor:

Dr Sanja Aleksić-Kovačević, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd

Članovi komisije:

Dr Milijan Jovanović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd

Dr Nikola Popović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd

Dr Zoran Stanimirović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd

Dr Svetislav Tatić, redovni profesor

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Beograd

## REZIME

Kutani mastocitomi su jedna od najčešćih neoplazmi pasa. Vode poreklo iz kostne srži, iz linije opredeljene za mastocite i pokazuju vrlo promenljivo ponašanje, te je predloženo nekoliko kriterijuma za njihovu klasifikaciju, uključujući histološku gradaciju i markere proliferacije ćelija. Citoplazmatska ekspresija CD117 ili KIT proteina (tirozin kinaza receptor) dovodi se u vezu sa višim stepenima maligniteta mastocitoma i lošijom prognozom. Dokazano je da postoji veza između aberantne ekspresije CD117 i postojanja c-kit mutacija, iako mutacije često nisu prisutne kod svih mastocitoma sa aberantnom ekspresijom KIT proteina. Ispitivanjima su obuhvaćena 24 kutana mastocitoma i 6 kontrolnih uzoraka kože od 30 pasa različitog uzrasta, rase i pola. Kao pozitivna kontrola za c-kit mutaciju korišćen je izolat DNK psa sa mastocitomom za koga je ranije utvrđeno da poseduje navedenu mutaciju. Uzorci tkiva fiksiranog u formalinu i ukalupljenog u parafinske blokove, bojani su hematoksilin-eozinom i *toluidin blue* metodom, a imunohistohemijski na CD117, Ki-67, PCNA i CD45RA. DNK je izolovana iz istih parafinskih blokova, a primenom PCR metode i korišćenjem specifičnih prajmera PE1 i PE2 amplifikovan je željeni fragment DNK. Četrnaest od 24 mastocitoma su prema histološkim osobinama svrstana u mastocitome visokog stepena maligniteta, dok su preostalih deset, mastocitomi niskog stepena maligniteta. Kod 7 mastocitoma prisutno je više od šest mitotskih figura na 10 polja velikog uvećanja. Prisustvo više od dve multinuklearne ćelije na 10 polja velikog uvećanja uočeno je kod 11 mastocitoma, dok su više od dve ćelije sa bizarnim jedrom na 10 polja velikog uvećanja uočene kod 10 mastocitoma. Osam mastocitoma sadrži više od 10% anaplastičnih mastocita sa jedrima promera oko 8-10 mikrometara. Od ukupno 24 mastocitoma, devet je Ki-67 pozitivno (7 mastocitomima višeg i 2 mastocitomima nižeg stepena maligniteta), dok se ekspresija PCNA i CD45RA uočava kod svih mastocitoma. Devet mastocitoma višeg stepena maligniteta ispoljava aberantnu citoplazmatsku ekspresiju CD117. Ni kod jednog od ispitanih uzoraka mastocitoma nije detektovano prisustvo c-kit mutacije. Prisustvo mitotskih figura, višejedarnih ćelija, bizarnih jedara i kariomegalije, kao i tip ekspresije CD117 predstavljaju preduslov za novu klasifikaciju i ključne prognostičke parametre kod pasa sa mastocitomima.

**Ključne reči:** psi, mastocitom, morfologija, klasifikacija, CD 117, c-kit mutacija

**Naučna oblast:** Veterinarska medicina

**Uža naučna oblast:** Patologija

**UDK broj:** 616-097:599.735.1

## SUMMARY

Cutaneous mast cell tumours (MCTs) are one of the most common neoplasm in dogs. Originate from the bone marrow, from the mast cells line, but because of its location are being studied within skin tumors. MCTs show a highly variable biologic behavior and therefore several criteria have been proposed for their classification, including histological grading and cell proliferation markers. Cytoplasmic expression of CD117 or KIT protein (tyrosine kinasa receptor) has been found to correlate with higher histological grade and with a worsened prognosis. It has been revealed that there is a conection between the aberrant expression of CD117 and presence of c-kit mutations, although mutations were not present in all mast cell tumors with aberrant expression of KIT protein. Twenty four MCTs and 6 control specimens from 30 dogs of different age, breed and sex were included in this study. DNA isolated from the dog with mast cell tumor which had previously found to has specified mutation was used as a positive control for c-kit mutation. Formalin fixed and paraffin embedded tissue samples were stained with hematoxylin-eosin and toluidin blue and immunohistochemically tested for CD117, Ki-67, PCNA i CD45RA expression. DNA had been extracted from the same paraffin blocks and subsequent polymerase chain reaction amplification was performed using PE1 and PE2 primers. Fourteen of 24 MCTs were histologically high-grade, while ten were classified as a low-grade malignancy. Seven MCTs have more than six mitotic figures in 10 high-power fields. The presence of more than two multinucleated cells in 10 high-power fields was observed in 11 MCTs, while more than two cells with bizarre nuclei in 10 hpf were observed in 10 MCTs. Eight MCTs have more than 10% of neoplastic mast cells with nuclei about 8-10 microns in diameter. Of the total MCTs, 9 tumors are Ki-67 positive (7 mastocytomas of high and 2 mastocytomas of low-grade malignancy), while the expression of PCNA and CD45RA was observed in all 24 MCTs. Nine MCTs of high-grade malignancy showed aberrant cytoplasm labeling for CD117. Mutations of c-kit proto-oncogene were not detected in any of the tested MCTs. The presence of mitotic figures, multinucleated cells, bizarre nuclei and karyomegaly in 10 high-power fields, as well as the pattern of CD117 expression are prerequisite for the new classification and most important prognostic factor in dogs with mast cell tumor.

**Key Words:** dogs, mast cell tumor, morphology, classification, CD117, c-kit mutation

**Major Field of Study:** Veterinary Medicine

**Special Field of Study:** Pathology

**UDK Number:** 616-097:599.735.1

## SADRŽAJ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. PREGLED LITERATURE .....</b>   | <b>4</b>  |
| 2.1. Mastociti .....   | 4         |
| 2.1.1. Vrste mastocita.....  | 5         |
| 2.1.2. Mastocitoza i mastocitomi .....   | 8         |
| 2.2. Kutani mastocitom pasa .....  | 9         |
| 2.2.1. Etiologija.....   | 9         |
| 2.2.2. Incidenca i faktori rizika .....  | 10        |
| 2.2.3. Patogeneza .....  | 10        |
| 2.2.4. Klinička slika .....  | 14        |
| 2.2.5. Klasifikacija mastocitoma.....  | 17        |
| 2.2.6. Nova klasifikacija .....  | 25        |
| 2.2.7. Terapija .....  | 26        |
| 2.2.8. Novi pristupi u terapiji .....  | 27        |
| <b>3. CILJ I ZADACI .....</b>  | <b>29</b> |
| <b>4. MATERIJAL I METODE.....</b>  | <b>30</b> |
| 4.1. Materijal .....   | 30        |
| 4.1.1. Tkivni uzorci.....  | 30        |
| 4.1.2. Izolat DNK.....   | 30        |
| 4.2. Metode.....   | 31        |
| 4.2.1. Histološka obrada uzoraka tumora kože .....   | 31        |
| 4.2.2. Histološka analiza uzoraka tumora kože.....   | 31        |
| 4.2.3. Imunohistohemijska metoda .....   | 33        |
| 4.2.4. Morfometrijska analiza .....  | 36        |
| 4.2.5. Metode molekularne detekcije mutacija .....   | 37        |
| 4.2.6. Statistička obrada podataka.....  | 39        |
| <b>5. REZULTATI.....</b>   | <b>41</b> |
| 5.1. Određivanje polne, starosne, rasne i topografske distribucije<br>kutanog mastocitoma kod ispitanih pasa ..... | 41        |



|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 5.1.1.    | Polna distribucija mastocitoma .....  | 41        |
| 5.1.2.    | Zastupljenost kutanog mastocitoma<br>u odnosu na starost pasa .....           | 42        |
| 5.1.3.    | Rasna distribucija kutanog mastocitoma .....                                  | 42        |
| 5.1.4.    | Topografska distribucija kutanog mastocitoma .....                            | 43        |
| 5.2.      | Morfološke karakteristike mastocitoma .....                                   | 45        |
| 5.2.1.    | Mikroskopski nalaz na preparatima bojenim<br>hematoksilin – eozinom (HE)..... | 45        |
| 5.2.2.    | Mikroskopski nalaz na preparatima bojenim<br>toluidine blue metodom .....     | 52        |
| 5.3.      | Klasifikacija mastocitoma .....   | 53        |
| 5.4.      | Imunohistohemijski parametri značajni za klasifikaciju mastocitoma.....       | 54        |
| 5.4.1.    | Imunohistohemijska ekspresija<br>KIT receptora (CD117) u mastocitomima.....   | 54        |
| 5.4.2.    | Imunohistohemijska ekspresija Ki-67 u mastocitomima.....                      | 57        |
| 5.4.3.    | Imunohistohemijska ekspresija PCNA u mastocitomima.....                       | 60        |
| 5.4.4.    | Imunohistohemijska ekspresija CD45RA u mastocitomima .....                    | 61        |
| 5.5.      | Prisustvo mutacija .....  | 62        |
| <b>6.</b> | <b>Diskusija .....</b>  | <b>64</b> |
| <b>7.</b> | <b>Zaključak.....</b>   | <b>78</b> |
| <b>8.</b> | <b>Popis literature.....</b>  | <b>80</b> |

## **SKRAĆENICE**

MCT - *Mast Cell Tumor*

KIT – *Tyrosine Kinase Receptor*

CD117 – *Cluster of Differentiation 117*

ATP – *Adenozin - trifosfat*

IL – *Interleukin*

SCF – *Stem cell factor*

NK cells – *Natural killer cells*

TNF- $\alpha$  – *Tumor necrosis factors alpha*

LT – *Leukotriene*

PAF – *Platelate Activating Factor*

TGF- $\beta$  – *Transforming growth factor beta*

ITD – *Internal Tandem Duplication*

AgNOR – *Nucleolar Organiser Region*

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

TSLC1 – *Tumor Suppressor in Lung Cancer 1*

PIGF – *Placental Growth Factor*

VEGFR – *Vascular endothelial growth factor receptor*

WHO – *The World Health Organization*

MI – *Mitotic Index*

PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

NOR – *Nucleolar Organiser Region*

CD45RA – *Cluster of Differentiation 45 Ready to Use*

HPF – *High-power Fields*

PDGF – *Platelet-derived Growth Factor*

EGF – *Epidermal Growth Factor*

FGF – *Fibroblast Growth Factors*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

## 1. UVOD

Kutani mastocitomi (*Mast Cell Tumor* – MCT, eng) čine 7% do 21% svih tumora kože pasa i spadaju među najučestalije tumore kože kod ove vrste životinja (Welle *i sar.*, 2008). Prema poreklu, mastocitomi pripadaju grupi mezenhimskih tumora kože i mekih tkiva (Hendrick *i sar.*, 1998). Vode poreklo iz kostne srži i pokazuju vrlo promenljivo ponašanje, pa se za njihovu klasifikaciju uzima nekoliko kriterijuma, uključujući histološku gradaciju i markere proliferacije ćelija. Tirozin kinaza receptor (*Tyrosine Kinase Receptor* – KIT, eng) ili CD117 (*Cluster of Differentiation 117* – CD117, eng) je tirozin kinaza receptor za koji se smatra da ima ključnu ulogu kod mastocitoma pasa i dokazano je da postoji veza između aberantne ekspresije CD117 i postojanja c-KIT mutacija, iako mutacije nisu prisutne kod svih mastocitoma sa aberantnom ekspresijom KIT proteina.

Klasifikacija mastocitoma je od velikog prognostičkog i terapijskog značaja i može se izvršiti na osnovu različitih parametara. Najviše su zastupljeni histološki sistemi klasifikacije, od kojih je najpoznatiji Patnaikov sistem, prema kome su tumori podeljeni na tri stepena maligniteta na osnovu stepena diferentovanosti, celularnosti, ćelijske morfologije, mitotskog indeksa i reakcije tkiva (Patnaik *i sar.*, 1984). Histološka građa mastocitoma je u korelaciji sa krajnjim ishodom bolesti (Patnaik *i sar.*, 1984), mada postoji značajna dvosmislenost kada su u pitanju srednje diferentovani tumori (Weisse *i sar.*, 1984), kao i znatne varijacije vezane za subjektivnost istraživača, što je uticalo na uvođenje dvostepenog sistema klasifikacije, na mastocitome visokog i niskog stepena maligniteta (Kiupel *i sar.*, 2004a). Na osnovu ove podele, mastocitomi visokog stepena maligniteta imaju ispunjen najmanje jedan od sledećih kriterijuma: najmanje 7 mitotskih figura, najmanje 3 multinuklearne ćelije, najmanje 3 bizarna jedra na 10 polja velikog uvećanja ili prisustvo kariomegalije kod najmanje 10% neoplastičnih ćelija (Kiupel *i sar.*, 2011).

Iako etiologija MCT pasa još uvek nije u potpunosti razjašnjena, nekoliko studija ukazuje da oko 15-40% mastocitoma pasa sadrži mutaciju c-KIT protoonkogena (Letard *i sar.*, 2008; Takeuchi *i sar.*, 2011). C-KIT protoonkogen kodira receptor tirozin kinazu, te mutacije ovog gena mogu dovesti do aktivacije KIT receptora u odsustvu liganda (Longley *i sar.*, 2001; Webster *i sar.*, 2006). KIT receptor ima bitnu ulogu u opstanku ćelija na kojima se nalazi, zatim u njihovoj proliferaciji i diferencijaciji (Webster *i sar.*, 2006; Takeuchi *i sar.*, 2011). Mutacije koje dovode do aktivacije KIT receptora u odsustvu liganda identifikovane su kod mastocitoma pasa, pre svega na eksonu 11 (nešto ređe na eksonu 8, 9 i 12) i sastoje se od internih tandem duplikacija, delecija i tačkastih mutacija. Prisustvo mutacija c-KIT protoonkogena se pre svega dovodi u vezu sa mastocitomima visokog stepena maligniteta (Webster *i sar.*, 2006; London *i sar.*, 2009; Kiupel *i sar.*, 2011).

Mada postoji veza između postojanja c-KIT mutacija i aberantne ekspresije CD117, mutacije nisu prisutne kod svih mastocitoma sa aberantnom ekspresijom KIT proteina (London *i sar.*, 1996; Morini *i sar.*, 2004; Webster *i sar.*, 2006). Pod aberantnom ekspresijom smatra se ekspresija KIT proteina fokalno i difuzno u citoplazmi mastocita. Povećano prisustvo KIT receptora u citoplazmi (fokalno ili difuzno) je u korelaciji sa kraćim preživljavanjem pasa sa mastocitomom, kao i sa kraćim intervalom do remisije bolesti u odnosu na mastocitome kod kojih je povećana ekspresija membranskih KIT receptora (Kiupel *i sar.*, 2004b; Webster *i sar.*, 2004).

Ispitivanja vezana za aberantnu ekspresiju KIT proteina i postojanje c-KIT mutacija, uslovia su da se protein kinaze smatraju važnim „metama“ u terapiji mastocitoma (London, 2004). Inhibitori tirozin kinaza su mali molekuli koji blokiraju adenzin-trifosfat (*Adenosine triphosphate* – ATP, eng) vezujuća mesta na kinaza receptorima (Bennasroune *i sar.*, 2004; Takeuchi *i sar.*, 2011). Dosadašnja ispitivanja su pokazala pozitivan odgovor na terapiju inhibitorima tirozin kinaza, kako kod pasa koji imaju mastocitome kod kojih nije detektovana c-KIT mutacija (Isotani *i sar.*, 2008; Takeuchi *i sar.*, 2011), tako i kod pasa sa mastocitomima koji imaju c-KIT mutaciju (Hahn *i sar.*, 2008; London *i sar.*, 2009; Takeuchi *i sar.*, 2011).

Sa uvođenjem dvostepenog sistema klasifikacije po Kiupelu otvorena je mogućnost za detaljnije i pouzdanije razdvajanje mastocitoma različitih po stepenu agresivnosti. Međutim, bez obzira na mane Patnaikovog sistema klasifikacije, on predstavlja dobar osnov za klasifikaciju mastocitoma, tako da se u većini slučajeva preporučuje kombinovanje ova dva sistema

klasifikacije pri određivanju terapije i prognoze (Stern, 2012). Pored klasifikacije mastocitoma, prilikom određivanja terapije i prognoze u obzir treba uzeti i prisustvo aberantne ekspresije KIT proteina, kao i postojanje c-KIT mutacija (Thompson *i sar.*, 2010). Većina autora smatra da iako sve navedene parametre treba uzeti u obzir, prisustvo mitozna (mitotski indeks) ipak predstavlja najbitniji pokazatelj biološkog ponašanja tumora (Romansik *i sar.*, 2007; Elston *i sar.*, 2009; Scarpa *i sar.*, 2013).

Uzimajući u obzir sve navedeno, usmerili smo cilj ispitivanja ka izučavanju morfoloških karakteristika, prisustva c-KIT mutacija i ekspresije molekula značajnih za proliferaciju i kontrolu rasta tumora, na osnovu čega bi se mogao primeniti novi sistem klasifikacije mastocitoma pasa, kao preduslov za odgovarajuću terapiju.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Mastociti

Mastocite je prvi put opisao *Paul Ehrlich* 1879. godine, u svojoj doktorskoj disertaciji, kao ćelije koje u svojoj citoplazmi imaju krupne granule koje se karakteristično boje (Vyas *i sar.*, 2006). U mastocitima, velikim ovoidnim ćelijama sa centralno postavljenim jedrom i različitom količinom citoplazme, nalaze se brojne bazofilne granule koje se mogu identifikovati upotrebom specijalnih bojenja (*Romanowsky, May-Griinwald Giemsa* i *toluidine blue*).

Mastociti, kao i bazofilni granulociti, vode poreklo od pluripotentne stem ćelije (CD34+) kostne srži, odakle putem cirkulacije dolaze do vezivnog tkiva ili sluznica i tu dovršavaju sazrevanje (Welle *i sar.*, 2008). Progenitori mastocita pod dejstvom interleukina 4 (*Interleukin - IL*, eng.) sazrevaju u zrele mastocite u sluznici, a pod dejstvom faktora rasta matične ćelije (*Stem cell factor – SCF*, eng.) u tkivu nastaju zreli vezivno-tkivni mastociti (Kosjerina, 1999). SCF je ligand koji se vezuje za tirozin kinaza receptore (*Tyrosine Kinase Receptor – KIT*, eng.) koji se nalaze na površini mastocita, a bitan je i za kasniji razvoj, funkciju i opstanak mastocita (Wedemeyer *i sar.*, 2000). Glavni je faktor rasta za mastocite, a sekretuju ga stromalne i endotelne ćelije i predstavlja ključni citokin koji reguliše diferencijaciju i sazrevanje mastocita (Galli *i sar.*, 1995; Hundley *i sar.*, 2004). SCF je, takođe, neophodan za održavanje zrelih mastocita, obzirom da indukuje proliferaciju, sprečava apoptozu mastocita i stimuliše njihovu degranulaciju (Mekori *i sar.*, 1995; Jensen *i sar.*, 2008; El-Agamy, 2012). Novija istraživanja, vezana za sazrevanje mastocita, pokazala su da su faktor rasta matične ćelije, IL – 3 i IL – 9 najbitniji citokini za regulaciju rasta i diferentovanje mastocita (Jamur *i sar.*, 2011). Zreli mastociti su, za razliku od bazofilnih granulocita, dugovečni i zadržavaju sposobnost umnožavanja pod određenim uslovima (Wedemeyer *i sar.*, 2000).

Granule mastocita sadrže heparin, histamin i mnoge proteaze, kao što su triptaze. Ekstracelularno oslobađanje medijatora, predstavlja degranulaciju, koja može biti uzrokovana fizičkim faktorima (mehanička trauma, visoka temperatura), toksinima, endogenim posrednicima (proteini, tkivne proteaze) i imunološkim mehanizmima (Payne i Kam, 2004). Mastociti se nalaze u većini organa i tkiva u organizmu a u najvećem broju su prisutni na mestima, kao što su koža i organi respiratornog i digestivnog sistema, koja su neprekidno u kontaktu sa materijama iz spoljne sredine (Kosjerina, 1999).

Mastociti učestvuju u odbrani organizma putem fagocitoze, stvaranjem slobodnih radikala kiseonika (Malaviya *i sar.*, 1994) ili stvaranjem antimikrobnih peptida, kao što su katelicidin (Di Nardo *i sar.*, 2003) ili himaze (Metz *i sar.*, 2008). Takođe, mogu da menjaju imunski odgovor domaćina putem degranulacije i sekrecije medijatora. Tako na primer, oslobađanjem histamina i drugih vazoaktivnih medijatora utiču na povećanje vaskularne propustljivosti a mogu delovati i na glatke mišiće. Osim navedenog, histamin povećava stvaranje sluzi, što pomaže eliminaciju patogena i omogućava bolju zaštitu ćelija. Lučenjem hemoatraktanata, mastociti mogu uticati na efikasnost eozinofilnih granulocita, NK ćelija (*Natural killer cells* - NK cells, eng.), IL-8 i neutrofilnih granulocita (Urb *i sar.*, 2012).

### 2.1.1. Vrste mastocita

Mastociti se normalno mogu naći u mnogim tkivima, uključujući kostnu srž i limfne čvorove (Bookbinder *i sar.*, 1992). Migracija mastocita u tkiva u početku zavisi od interakcije mastocita i endotelnih ćelija, a zatim, različiti medijatori, kao što su adhezivni molekuli, hemokini, citokini, integrini i faktori rasta igraju bitnu ulogu u procesu migracije (Nilsson *i sar.*, 1994).

Na osnovu izučavanja mastocita kod miševa, uobičajeno je da se ove ćelije grupišu na osnovu lokalizacije u tkivima, morfološkim svojstvima i sadržaju granula na vezivno-tkivne i mastocite sluznice. Obe vrste mastocita imaju brojne receptore u ćelijskoj membrani. Mastociti su heterogena grupa ćelija. Vezivno-tkivni mastociti se nalaze u koži, peritonealnoj šupljini i zidu creva. Njihove granule sadrže heparin, velike količine histamina i faktor nekroze tumora- $\alpha$  (*Tumor necrosis factors alpha* - TNF- $\alpha$ , eng.). Nasuprot tome, mastociti sluznice se prvenstveno nalaze u plućima i crevima. Od proteoglikana mnogo češće sadrže hondroitin-sulfat nego



heparin, a takođe sadrže mnogo niže koncentracije histamina i TNF- $\alpha$  od vezivno-tkivnih mastocita (Sur *i sar.*, 2007). Prema drugim istraživanjima, mastociti sluznice sekretuju prostanoide (prostaglandine, tromboksane i prostacikline) i cisteinil leukotriene LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> i LTE<sub>4</sub> (*Leukotriene – LT*, eng.), dok vezivno-tkivni mastociti uglavnom sekretuju samo prostanoide (Schwartz, 1994). U granulama obe grupe mastocita se nalazi triptaza, dok se himaza i karboksipeptidaza nalaze isključivo u vezivno-tkivnim mastocitima. Triptaza utiče na bronhokonstrikciju, himaza pretvara angiotenzin I u angiotenzin II i razgrađuje bradikinin, dok uloga karboksipeptidaze nije u potpunosti razjašnjena (Kosjerina, 1999). Pojedini autori smatraju da se mastociti pasa ne mogu deliti prema lokalizaciji u tkivima, već na osnovu njihove osetljivosti na formalin i prisustva proteaza (Gross *i sar.*, 2005).

Mastociti koji se boje primenom metahromatskih bojenja preparata tkiva fiksiranog u formalinu, predstavljaju samo deo ukupne populacije mastocita. Ovakvi mastociti se označavaju kao „tipični“ ili mastociti vezivnog tkiva. S druge strane, mastociti osetljivi na formalin, koji se metahromatskim bojama boje jedino ukoliko je tkivo fiksirano u Karnoa fiksativu (Carnoy, *eng.*) su „atipični“ ili mastociti sluznica. Mastociti osetljivi na formalin su dominantni u sluznicama, dok se formalin rezistentni mastociti prevashodno nalaze u submukozi gastrointestinalnog trakta i koži pasa (Becker *i sar.*, 1985; De Mora *i sar.*, 2006).

Na osnovu ranih istraživanja, kod ljudi su opisane dve vrste mastocita na osnovu razlike u sadržaju neutralnih proteaza, odgovora na stimulse i ekspresije površinskih antigena (Schwartz *i sar.*, 1987; Irani *i sar.*, 1989; Schwartz, 2006). Kod pasa, mastociti se mogu podeliti na himaza, triptaza i himaza i triptaza pozitivne mastocite (Irani *i sar.*, 1989; Noviana *i sar.*, 2004). U novije vreme, naučnici smatraju da kod zrelih mastocita postoji mogućnost promene sadržaja medijatora, površinskih antigena ćelije, kao i ekspresije receptora na bazi sazrevanja, statusa aktivacije i interakcije sa mikrookolinom (Valent *i sar.*, 2010; Galli *i sar.*, 2011).

Na osnovu *toluidin blue* bojenja, mastociti se mogu podeliti na aktivirane mastocite koji imaju mali broj granula ili uopšte nemaju granule i mastocite u stanju mirovanja sa velikim granulama u citoplazmi (Schulman *i sar.*, 1983).

Mastociti imaju važnu ulogu u urođenom i stečenom imunitetu, bakterijskim infekcijama, kao i u alergijskim i autoimunim reakcijama (Theoharides *i sar.*, 2010). Prilikom prvog kontakta sa antigenom, u organizmu dolazi do stvaranja antitela (IgE), koja se se preko Fc fragmenta vezuju za receptore na membrani mastocita, bazofilnih granulocita i trombocita. Ponovno

unošenje antigena u senzibilisani organizam indukuje, između ostalog, degranulaciju mastocita, pri čemu se oslobađaju brojni medijatori (primarni efektni medijatori, proteoglikani, neutralne proteaze, triptaza, himaza, karboksipeptidaza i kisele hidrolaze). Najvažniji su primarni efektni medijatori, kao što su histamin, prostaglandin D<sub>2</sub>, leukotrijeni i faktor aktivacije trombocita (*Platelet Activating Factor* – PAF, eng.). Pored započinjanja akutne alergijske reakcije, mastociti su odgovorni i za otpočinjanje hronične alergijske reakcije preko svojih medijatora IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, i TNF- $\alpha$  (Kosjerina, 1999).

Medijatori koje sintetišu mastociti mogu se podeliti na 3 grupe: izmenjene, novosintetisane lipidne medijatore i citokine i hemokine. U izmenjene medijatore spadaju histamin, serotonin, neutralne proteaze, triptaze, proteoglikani i neki citokini, kao što je TNF- $\alpha$  (Caughey, 2007; Shahid, 2009). Ovi medijatori se brzo izlučuju i utiču na pojavu edema, bronhokonstrikciju, povećanje vaskularne propustljivosti i drugih promena koje prate alergijsku reakciju. Novosintetisani lipidni medijatori obuhvataju prostaglandine, leukotriene, faktor aktivacije trombocita i nervni faktor rasta (Freeman *i sar.*, 2004; Boyce *i sar.*, 2007; Tsuda *i sar.*, 2011). Ovi medijatori se oslobađaju 15 minuta do jedan sat nakon aktivacije ćelije i uglavnom izazivaju simptome alergije (Harizi *i sar.*, 2008). Od citokina, najbitniji su IL-4, IL-5, transformišući faktor rasta beta (*Transforming growth factor beta* - TGF- $\beta$ , eng.) i TNF- $\alpha$  (Bloemen *i sar.*, 2007).

Za razliku od dobro poznate aktivacije mastocita preko receptora za IgE tokom alergijske reakcije, istraživanja pokazuju da mastociti mogu delovati kao efektni ćelije u oba oblika odbrane organizma preko direktne aktivacije *toll-like* receptora na mastocitima od strane mikroorganizama (Supajatura *i sar.*, 2002). Međutim, tokom inflamatornih procesa retko dolazi do degranulacije mastocita. Smatra se da mastociti u nealergijskim procesima deluju stvaranjem medijatora, ali uz izostanak degranulacije (Theoharides *i sar.*, 2007). U ovim slučajevima mastociti direktno deluju na patogen putem fagocitoze i stvaranjem slobodnih radikala kiseonika (Malaviya *i sar.*, 1994) ili stvaranjem antimikrobnih peptida, kao što su katelicidin (Di Nardo *i sar.*, 2003) ili himaze (Metz *i sar.*, 2008). Takođe, mastociti mogu da oslobađaju proteaze koje razgrađuju toksične peptide nastale tokom bakterijske infekcije (Maurer, 2004). Mastociti stvaraju citokine i hemokine koji obuhvataju klasične proinflamatorne medijatore, kao što su tumor nekrotični faktor i IL-1 $\beta$ , ali i citokine koji su povezani sa antiinflamatornim ili imunomodulatornim efektima, kao što su IL-10 i TGF- $\beta$  (Marshall *i sar.*, 2004).

Pored direktne, moguća je i indirektna aktivacija mastocita, koja se uglavnom ispoljava tokom sekundarnih i ponovljenih infekcija. Mastociti takođe imaju receptore za IgG i različite komponente komplekta (C3a i C5a), te stoga potencijalno mogu odgovoriti i na unošenje opsonizovanih patogena. Uloga pomenutih receptora u aktivaciji mastocita tokom infekcije je još uvek nedovoljno definisana (Urb *i sar.*, 2012), ali se smatra da putem ovog načina aktivacije dolazi do degranulacije mastocita, proizvodnje lipidnih medijatora i stvaranja različitih citokina i hemokina (Marshall *i sar.*, 2004). S druge strane, C3a komponenta komplekta, ali ne i C5a, inhibira degranulaciju mukoznih mastocita (Erdei *i sar.*, 2004). Nadalje, uloga mastocita u urođenom imunitetu nije ograničena na delovanje protiv bakterija, već je opisano i delovanje mastocita u toku virusnih i parazitskih infekcija. (Marshall *i sar.*, 2004).

### 2.1.2. Mastocitoza i mastocitomi

Povećanje broja mastocita u tkivima (mastocitoza) može nastati kao posledica pojačanog dotoka progenitornih ćelija iz kostne srži ili zbog proliferacije mastocita u samim tkivima. Mastocitoza može nastati kao posledica reaktivne mastocitoze kod različitih oboljenja i malignih neoplazmi (različitih od mastocitoma), kao i kod sistemske mastocitoze i drugih neoplastičnih procesa. Reaktivna mastocitoza se najčešće sreće kod bronhijalne astme i urtikarija (Dunphy, 2005; Božić, 2007; Pohlman, 2010).

Neoplastična proliferacija mastocita javlja se u formi mastocitoma (*Mast Cell Tumor – MCT*, eng.), koji je najčešći tumor kože kod pasa i drugi po učestalosti kod mačaka (Thamm *i sar.*, 2007). Mastocitna leukoza se retko sreće kod pasa (McGavin *i sar.*, 2001). Sistemska mastocitoza se ne može razlikovati od reaktivne mastocitoze na osnovu određivanja mastocita u krvnom razmazu, ali postoje mišljenja da se mastociti kod sistemske mastocitoze morfološki razlikuju od onih koji se javljaju kod reaktivne mastocitoze. Sistemska mastocita je redak poremećaj koji se karakteriše nakupljanjem mastocita u različitim organima, kao što su kostna srž, slezina i jetra, uz moguće prisustvo promena na koži (*urticaria pigmentosa*) (Stevens *i sar.*, 2001). Naziva se još i visceralna forma mastocitoma ili diseminovana mastocitoza (Thamm *i sar.*, 2007). Mnogo češće se sreće kod mačaka nego kod pasa (Dahm *i sar.*, 2001). Kod pasa, sistemske mastocitozi gotovo uvek prethodi nediferentovana primarna kožna lezija. Zabeleženi su i slučajevi primarnog mastocitoma u gastrointestinalnom traktu pasa (Thamm *i sar.*, 2007).

Pored pasa, tumori mastocita su opisani i kod mačaka (Lamm *i sar.*, 2009) i konja (Leadbeater *i sar.*, 2010). Ređe se javljaju kod goveda (Palyada *i sar.*, 2008), ovaca (Johnstone, 1972), koza (Allison i Fritz, 2001) i svinja (Migaki i Langheinrich, 1970).

U humanoj medicini povećan broj mastocita opisan je kod oboljenja kao što su reumatoidni artritis, psorijaza, astma, fibroza pluća, Kronova bolest, ulcerozni kolitis, kardiovaskularne bolesti i drugih (Harvima *i sar.*, 2008; Chichlowski *i sar.*, 2010).

## **2.2. Kutani mastocitom pasa**

Mastocitomi vode poreklo iz kostne srži, iz linije opredeljene za mastocite, ali se zbog svoje lokalizacije izučavaju u okviru tumora kože. Sastavljeni su od različito diferentovanih mastocita (Aleksić-Kovačević *i sar.*, 2005) koji se uočavaju kao okrugle ćelije sa različitom količinom granula u citoplazmi, poređane u redove ili grupe (Strefezzi *i sar.*, 2009; Jovanović *i sar.*, 2012). Pripadaju grupi okruglo-ćelijskih tumora, zajedno sa limfomom, plazmocitomom, histiocitomom i transmisivnim veneričnim tumorom (London *i sar.*, 2003; Strefezzi *i sar.*, 2009).

Pojedinačne ili multiple nodularne proliferacije mastocita javljaju se kod svih vrsta domaćih životinja, ali su najčešće kod pasa (Jubb *i sar.*, 2007; Jovanović *i sar.*, 2012). Mastocitomi pasa pokazuju ogromnu raznolikost u izgledu, kliničkoj slici, pojavi metastaza i odgovoru na terapiju, tako da predstavljaju značajan problem u pogledu terapije i prognoze (Morris *i sar.*, 2001).

### **2.2.1. Etiologija**

Etiologija mastocitoma je nepoznata, ali se smatra da je, kao i kod većine neoplazmi, multifaktorijalna. Predispozicija pojedinih rasa govori u prilog značaja genetske komponente u nastanku mastocitoma (Welle *i sar.*, 2008). Pojedina istraživanja navode virusnu etiologiju mastocitoma, s obzirom da je uspelo prenošenje ove neoplazme korišćenjem ekstrakta tumora, a daljim ispitivanjima materijala nisu uočene virusne partikule (Misdorp, 2004).

Veza između mastocitoma i hormona je još uvek sporna. Receptori za estrogen su uočeni u citosolu malog broja ćelija mastocitoma, dok je jedan od ispitanih tumora imao i receptore za progesteron (Elting *i sar.*, 1982; Misdorp, 2004). U drugom ispitivanju, kod 6 od 9 mastocitoma

je utvrđeno da ne sadrže receptore za estrogen, dok je za 3 tumora bilo sporno (Larsen *i sar.*, 1989; Misdorp, 2004).

Noviji radovi ističu ulogu površinskog receptora tirozin kinaze u etiologiji mastocitoma (London *i sar.*, 2005). Smatra se da su mutacije c-KIT protoonkogeni, koji kodira receptor faktora rasta matične ćelije, bitne za nastanak i razvoj mastocitoma (Strefezzi *i sar.*, 2009).

Osim genetskih mutacija, neki autori navode da hronična inflamacija kože može imati ulogu u nastanku mastocitoma (Govier, 2003). Međutim, dokumentovano je samo nekoliko slučajeva mastocitoma, čiji se nastanak povezuje sa hroničnim dermatitisom, ožiljkom ili primenom iritantnih sredstava (Welle *i sar.*, 2008).

### 2.2.2. Incidenca i faktori rizika

Tumori mastocita su veoma retki u humanoj populaciji i uglavnom su uvek benigni, dok kod pasa oni čine 7 – 21% ukupnog broja tumora kože i mogu imati vrlo agresivan klinički tok sa metastazama u limfnim čvorovima, jetri, slezini i kostnoj srži (Fulciniti *i sar.*, 2007).

U većini radova se navodi da ne postoji predispozicija mastocitoma vezana za pol, niti da pol ima ulogu u dužini preživljavanja pasa kod kojih je dijagnostikovano mastocitom (Baker-Gabb *i sar.*, 2003), dok se kao rase kod kojih se češće javlja mastocitom navode bokser, bostonski terijer, bul terijer, bul mastif, koker španijel, staford terijer, foks terijer, engleski buldog, labrador-retriver, zlatni retriver, bigl, šnauzer, šar-pej, ridžbek (Welle *i sar.*, 2008). Iako se navodi da su bokseri rasa kod koje se najčešće javlja mastocitom, oni uglavnom imaju mastocitome nižeg stepena maligniteta, koji imaju povoljniju prognozu (Thamm *i sar.*, 2007). Nalaz mastocitoma je najčešći kod pasa starosti 7,5 – 9 godina (Scott *i sar.*, 2001), mada postoje opisani slučajevi mastocitoma kod pasa starosti 4 – 6 meseci (Mukaratirwa *i sar.*, 2005).

### 2.2.3. Patogeneza

Iako je etiologija mastocitoma još uvek nedovoljno razjašnjena, u novijim radovima se sve više ističe značaj genetske komponente. U proseku, 50% od slabije diferentovanih/nediferentovanih mastocitoma pasa ima mutacije c-KIT protoonkogeni, odnosno 15% od ukupnog broja mastocitoma (Zemke *i sar.*, 2002; Jones *i sar.*, 2004; Webster *i sar.*,

2006). Prisustvo mutacija c-KIT protoonkogena i aberantna lokalizacija KIT proteina smatraju se bitnim činiocima za prognozu razvoja mastocitoma (Jones *i sar.*, 2004; Webster *i sar.*, 2004).

Receptor za faktor rasta matične ćelije (KIT protein), koji se normalno nalazi na površini hematopoetskih ćelija i mastocita, igra značajnu ulogu u rastu i diferencijaciji ovih ćelija. KIT receptor je transmembranski receptor kinaza tip III koga kodira c-KIT protoonkogen koji se kod pasa nalazi na 13. hromozomu. Poremećaji u ekspresiji mogu doprineti neoplastičnoj transformaciji (Misdorp, 2004; Takeuchi *i sar.*, 2010). KIT receptor se sastoji od ekstracelularnog ligand-vezujućeg domena, transmembranskog dela i citoplazmatskog „repa“.

Aktiviran KIT receptor vezuje i fosforiliše intracelularne proteine, otpočinjući kaskadnu reakciju, koja za rezultat ima niz bioloških aktivnosti, kao što su proliferacija, migracija, sazrevanje i opstanak hematopoetskih matičnih ćelija, mastocita, melanocita i drugih. Ekspresija KIT receptora dokazana je imunohistohemijskim bojenjem, kako na površini normalnih, tako i na površini neoplastično transformisanih mastocita pasa. Povećana ekspresija zabeležena je kod slabo diferentovanih i nediferentovanih mastocitoma (Welle *i sar.*, 2008; El-Agamy, 2012).

Izuzev membranske ekspresije, opisana je ekspresija KIT proteina fokalno i difuzno u citoplazmi. Kod neoplastičnih mastocita, KIT protein se akumulira u citoplazmi, prvenstveno u blizini jedra (Reguera *i sar.*, 2000; Kiupel *i sar.*, 2004b). Povećano prisustvo KIT receptora u citoplazmi (fokalno ili difuzno) je u korelaciji sa kraćim preživljavanjem pasa sa mastocitomom, kao i sa kraćim intervalom do remisije bolesti u odnosu na mastocitome kod kojih je povećana ekspresija membranskih KIT receptora (Webster *i sar.*, 2004).

KIT receptor se može aktivirati putem 2 mehanizma: ligand zavisnim i ligand nezavisnim mehanizmom. Ligand zavisni mehanizam je kod pasa slabo ispitan, ali su brojni radovi vezani za ispitivanja u humanoj medicini koji navode da se aktivacija odvija vezivanjem SCF za KIT receptor. Ligand nezavisni mehanizam aktivacije, iako ne u potpunosti poznat, povezuje se sa najmanje dve promene. Prva se odnosi na prekomernu ekspresiju KIT proteina, što dovodi do konstantno visokog nivoa njihove aktivacije, dok se druga vezuje za mutacije c-KIT protoonkogena koje uzrokuju fosforilaciju KIT receptora (Kitayama *et al.*, 1995; London *i sar.* 1996; Turin *i sar.*, 2006).

S obzirom da c-KIT protoonkogen kodira KIT receptor, mutacije ovog gena mogu dovesti do aktivacije KIT receptora u odsustvu liganda (SCF). Mutacije koje dovode do ovakvih promena identifikovane su kod mastocitoma pasa, pre svega na eksonu 11 (nešto ređe na eksonu

8, 9 i 12) i sastoje od internih tandem duplikacija (*Internal Tandem Duplication* – ITD, eng.), delecija i tačkastih mutacija. Eksoni 8 i 9 pripadaju ekstracelularnom domenu, ekson 10 transmembranskom, dok 11 i 12 pripadaju intracelularnom domenu i to negativnom regulatornom jukstamembranskom domenu (Letard *i sar.*, 2008; Takeuchi *i sar.*, 2010). Istraživanja pokazuju da su c-KIT mutacije u značajnoj vezi sa histološkom gradacijom mastocitoma, odnosno da su u većem stepenu prisutne kod slabo diferentovanih i nediferentovanih mastocitoma, tj. kod mastocitoma II i III stepena maligniteta prema Patnaikovoj gradaciji mastocitoma (Patnaik *i sar.*, 1984; Zemke *i sar.*, 2002; Webster *i sar.*, 2006; Letard *i sar.*, 2008). Istraživanja pokazuju da je kod tumora kod kojih su izražene mutacije veća mogućnost pojave metastaza i remisije. Osim toga, urađene su dve velike studije po pitanju povezanosti prisustva mutacije i histološke gradacije tumora, koje su za rezultate imale odsustvo mutacija kod svih 24 mastocitoma, odnosno kod 12 dobro diferentovanih mastocitoma, zatim prisustvo mutacije kod 8 od 58 i kod 42 od 119 srednje diferentovanih mastocitoma i prisustvo mutacije kod 4 od 6, odnosno kod 9 od 26 slabo diferentovanih/nediferentovanih mastocitoma (Downing *i sar.*, 2002; Zemke *i sar.*, 2002).

London *i sar.* (1996) su ukazali na ekspresiju KIT receptora na malignim mastocitima, a nekoliko godina kasnije su dokazali i prisustvo internih tandem duplikacija na eksonu 11 c-KIT protoonkogenom kod približno 30% mastocitoma pasa (London *i sar.*, 1999). Interne tandem duplikacije su najčešći vid mutacija c-KIT protoonkogenom kod mastocitoma pasa (Zemke *i sar.*, 2002; Jones *i sar.*, 2004). Pokazalo se da tandem duplikacije u jukstamembranskom domenu mogu aktivirati KIT receptor bez prisustva liganda SCF (London *i sar.*, 1999; Ma *i sar.*, 1999).

C-KIT mutacije i aberantna lokalizacija KIT proteina su povezani sa lošijom prognozom ishoda mastocitoma. Takođe se smatra da su u vezi sa povećanom ekspresijom Ki-67 i argirofilnim nukleolarnim organizacionim regionima (*Agyrophilic Nucleolar Organiser Region* – AgNOR, eng.), koji predstavljaju markere ćelijske proliferacije (Webster *i sar.*, 2007). Drugi autori navode da c-KIT mutacije i promene u lokalizaciji KIT proteina mogu biti sasvim odvojeni, odnosno da se javljaju nezavisno jedan od drugog (Webster *i sar.*, 2006). Ova hipoteza je podržana činjenicom da je 28 ispitanih mastocitoma imalo promenjenu KIT lokalizaciju bez prisustva c-KIT mutacije (internih tandem duplikacija). Stoga se smatra da za aberantnu KIT lokalizaciju mogu biti odgovorne i mutacije u drugim domenima c-KIT protoonkogenom, zatim

promene u ćeliji, kao što su poremećaji intracelularnog transporta, poremećaji funkcije Goldži kompleksa, kao i uticaj različitih faktora (Webster *i sar.*, 2006).

S druge strane, premda mutacije protoonkogeni c-KIT nisu detektovane u oko 60% slučajeva mastocitoma, postoje mišljenja da mutacije ovog gena najviše utiču na razvoj i progresivan tok pojedinih mastocitoma (prevažodno malignih mastocitoma, odnosno slabo diferentovanih i nediferentovanih), dok je sama inicijacija nastanka mastocitoma mnogo kompleksnija (Welle *i sar.*, 2008). Osim ekspresije KIT receptora i mutacija c-KIT gena, u patogenezi mastocitoma, proučavani su i ekspresija vaskularnog endotelnog faktora rasta (*Vascular endothelial growth factor* –VEGF, eng.), uloga prostaglandina E2, supresora karcinoma pluća 1 (*Tumor Suppressor in Lung Cancer 1* –TSLC1, eng.) i serotonina i njegovog receptora (Froberg *i sar.*, 2009; Amorim *i sar.*, 2010; Taylor *i sar.*, 2010). Drugi autori navode da su od pomenutih faktora, TSLC1 i receptori za serotonin imali manju ekspresiju kod mastocitoma višeg stepena maligniteta, što ukazuje na njihov gubitak funkcije tokom karcinogeneze, međutim, njihova uloga u razvoju mastocitoma je ipak nejasna (Schlieben *i sar.*, 2012).

Vaskularni endotelni faktor rasta je bitan u progresiji tumora sa dva aspekta. Pre svega, kao ključni regulator neovaskularizacije tumora (Schmid *i sar.*, 2010), a s druge strane mnoge neoplastične ćelije koriste VEGF signalizaciju kao mehanizam opstanka (Roskoski, 2007; Ellis i Hicklin, 2008). Familija VEGF obuhvata pet izoformi VEGF (A - D), faktore rasta placente (*Placental Growth Factor* - PIGF1 i PIGF2, eng.), kao i izoforme koje se javljaju zbog različitog uplitanja mRNK. VEGF (A - D) i PIGF1 su ligandi za receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta (*Vascular endothelial growth factor receptor* –VEGFR, eng.) koji obuhvata RTK VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 i koreceptore neuropiline 1 i 2 (Ferrara *i sar.*, 2003; Roskoski, 2007).



Uloga VEGF kod mastocitoma nije u potpunosti razjašnjena. Dve studije su pokazale da na malignim mastocitima mogu biti ekspimirani i VEGFR1 i VEGFR2, ali njihov značaj nije sasvim ispitan (Rebuzzi *i sar.*, 2007; Sekis *i sar.*, 2009). Jedno od pomenutih istraživanja navodi i da je ekspresija VEGF intenzivnija kod neoplastičnih ćelija mastocitoma višeg stepena maligniteta, međutim smatra se da su ovakvi nalazi subjektivni i da nije utvrđena ni gustina mikrocirkulacije, niti vreme preživljavanja pasa sa ovakvim mastocitomima (Rebuzzi *i sar.*, 2007; Thompson *i sar.*, 2010).

#### 2.2.4. Morfološke osobine mastocitoma

Mastocitomi se kod pasa najčešće sreću na trupu (50-60%), ekstremitetima (25 - 40%), glavi i vratu (10%). Na skrotumu, međici, leđima i repu tumor se ređe sreće (Welle *i sar.*, 2008). Makroskopski izgled mastocitoma varira u zavisnosti od progresije i stepena histološke diferencijacije. *Dobro diferentovani* mastocitomi se najčešće pojavljuju kao nodularne, nekapsulirane mase gumaste konzistencije, iznad kojih su polja kože bez dlake. Veličina varira od 1 do 4 cm u prečniku a klinički podsećaju na lipom. *Slabije diferentovani* mastocitomi imaju tendenciju bržeg rasta, manje su ograničeni i često praćeni inflamacijom i edemom okolnog tkiva (Jubb *i sar.*, 2007). Na njihovoj površini mogu nastati ulceracije, dok se u blizini mogu razviti manji čvorići, tzv. satelitski noduli. Većina mastocitoma nije pigmentisana, ali se kao povremen nalaz mogu uočiti eritematozni i hiperpigmentisani noduli (Welle *i sar.*, 2008). Lezije na distalnim delovima ekstremiteta, usnama i u području prepona mogu biti u vidu slabo definisanih otoka ili nalik dermatitisu uzrokovanom lizanjem (*acral lick dermatitis*, eng.) (Gross *i sar.*, 2005; Welle *i sar.*, 2008).

Klinički znaci kod pasa sa mastocitomom se mogu komplikovati oslobađanjem histamina, heparina i drugih vazoaktivnih amina iz degranulisanih mastocita. Mehanička manipulacija tokom ispitivanja ili uklanjanja tumora može rezultirati u degranulaciji mastocita, sa posledičnim eritemom i urtikarijama na okolnom tkivu, a trljanjem pomenjenih mesta, one dobijaju jako crvenu, nekada i modru boju i može se stvoriti otok (tzv. Darieov znak) (Morris *i sar.*, 2001; Govier 2003). Histamin stimuliše H2 receptore na parijetalnim ćelijama želuca povećavajući lučenje želudačne kiseline, što može dovesti do pojave ulceracija, sa posledičnim povraćanjem, anoreksijom, melenom i bolom u abdomenu (Wallace, 2002; Thamm *i sar.*, 2007).

Maligni mastocitomi mogu metastazirati putem limfe ili krvi i u većini slučajeva, prvi znak metastaze je uvećanje regionalnog limfnog čvora. Metastaze mastocitoma na plućima su retke, dok se uglavnom javljaju na slezini, jetri i bubrezima. Koža je takođe često mesto za razvoj metastaza (Morris *i sar.*, 2001).

Dijagnoza mastocitoma postavlja se na osnovu citoloških bojenja preparata dobijenih pravljenjem razmaza dobijenog biopsijom tumora iglom (*fine needle aspiration*) ili pravljenja otisak preparata tkiva tumora. Od metoda bojenja, najčešće se koriste *Romanowsky* tip bojenja (npr. *Diff-Quik*, *Giemsa*, *Wright's*) ili *New Methylene Blue* (London *i sar.*, 2003; Strefezzi *i sar.*, 2009). Čelije su okrugle sa okruglim do ovalnim jedrom koje je uglavnom centralno postavljeno, ali često može biti maskirano intenzivno obojenim citoplazmatskim granulama. Od ostalih ćelija može se videti različit broj eozinofilnih granulocita i/ili vretenastih ćelija, najverovatnije fibroblasta (Scott *i sar.*, 2000; Welle *i sar.*, 2008).

Zbog svog jedinstvenog bojenja, mastociti se mogu uočiti pomoću mikroskopa u obojenim preparatima, već pri uvećanju 40 puta. Kod pojedinih životinjskih vrsta visoko granulisani bazofilni granulociti se mogu pogrešno protumačiti kao mastociti (Feldman *i sar.*, 2006).

Na osnovu citologije postavlja se tačna dijagnoza kod 92% do 96% mastocitoma (Thamm *i sar.*, 2007; Welle *i sar.*, 2008). Pojedini autori navode da se slabo granulisane ćelije bolje mogu uočiti citološki nego histopatološki zbog citoplazmatskih granula (Duncan *i sar.*, 1979; Strefezzi *i sar.*, 2009). Kod slabo diferentovanih tumora količina granula u neoplastičnim mastocitima je često nedovoljna da bi bile dobro vidljive, stoga se preporučuje da se za vizuelizaciju citoplazmatskih granula koriste *Giemsa* i *toluidin blue* bojenja (London *i sar.*, 2003; Strefezzi *i sar.*, 2009).

Dok se na osnovu citoloških bojenja može utvrditi da li je u pitanju mastocitom, za klasifikaciju tumora je neophodan histopatološki pregled biopsiranog tkiva (Bostock, 1973; Patnaik *i sar.*, 1984). Citoplazmatske granule boje se svetlo sivo-plavo hematoksilinom-eozinom ili ljubičasto, upotrebom *toluidine blue* bojenja. Stromu uglavnom čini kolagen i varira od oskudne do veoma zastupljene, a može izgledati i edematozno ili se uočava prisustvo hijalina (Welle *i sar.*, 2008).

Bojenje srebrom omogućava određivanje prisustva argirofilnog organizatora nukleolusa koji je bitan prognostički pokazatelj. Takođe se koristi i niz imunohistohemijskih bojenja kojima se vizuelizuju markeri proliferacije (Newman *i sar.*, 2007; Webster *i sar.*, 2007).

Diferencijalno dijagnostički, mastocitomi (naročito slabo diferentovani) se mogu zameniti sa drugim okruglo-ćelijskim tumorima (limfomom, plazmocitomom, histiocitomom i transmisivnim veneričnim tumorom) (Welle *i sar.*, 2008; Oliveira *i sar.*, 2012). Prisustvo eozinofilnih granulocita ne može se striktno vezati za mastocitome, iz razloga što oni mogu biti prisutni i kod kutanih limfoma. Neepiteliotropni kutani limfomi uglavnom imaju ćelije sa manje citoplazme i okruglim jedrom. Plazmocitomi se sastoje iz grupa tumorskih ćelija, umerenog polimorfizma, često sa dva ili više jedra.

Generalno, mastocitomi pasa su nekapsulirane mase u koži ili potkožju, sastavljene od okruglih ćelija poređanih u redove. Iznad manjih mastocitoma, epidermis je intaktan, dok je iznad većih uglavnom ulcerisan. Kolagena stroma varira od oskudne do veoma razvijene, sa prisustvom hijalina, edema i nekroze. Pojedini mastocitomi su veoma kompaktni i pokazuju nisku celularnost. Kolageni snopovi mogu izgledati nalik keloidu i podsećati na fibrom pasa (Gross *i sar.*, 2005; Welle *i sar.*, 2008).

Histopatološke analize mastocitoma ukazuju na čestu difuznu ili fokalnu infiltraciju eozinofilnim granulocitima različitog intenziteta (Scott *i sar.*, 2000; Goldschmidt i Hendrick, 2002; Gross *i sar.*, 2005). Prisustvo eozinofilnih granulocita u vezi sa tumorima, opisano je u humanoj medicini kod različitih tipova karcinoma, zatim kod adenokarcinoma i ređe kod sarkoma. Pojedini autori smatraju da prisustvo eozinofilnih granulocita ima zaštitnu ulogu i da sprečava progresiju tumora, budući da su eozinofilni granulociti uključeni u imunološki odgovor i da učestvuju u sintezi i oslobađanju citokina. Ne samo da mogu biti uključeni u inflamatorni proces koji obično prati tumor, već deluju sinergistički sa makrofagima pojačavajući njihovu antitumorsku aktivnost (Navega, 2011).

### 2.2.5. Klasifikacija mastocitoma

Histopatološki nalaz je jedan od glavnih parametara za klasifikaciju mastocitoma (Patnaik, 1984). Prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (*The World Health Organization* – WHO, eng.) mastocitomi pasa se svrstavaju u četiri stepena na osnovu kliničke manifestacije. I stepen - solitarni tumor ograničen na dermis, pri čemu nije zahvaćen regionalni limfni čvor. Može se podeliti na Ia stepen kada ne postoje sistemski znaci i Ib stepen kada su ispoljeni sistemski znaci. II stepen - solitarni tumor ograničen na dermis, pri čemu je zahvaćen regionalni limfni čvor. Razlikuju se IIa stepen bez sistemskih znakova kod obolelih pasa i IIb stepen kada postoje sistemski znaci. III stepen - multipli tumori kože ili jedan veliki infiltrirajući tumor sa ili bez zahvaćenosti regionalnog limfnog čvora. Takođe se može podeliti na IIIa i IIIb stepen u zavisnosti da li postoje ili ne sistemski znaci bolesti. IV stepen - svaki tumor sa udaljenim metastazama ili recidivi sa metastazama (uključujući prisustvo neoplastičnih mastocita u krvi i/ili koštanoj srži). Prisustvo metastaza, pre svega na slezeni i jetri, je najvažnije za procenu stepena MCT (Strefezzi *i sar.*, 2009).

Klasifikacija mastocitoma je veoma bitna sa prognostičkog aspekta i izbora terapije. Primarna klasifikaciona determinanta je histološka građa mastocitoma kože. Postoje tri histopatološke klasifikacije (Hottendorf i Neilsen 1967; Bostock, 1973; Patnaik *i sar.*, 1984). Hottendorf i Nielsen nisu gradirali klasifikovane tumore, dok prema Bostock-u, dobro diferentovani mastocitomi pripadaju mastocitomima III stepena maligniteta, a po Patnaik-u su to mastocitomi I stepena maligniteta (Hottendorf *i sar.*, 1967; Patnaik, 1984; Bostock *i sar.*, 1989; Welle *i sar.*, 2008). Najčešći histopatološki sistem klasifikacije je Patnaikov sistem prema kome su tumori podeljeni na tri stepena maligniteta na osnovu stepena diferentovanosti, celularnosti, ćelijske morfologije, mitotskog indeksa i reakcije tkiva. Na primer, na osnovu stepena diferentovanosti, mastocitomi I stepena maligniteta predstavljaju dobro diferentovane tumore koji imaju dobru prognozu, mastocitomi II stepena maligniteta, umereno diferentovane sa upozoravajućom prognozom i mastocitomi III stepena maligniteta su nediferentovani sa lošom prognozom (Tabela 1) (Patnaik, 1984).

*Dobro diferentovani* mastocitomi sastoje se od okrugle, prilično dobro ograničene, ali neinkapsulirane mase sastavljene od okruglih ćelija sa centralno postavljenim malim jedrom, skoro neprimetnim jedarcetom i obilnom, vrlo granulisanom citoplazmom. Granice citoplazme

su jasno uočljive, ćelije su uniformnog oblika, a mitotske figure gotovo nikad nisu prisutne. Tumorske ćelije su poređane u redove ili rastresite ploče odvojene kolagenom. Epidermis je obično intaktan. Prema Patnaik *i sar.* (1984) ovi tumori su ograničeni na interfolikularni dermis, dok drugi autori navode da dobro diferentovani mastocitomi mogu zahvatiti čak i subkutis (Bostock *i sar.*, 1989; Gross *i sar.*, 2005; Welle *i sar.*, 2008). Granice ćelija i citoplazmatske granule prilikom bojenja hematoksilin-eozinom vide se kao sivo-plave linije, odnosno mrlje. Većina mastocitoma I stepena maligniteta se odlikuje prisustvom umerenog do velikog broja eozinofilnih granulocita raspršenih po neoplastičnom tkivu. Nekroza nije uobičajena kod ovog stepena maligniteta tumora (Gross *i sar.*, 2005).

*Srednje diferentovani* mastocitomi su obično većih dimenzija, prodiru u dublje slojeve tkiva i nisu jasno ograničeni kao prethodni, a sastoje se od relativno zbijenih ćelija sa jasno vidljivim granicama, dok je broj citoplazmatskih granula smanjen na račun jedra ili citoplazme. Maligne ćelije su veće, sa više zastupljenim pleomorfizmom. Mogu biti prisutne džinovske, višejedarne ili vretenaste ćelije, kao i mali broj mitotskih figura. Tumorske ćelije su raspoređene u grupe odvojene stromom građenom od kolagena. Stroma može biti izražena, sa prisustvom hijalina i područjima edema i nekroze. Mitotska aktivnost varira i može potpuno izostati ili biti umereno prisutna. Citoplazma je umereno zastupljena i varijabilno granulirana (Patnaik *i sar.*, 1984; Hahn 2002; Gross *i sar.*, 2005; Welle *i sar.*, 2008). Prema Patnaik *i sar.* (1984), mastocitomi II stepena maligniteta zahvataju dublje slojeve dermisa, a mogu zahvatiti i subkutis. Prisustvo eozinofilnih granulocita varira od nekoliko do većeg broja (Gross *i sar.*, 2005).

*Slabo diferentovani i nediferentovani* (anaplastični) mastocitomi su slabo ograničeni i većinom se sastoje od slabo granulisanih, okruglih do poligonalnih visoko pleomorfnih ćelija svetle citoplazme. Ćelije su većinom grupisane u vidu listova ili gnezda. Granice ćelija često nisu jasno izražene, a jedro je veliko, nepravilnog oblika i ima nekoliko jedaraca. Prisutne su višejedarne ćelije, a mitotske figure su brojne. Tumorske ćelije duboko infiltruju subkutis. Nekroze i ulceracije su takođe prisutne (Patnaik *i sar.*, 1984; Gross *i sar.*, 2005; Ginn *i sar.*, 2007; Welle *i sar.*, 2008). Bojenjem *Giemsa-om* i *toluidin blue* metodom postaje vidljiv mali broj citoplazmatskih metahromatskih granula u maloj subpopulaciji malignih ćelija. Granule u citoplazmi mogu biti vrlo male, toliko da je nekada potrebno koristiti imerzioni objektiv za njihovu detekciju. Imunohistohemijska bojenja su ponekad potrebna za potvrdu dijagnoze. Kod

anaplastičnih mastocitoma nalazi se manji broj eozinofilnih granulocita ili su ove ćelije prisutne u vidu manjih grupa (Gross *i sar.*, 2005).

**Tabela 1.** Klasifikacija kutanih mastocitoma pasa na osnovu histoloških osobina (Patnaik, 1984; Thamm *i sar.*, 2007)

| Stepen maligniteta mastocitoma | Patnaikova podela | Mikroskopski opis  |
|--------------------------------|-------------------|--|
| Slabo diferentovani            | 3                 | Visoko pleomorfne ćelije; tumor slabo ograničen; jedra nepravilnog oblika i veličine; česte mitoze; raspršene citoplazmatske granule   |
| Srednje diferentovani          | 2                 | Ćelije su gusto zbijene sa nejasnim citoplazmatskim granicama; odnos jedra i citoplazme je manji nego kod slabo diferentovanih; retke mitoze; više granula nego kod slabo diferentovanih mastocitoma |
| Dobro diferentovani            | 1                 | Ćelije sa jasno definisanom granicom citoplazme imaju pravilno, okruglo ili ovoidno jedro; retke mitoze ili odsustvo mitoze; velika zastupljenost citoplazmatskih granula                            |

Brojna istraživanja su pokazala značajne razlike između dobro diferentovanih i slabo diferentovanih mastocitoma i vremena preživljavanja pacijenta (Tabela 2) (Bostock, 1973; Patnaik, 1984; Bostock *i sar.*, 1989; Simoes *i sar.*, 1994; Murphy *i sar.*, 2004; Thamm *i sar.*, 2007; Romansik *i sar.*, 2007). Sa prognostičkog aspekta, najveći problem su srednje diferentovani mastocitomi, naročito ako se uzme u obzir da su studije pokazale varijacije u klasifikaciji mastocitoma između patologa koji koriste identične sisteme klasifikovanja. Većina neslaganja bila je između mastocitoma I i II stepena maligniteta, odnosno mastocitoma II i III stepena maligniteta (Northrup *i sar.*, 2005; Strefezzi *i sar.*, 2010). Međutim, mnogi autori smatraju da je histološka građa mastocitoma najdosledniji prognostički pokazatelj (Thamm *i sar.*, 2006).

**Tabela 2.** Vreme preživljavanja pasa nakon hiruškog odstranjivanja mastocitoma u odnosu na na histološku građu tumora

| Autor/stepen maligniteta | Broj pasa | Procenat preživelih/br. meseci nakon operacije |
|--------------------------|-----------|--|
| <b>Bostock, 1973/</b>    |           |  |
| Dobro diferentovani      | 39        | 79/7   |
| Srednje diferentovani    | 30        | 37/7   |
| Slabo diferentovani      | 45        | 15/7   |
| <b>Patnaik, 1984/</b>    |           |  |
| Dobro diferentovani      | 30        | 83/48  |
| Srednje diferentovani    | 36        | 44/48  |
| Slabo diferentovani      | 17        | 6/48   |
| <b>Bostock, 1989/</b>    |           |  |
| Dobro diferentovani      | 19        | 90/nema podataka                               |
| Srednje diferentovani    | 16        | 75/nema podataka                               |
| Slabo diferentovani      | 15        | 27/nema podataka                               |
| <b>Murphy, 2004/</b>     |           |  |
| Dobro diferentovani      | 87        | 100/12   |
| Srednje diferentovani    | 199       | 92/12  |
| Slabo diferentovani      | 54        | 46/12  |
| <b>Simoes, 1994/</b>     |           |  |
| Dobro diferentovani      | 33        | 91/20  |
| Srednje diferentovani    | 35        | 35/20  |
| Slabo diferentovani      | 19        | 42/20  |

S druge strane, u literaturi se navodi i sledeći sistem klasifikacije mastocitoma:

Mastocitomi I stepena - 83% pasa preživljava 4 godine; kompaktan rast tumora, monomorfan izgled, dobro granulisani, nema mitotskih figura.

Mastocitomi II stepena - 44% pasa preživljava 4 godine; umereno prisutne citoplazmatske granule, malo mitotskih figura, umerena anizokarioza, povremeno prisutne binuklearne ćelije.

Mastocitomi III stepena - < 10% pasa preživljava 1 godinu; izražene anizocitoza i anizokarioza, slabo granulisana citoplazma, 36 mitotskih figura u polju od 40x, infiltrativni rast (Cheville, 2006).

Brojni su pokušaji da se odrede objektivnije metode za klasifikaciju mastocitoma. Pokazalo se da je *morfometrija jedra* značajno povezana sa histološkim gradiranjem raznih tumora kod ljudi i životinja (Maiolino *i sar.*, 2002; Simeonov *i sar.*, 2007). U okviru morfometrijskih parametara jedra proučavani su, srednji prečnik, obim, faktor pravilnosti i faktor eliptičnosti. Vrednosti prečnika i obima jedra su se povećavale sa povećanjem stepena maligniteta mastocitoma određenog na osnovu histopatološke građe, ali su statistički značajne vrednosti bile samo između II i III stepena maligniteta i I i III stepena maligniteta. Faktor

pravilnosti i faktor eliptičnosti se nisu značajno menjali u zavisnosti od histopatološkog stepena tumora. Druga ispitivanja ukazuju na kraće vreme preživljavanja što su veće vrednosti morfometrijskih parametara jedra (Strefezzi *i sar.*, 2003; Strefezzi *i sar.*, 2009).

*Infiltrativni rast tumora* se posmatra kao histološka invazivnost tumora i predstavlja najvažniji prognostički činilac i trebalo bi ga određivati u rutinskoj dijagnostici kako bi se predvideo postoperativni ishod i preživljavanje psa. Pacijenti sa sporo rastućim, lokalizovanim tumorom imaju bolju prognozu (Preziosi *i sar.*, 2007).

*Mitotski indeks (Mitotic Index – MI, eng.)* se pokazao kao bitan prognostički faktor ishoda bolesti za različite oblike tumora kod ljudi i životinja. Nekoliko studija je pokazalo prognostički značaj MI kod kutanog mastocitoma pasa (Bostock *i sar.*, 1989; Strefezzi *i sar.*, 2003; Romansik *i sar.*, 2007; Welle *i sar.*, 2008). Srednje vreme preživljavanja pasa sa  $MI \leq 5$  bilo je značajno duže (70 meseci), nego pasa sa  $MI \geq 5$  (2 meseca), bez obzira na stepen maligniteta tumora, određen na osnovu histopatoloških osobina (Romansik *i sar.*, 2007). Međutim, smatra se da mitotski indeks ne može biti odlučujući za ocenjivanje, već da ga treba smatrati dodatnim parametrom pri klasifikaciji mastocitoma (Strefezzi *i sar.*, 2003).

Kao bitni prognostički faktori navode se i markeri proliferacije, od kojih se najčešće određuju histohemijski marker arigrofilni organizator nukleolusa i imunohistohemijski markeri Ki-67 i nuklearni antigen proliferacije ćelija (*Proliferating Cell Nuclear Antigen – PCNA, eng.*) (Madewell, 2001). Novija istraživanja, kao negativne prognostičke faktore, navode povećano prisustvo AgNOR, povećanu imunohistohemijsku ekspresiju PCNA/Ki-67 i CD117, kao i povećanu vaskularizaciju i/ili mitotski indeks (Bergman, 2010).

*Argirofilni organizator nukleolusa (AgNOR)* je subjedinica jedra uključena u transkripciju RNK (Derenzini, 2000). Proteini AgNOR-a su skup nuklearnih proteina koji su prisutni u jedrima svih ćelija a akumuliraju se u visoko proliferišućim ćelijama (Mukaratirwa, 2005a). Bojenje organizatora nukleolusa (*Nucleolar Organiser Region – NOR, eng.*) srebrnim koloidom je u literaturi označeno kao vrlo pouzdan histohemijski prognostički metod. Organizatori nukleolusa koji se aktivno transkribuju su argirofilni i mogu se vizuelizovati primenom srebrnog koloida (Kiupel *i sar.*, 1998; Jelesijević *i sar.*, 2003). Ova relativno jednostavna metoda može se izvesti i na citološkim i na histološkim preparatima (Thamm *i sar.*, 2007). Služe kao markeri brzine razvoja i napredovanja tumora i metaboličke aktivnosti tumora (Welle *i sar.*, 2008). Pojedini autori navode da je količina AgNOR po jedru proporcionalna



stepenu ćelijske proliferacije i vremenu deobe ćelije *in vitro*, odnosno rastu tumora *in vivo* (Ofner *i sar.*, 1992; Trere *i sar.*, 1996; Webster *i sar.*, 2007; Welle *i sar.*, 2008). Ispitivanje sprovedeno na 50 pasa sa mastocitomom pokazalo je da je učestalost prisustva AgNOR odličan prognostički pokazatelj (čak bolji od histološkog gradiranja) biološkog ponašanja tumora (Bostock *i sar.*, 1989; Thamm *i sar.*, 2007). Brojne studije su pokazale da je veći broj AgNOR u mastocitomu povezan sa povećanim mortalitetom, lokalnim recidivima i metastazama (Scase *i sar.*, 2006; Webster *i sar.*, 2007).

*Ki-67 monoklonsko antitelo* može se detektovati pomoću imunohistohemijskih bojenja tkiva fiksiranih u formalinu i kalupljenih u parafinu. Ki-67 protein je prisutan u svim aktivnim fazama ćelijskog ciklusa (G1, S, G2 i mitozu), ali ga nema u fazi mirovanja ćelije (G0). Za razliku od antigena ćelijske proliferacije (PCNA), koji je pored uloge u replikaciji DNK, bitan i u popravci DNK, Ki-67 je samo marker proliferacije, što ga čini specifičnijom determinantom frakcije rasta tumora. Zbog ovih osobina, Ki-67 je odličan marker za određivanje proliferišućih ćelija u neoplazmama ljudi i životinja (Abadie *i sar.*, 1999; Mukaratirwa, 2005a; Ozaki *i sar.*, 2007). Određivanje proliferativnog potencijala tumorskih ćelija na osnovu Ki-67 koristi se pri gradiranju pojedinih tumora u humanoj populaciji, kao što su karcinom dojke, karcinom mokraćne bešike, tumori mozga i drugi (Terzić, 2010).

Ispitivanja su pokazala da su prisutne značajne razlike u ekspresiji Ki-67 kod mastocitoma I i II stepena maligniteta, odnosno II i III stepena maligniteta, čak i u slučajevima kada nije bilo značajnih razlika u MI između mastocitoma pomenutih stepena maligniteta (Sakai *i sar.*, 2002).

Prema Patnaikovoj podeli, mastocitomi gradusa I imaju prosečnu vrednost Ki-67 indeksa 2,5, dok mastocitomi gradusa II i III imaju vrednost Ki-67 indeksa 6,0 i 20,6 (Vascellari *i sar.*, 2012).

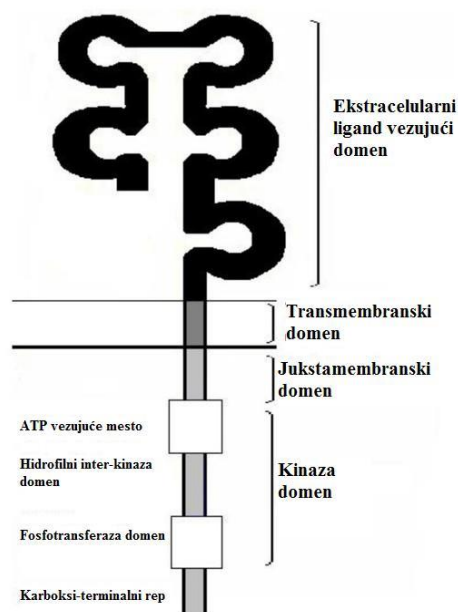
Kako bi se u potpunosti procenila proliferacija ćelija, potrebno je odrediti kako Ki-67, tako i AgNOR. Vreme koje protekne do deobe ćelije, a koje se određuje na osnovu broja AgNOR, kao i broj ćelija aktivno uključenih u ćelijski ciklus, meren pomoću Ki-67, blisko je povezano sa progresijom mastocitoma kod pasa. S obzirom na pomenute rezultate, preporučeno je da se određivanje AgNOR i Ki-67 primenjuje kao deo rutinske procene osobina tumora zajedno sa drugim parametrima, kao što su histološka procena, postojanje c-KIT mutacije, ekspresija KIT receptora i drugi (Webster *i sar.*, 2007).

*Antigen ćelijske proliferacije (PCNA)* kodira protein koji se nalazi u jedru i kofaktor je DNK polimeraze delta (Bravo, 1987). Uključen je i u mnoge druge procese u jedru, od kojih naročito treba pomenuti reparaciju DNK (Maga, 2003). PCNA se sintetiše od sredine G1 faze ćelijskog ciklusa i tokom S faze, ali se može detektovati tokom celog ćelijskog ciklusa zbog dugog vremena polu-života (Mukaratirwa, 2005a). Imunohistohemijskim bojenjem na PCNA označavaju se ćelije koje su u deobi ili kod kojih je došlo do reparacije DNK (Simoes *i sar.*, 1994). Pojedine studije su pokazale vezu između PCNA ekspresije s jedne strane i povećanog broja uginuća pasa i vremena koje protekne do ponovne pojave bolesti (Simoes *i sar.*, 1994; Abadie *i sar.*, 1999), dok neki autori smatraju da određivanje samo ekspresije PCNA nema nikakav prognostički značaj kada je u pitanju preživljavanje psa (Scase *i sar.*, 2006; Webster *i sar.*, 2007). Međutim, svi autori se slažu da procenu ekspresije AgNOR i PCNA i histološku procenu treba kombinovati kako bi se dobio najbolji prognostički pokazatelj (Simoes *i sar.*, 1994; Webster *i sar.*, 2007; Welle *i sar.*, 2008).

*CD45RA antigen (Cluster of Differentiation 45 Ready to Use – CD45RA, eng.)* je izoforma antigena CD45 (*Cluster of Differentiation 45– CD45, eng.*) koji pripada familiji protein tirozin fosfataza, a kodira ga tirozin fosfataza receptor tip C gen. CD45 je membranski glikoprotein sa aktivnošću tirozin fosfataze. Ekspirira se na prekursorima i zrelih B i T-limfocitima, granulocitima, histiocitima, mastocitima, folikularnim i dendritičnim ćelijama. CD45 se jako ekspirira na membrani limfocita, dok je njegova ekspresija znatno slabija na membrani histiocita. Ovi receptori se gube na zrelih eritrocitima, megakariocitima i plazma ćelijama (Nakano *i sar.*, 1990). CD45RA se nalazi na T i B – limfocitima, mastocitima, NK ćelijama i mnogim drugim ćelijama. Ne nalazi se na površini eritrocita i trombocita (Terzić, 2010). Stepenn njegove ekspresije na mastocitima može takođe biti bitan prognostički parametar (Welle *i sar.*, 2008).

*KIT protein*, odnosno *CD117* pripada porodici tirozin kinaza receptora i veoma je važan za eritropoezu, limfopoezu, razvoj i funkciju mastocita, megakariopoezu, gametogenezu i melanogenezu. Strukturno i funkcionalno je blizak receptoru za faktor rasta trombocita (*Platelet-Derived Growth Factor – PDGF, eng.*) i faktoru stimulacije rasta kolonija (Roskoski, 2005; Masson *i sar.*, 2009). KIT receptor se nalazi i na normalnim i na neoplastično transformisanim mastocitima (London *i sar.*, 1996; Klopffleisch *i sar.*, 2012). Sastoji se od ekstracelularnog,

transmembranskog, negativnog regularnog jukstamembranskog i podeljenog kinaza domena (Slika 1) (Chan *i sar.*, 2003; Webster *i sar.*, 2006).



**Slika 1.** Shematski prikaz tirozin kinaza receptora (KIT) (Webster *i sar.*, 2006b)

Nedavna istraživanja su ukazala na postojanje kako normalnih (membranskih), tako i aberantnih citoplazmatskih (fokalnih i difuznih) CD117 receptora na mastocitima pasa (Morini *i sar.*, 2004; Gil da Costa *i sar.*, 2007). Ekspresija Ki-67 i broj AgNOR su u korelaciji sa distribucijom CD117 receptora. Broj AgNOR je značajno viši kod mastocitoma sa povećanom ekspresijom citoplazmatskih CD117 receptora. Značajna veza je uočena i između povećane ekspresije citoplazmatskih CD117 receptora i pojave ulceracija, što najverovatnije nastaje kao posledica CD117 posredovanog oslobađanja histamina i serotonina sa posledičniom pojavom svraba i povreda nanetih češanjem (Gil da Costa *i sar.*, 2007). Analiza podataka pokazuje manje povoljnu prognozu u slučajevima veće ekspresije fokalnih citoplazmatskih KIT receptora, nego kada su u pitanju mastocitomi kod kojih je uočena povećana ekspresija difuznih citoplazmatskih receptora, što ukazuje na vezu između ove vrste KIT receptora i agresivnosti tumora (Preziosi *i sar.*, 2004).

Mutacije c-KIT gena koji kodira tirozin kinaza receptor navode se kao bitan faktor za progresiju pojedinih mastocitoma (Downing *i sar.*, 2002; Gleixner *i sar.*, 2007). Prisustvo ovih mutacija se pre svega vezuje za jukstamembranski domen i dovodi se u vezu sa mastocitomima

viših stepena maligniteta prema klasifikaciji izvršenoj na osnovu histopatoloških osobina tumora (Zemke *i sar.*, 2002; Pryer *i sar.*, 2003; London *i sar.*, 2009). Pojedina ispitivanja ukazuju na vezu između postojanja ITD c-KIT gena ili aberantne lokalizacije KIT receptora i povećanih vrednosti ekspresije Ki-67, kao i na značajno povećan indeks proliferacije kod mastocitoma sa ITD (Webster *i sar.*, 2007; Thompson *i sar.*, 2010). C-KIT mutacije su povezane sa višim stepenom histopatološke klasifikacije MCT (Zemke *i sar.*, 2002; Webster *i sar.*, 2006a). Pacijenti sa mastocitomom koji ima ITD, imaju značajno lošiju prognozu u odnosu na pacijente sa mastocitomima bez pomenute mutacije (Webster *i sar.*, 2006a).

#### 2.2.6. Nova klasifikacija

Iako je potvrđeno da je histološka građa mastocitoma u značajnoj korelaciji sa krajnjim ishodom bolesti (Patnaik, 1984), postoji značajna dvosmislenost kada su u pitanju srednje diferentovani tumori (Weisse *i sar.*, 1984), kao i znatne varijacije vezane za subjektivnost istraživača, što je sve skupa uticalo da se dovede u pitanje relevantnost pomenute klasifikacije mastocitoma (Kiupel *i sar.*, 2004a).

Stoga je predložen dvostepeni sistem klasifikacije na mastocitome visokog i niskog stepena maligniteta. Na osnovu ove podele, mastocitomi visokog stepena maligniteta moraju imati ispunjen najmanje jedan od sledećih kriterijuma: najmanje 7 mitotskih figura na 10 hpf (*High-power Fields* – hpf, eng.), najmanje 3 multinuklearne ćelije na 10 hpf, najmanje 3 bizarna jedra na 10 hpf ili prisustvo kariomegalije kod najmanje 10% neoplastičnih ćelija (Kiupel *i sar.*, 2011).

Predloženi dvostepeni sistem gradiranja trebao bi da se koristi pri svakom rutinskom histološkom ispitivanju i dijagnostikovanju mastocitoma. Za mastocitome visokog stepena maligniteta treba primeniti dodatna ispitivanja, kao što su određivanje ekspresije KIT receptora i skrining na c-KIT mutacije, kako bi se odredila adekvatna terapija. Životinje sa mastocitomima niskog stepena maligniteta treba klinički pratiti, a dalje prognoze davati na osnovu ekspresije markera proliferacije, KIT ekspresije, postojanja c-KIT mutacija i drugih parametara, kako bi se odredio rizik od nastanka metastaza i odabrao odgovarajući vid terapije (Kiupel *i sar.*, 2011).

Webster *i sar.* (2007) i Kiupel *i sar.* (2011) su predložili da prognozu za MCT treba određivati na osnovu histološke građe tumora, kao i korišćenjem panel markera, što uključuje određivanje lokalizacije KIT receptora, ekspresije Ki-67 i prisustva mutacija c-KIT protoonkogeni. Većina autora smatra da iako sve navedene parametre treba uzeti u obzir, prisustvo mitozna (mitotski indeks) ipak predstavlja najbitniji pokazatelj biološkog ponašanja tumora (Romansik *i sar.*, 2007; Elston *i sar.*, 2009; Scarpa *i sar.*, 2013).

### 2.2.7. Terapija

Izbor terapije zavisi od kliničke slike bolesti, kao i od prisustva, odnosno odsustva bitnih prognostičkih faktora. Za tumore različitog stepena klasifikacije, primenjivaće se različite metode lečenja (Welle *i sar.*, 2008).

Terapija dobro i srednje diferentovanih mastocitoma, sa većine anatomskih lokacija na telu psa, podrazumeva potpuno hirurško uklanjanje tumora. Različiti autori opisuju efikasnu kontrolu tumora nakon hirurške ekscizije u oko 84% do 89% slučajeva kod mastocitoma II stepena maligniteta. Pored neuspešnih rezultata u oko 11%, zabeležene su i udaljene metastaze u 5% do 22% slučajeva. Međutim, mnoge studije su pokazale razvoj novih mastocitoma u oko 44% slučajeva (Sfiligoi *i sar.*, 2005; Mullins *i sar.*, 2006; Poirier *i sar.*, 2006). Terapija lekovima na bazi kortikosteroida (Prednizolon) u velikom broju slučajeva dovodi do konsolidacije i smanjenja tumora, što znatno olakšava hirurško uklanjanje (Dobson i Cohen, 2004; Stanclift i Gilson, 2008). Kod hirurškog odstranjivanja tumora, potrebno je da rez bude udaljen oko 3cm od ivice mastocitoma, kako bi se izvela opsežna ekscizija i izbeglo zasecanje tumorske mase. Međutim, široke hirurške margine nisu preduslov za dugoročno preživljavanje pasa sa dobro diferentovanim mastocitomima (Murphy *i sar.*, 2004; Dobson i Scase, 2007). Ukoliko su promenama zahvaćeni i limfni čvorovi, preporučuje se terapija koja obuhvata hiruršku eksciziju i radioterapiju (Chaffin i Thrall, 2002).

Srednje vreme preživljavanja za većinu pasa sa mastocitomom III stepena maligniteta kreće se između 3,5 meseca, ukoliko se primenjuje samo hirurški zahvat, odnosno 20 meseci, ukoliko se kombinuju operacija i zračenje (Hahn *i sar.*, 2004; Murphy *i sar.*, 2004). Uprkos prihvatljivim rezultatima nakon hirurške intervencije i radioterapije, većina veterinarskih onkologa smatra da sama lokalna terapija nije dovoljna za optimalnu kontrolu mastocitoma III

stepena maligniteta (Hahn *i sar.*, 2004; Thamm *i sar.*, 2006). Većina autora preporučuje i primenu hemoterapije, naročito što mastocitomi III stepena maligniteta često daju metastaze (Cooper *i sar.*, 2009).

Zračenje je uglavnom korišćeno u okviru posthirurške terapije mastocitoma II stepena maligniteta, kod kojih nije bila izvodljiva kompletna ekscizija (npr. na distalnom delu ekstremiteta). Ovakav vid kombinovane terapije je uspešan u 94-97% slučajeva, sa stepenom preživljavanja od 12 meseci (Al-Sarraf *i sar.*, 1996; Frimberger *i sar.*, 1997). Međutim, nijedna od ovih studija nema kontrolnu grupu životinja sa mastocitomima koji su tretirani samo hirurški. Nekoliko radova navodi isključivo korišćenje radioterapije u lečenju MCT bez prethodnog hirurškog otklanjanja tumora (Turrel *i sar.*, 1988; LaDue *i sar.*, 1998). Potencijalna opasnost od zračenja mastocitoma *in situ* je oslobađanje histamina iz neoplastičnih mastocita. Iz tog razloga, neki autori smatraju da psima sa neoperabilnim MCT treba davati prednizolon 10-14 dana pre zračenja (Dobson *i sar.*, 2004). Radioterapija se takođe može primeniti i preoperativno kako bi se smanjila veličina tumora (LaRue *i sar.*, 2007).

Kombinovana terapija koja uključuje zračenje i hirurško uklanjanje tumora, u znatnoj meri poboljšava kontrolu tumora, posebno u slučajevima kada je operacija delimično izvodljiva zbog funkcionalnih ili kozmetičkih ograničenja i kao takva nedovoljna za kontrolu bolesti (LaRue *i sar.*, 2007).

Primena hemoterapije u terapiji MCT se primarno koristi kod diseminovanih, neoperabilnih mastocitoma ili mastocitoma III stepena maligniteta, kao i kod postojanja metastaza (Camps-Palau *i sar.*, 2007; Welle *i sar.*, 2008).

Generalno, postoji vrlo malo podataka iz literature o odgovoru na hemoterapiju kod pasa sa MCT. Studije koje su objavljene, uglavnom su rađene na malom broju slučajeva i često su posmatrani MCT različitog stepena maligniteta u različitim kliničkim fazama (Dobson i Scase, 2007).

#### **2.2.8. Novi pristupi u terapiji**

Poslednjih nekoliko godina, protein kinaze se smatraju važnim „metama“ u terapiji mastocitoma (London, 2004). Ovaj vid terapije je već dao povoljne rezultate u humanoj medicini u lečenju tumora. Publikovani su radovi u kojima su kao inhibitori tirozin kinaze korišćeni

preparati kao što su *Gleevec* (Imatinib mesilat; Novartis) i *Iressa* (Gefatinib; Astra-Zeneca). Farmaceutska industrija ubrzano ispituje različite inhibitore protein kinaza receptora, uključujući i molekule koji selektivno deluju kao inhibitori tirozin kinaza receptora (Dobson i Scase, 2007).

U okviru ispitivanja u veterinarskoj medicini, najviše je proučavan jedan takav molekul, *toceranib phosphate* (SU11654), kojim je tretirano 57 pasa sa neoplazmama, a najviša stopa uspešnog odgovora zabeležena je kod pasa sa mastocitomima (London *i sar.*, 2003a; London *i sar.*, 2009). Nakon toga, dodatna istraživanja na psima sa mastocitomima su pokazala vezu između koncentracije SU11654 u plazmi i inhibicije target molekula u biopsijama tumora (Pryer *i sar.*, 2003). U novije vreme se ispituju inhibitori KIT receptora, kao što su *axitinib*, *imatinib*, *masitinib* i *vatalanib* (Takeuchi *i sar.*, 2012).

Osim ciljanog delovanja na neoplastične ćelije, inhibitori KIT receptora mogu delovati i na krvne sudove tumora (Joyce, 2005; Ellis i Hicklin, 2008; Carmeliet i Jain, 2011; Takahashi, 2011). Od ranije je poznato da angiogeneza ima centralnu ulogu u tumorskom rastu (Folkman, 1971) te je atraktivna terapijski meta. Inhibicija angiogeneze se zasniva na vezivanju inhibitora KIT receptora za ATP-vezujuću stranu VEGFR1 i VEGFR2, koji predstavljaju receptore za vaskularni endotelni faktor rasta. Deluju inhibitory i na tirozin kinaza receptore za faktor rasta poreklom iz trombocita (*Platelet-derived Growth Factor* – PDGF, eng), epidermalni faktor rasta (*Epidermal Growth Factor* – EGF, eng.), faktor rasta fibroblasta (*Fibroblast Growth Factors* – FGF, eng.) (Ellis i Hicklin, 2008; Backer *i sar.*, 2009; Carmeliet i Jain, 2011).

Pomenuti receptori, osim što se nalaze na ćelijama krvi, nalaze se i na samim malignim ćelijama, tako da delovanje na ove receptore može imati kako direktan, tako i indirektan efekat na sam tumor. Stoga je važno utvrditi da li su ovi receptori prisutni na ćelijama tumora, kako bi se odredila ciljana terapija (Millanta *i sar.*, 2006; Al-Dissi *i sar.*, 2011). Prema pojedinim autorima, na neoplastičnim mastocitima postoji ekspresija VEGF receptora VEGFR1 i VEGFR2, međutim, za razliku od drugih neoplazmi, mastocitomi ne koriste VEGF kao autokrini regulator rasta (Rebuzzi *i sar.*, 2007).

Dok se u humanoj medicini navodi 11 registrovanih inhibitora tirozin kinaza receptora i preko 130 koji se nalaze u fazi kliničkog testiranja, u veterinarskoj medicini su zvanično odobreni samo *toceranib* (Palladia™) u Severnoj Americi (London *i sar.*, 2009) i *masitinib* (Kinavet™) u Evropi za lečenje pasa, dok je u Severnoj Americi u fazi ispitivanja (Hahn *i sar.*, 2008; Hahn *i sar.*, 2010).

### 3. CILJ I ZADACI

Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je da se na osnovu morfoloških karakteristika, ekspresije molekula značajnih za proliferaciju i kontrolu rasta tumora i prisustva c-KIT mutacija, primeni novi sistem klasifikacije mastocitoma pasa.

**U cilju određivanja distribucije i morfoloških karakteristika mastocitoma postavljeni su sledeći zadaci:**

- Određivanje polne, starosne, rasne i topografske distribucije mastocitoma
- Ispitivanje prisustva mitotskih deoba, multinuklearnih ćelija, bizarnih jedara i kariomegalije, mikroskopskom analizom preparata bojenih hematoksilin-eozinom
- Ispitivanje prisustva granula i stepena degranulacije mastocita mikroskopskom analizom preparata bojenih *toluidine blue* metodom

**U cilju određivanja ekspresije u mastocitomima, molekula značajnih za proliferaciju i kontrolu rasta, postavljeni su sledeći zadaci:**

- Imunohistohemijsko dokazivanje ekspresije KIT receptora (CD117),
- Imunohistohemijsko dokazivanje ekspresije Ki-67 antigena,
- Imunohistohemijsko dokazivanje ekspresije PCNA i
- Imunohistohemijsko dokazivanje ekspresije CD45RA.

**U cilju određivanja prisustva mutacija na c-KIT protoonkogenu, postavljen je zadatak:**

- Ispitivanje prisustva c-KIT mutacija kod mastocitoma oba histološka gradusa, primenom molekularne metode PCR (*Polymerase Chain Reaction* - PCR, eng).



## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1. Materijal**

#### **4.1.1. Tkivni uzorci**

Ispitivanjima su obuhvaćeni isecci kože 24 psa kod kojih je kliničkim pregledom postavljena sumnja na mastocitom. Isecci nepromenjene kože 6 odraslih pasa, uzorkovani na obdukciji, služili su kao kontrola. Psi različite rase i pola (7 ženki i 17 mužjaka), uzrasta od 3 do 11 godina, poticali su sa teritorije Republike Srbije. Histopatološka dijagnoza kod ovih pasa postavljena je na Katedri za patološku morfologiju, Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu, u prethodne tri godine.

Svi ispitani MCT potiču od pasa koji su klinički pregledani, a podaci o rasi, polu, starosti i lokalizaciji odstranjenog tumora, navedeni su u uputu za histopatološki pregled.

#### **4.1.2. Izolat DNK**

Kao pozitivna kontrola za c-KIT mutaciju (prisustvo ITD na egzonu 11) korišćen je izolat DNK psa sa mastocitomom za koga je utvrđeno da poseduje navedenu mutaciju. Izolat potiče sa Koledža veterinarske medicine, Odeljenja za patobiologiju i dijagnostička ispitivanja iz Mičigena, SAD (The Department of Pathobiology and Diagnostic Investigation in the College of Veterinary Medicine at Michigan State University, USA).

## 4.2. Metode

U toku ispitivanja primenjene su sledeće metode:

1. Histološka obrada uzoraka tumora kože
2. Histološka analiza uzoraka tumora kože
3. Imunohistohemijska metoda
4. Morfometrijska analiza
5. Metode molekularne detekcije mutacija
6. Statistička obrada

### 4.2.1. Histološka obrada uzoraka tumora kože

Neposredno nakon biopsije tumora kože pasa, uzorci su fiksirani u 10% neutralnom puferizovanom formalinu ne duže od 48 sati, posle čega su procesovani u automatskom tkivnom procesoru LEICA TP1020, gde su isprani vodom i dalje dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije, da bi zatim bili prosvetljeni u ksilolu i ukalupljeni u parafinske kalupe. Parafinski blokovi su sečeni pomoću mikrotoma LEICA RM 2235 na tkivne isečke debljine 3-5  $\mu\text{m}$ . Dobijeni preparati su bojeni hematoksilin-eozin (HE) metodom.

### 4.2.2. Histološka analiza uzoraka tumora kože

Na preparatima bojenim hematoksilin-eozinom postavljena je preliminarna patohistološka dijagnoza mastocitoma, a za njenu potvrdu, preparati su dalje bojeni *toluidin blue* (TB) metodom, čime je omogućena vizuelizacija histaminskih granula u mastocitima.

Patohistološke osobine tumora, kao što su prisustvo mitoza, multijedarnih ćelija, bizarnih jedara i kariomegalije, analizirani su na preparatima bojenim hematoksilin-eozinom. Broj navedenih parametara određivan je na deset vidnih polja svakog tumora, pri uveličanju 400 puta (*10 high-power fields* - 10 hpf, eng). Na osnovu navedenih parametara, tumori su razvrstani u dva stepena diferentovanosti – tumore visokog stepena maligniteta koji imaju najmanje 7 mitotskih figura, najmanje 3 multinuklearne ćelije, najmanje 3 bizarna jedra na 10 polja velikog uvećanja (400x) ili je prisutna kariomegalija kod 10% anaplastičnih ćelija i na tumore niskog

stepena maligniteta, koji ne ispunjavaju navedene uslove. Mitotski indeks je definisan kao broj mitotskih figura na 10 polja velikog uvećanja (400x) i beležen je za svaki tumor posebno primenom metode opisane od strane Romansik *i sar.* (2007).

Na preparatima bojenim *toluidin blue* metodom analizirano je prisustvo granula u mastocitima, odnosno pericelularna degranulacija, takođe na deset polja pri istom uvećanju.

- Mitotske figure

Pod mitotskim figurama se podrazumevaju hromozomi ćelija u deobi koji se uočavaju umesto samog jedra i vidljivi su kao upletene, tamnije obojene niti. To su hiperhromatske figure čije jedarne membrane nisu jasno uočljive. Veliki broj umnoženih hromozoma često ćeliji daje "čupav" izgled. Citoplazma ovih ćelija je boje slabijeg inteziteta u odnosu na ćelije u interfazi. Tokom profaze hromozomi su prvo končasti, a zatim se kondezuju tako da se mogu uočiti sestrinske hromatide spojene centromerom. Kod određenog broja ćelija hromozomi su uočljivi samo u jednoj ravni, tzv. ekvatorijalnoj ravni i tada se ćelija nalazi u metafazi u kojoj se hromozomi najbolje uočavaju jer su maksimalno kondezovani. U ranoj anafazi većina hromozoma počinje da se razdvaja na po dve hromatide koje se dekondezuju, tako da se pri kraju anafaze i tokom telofaze uočavaju dve grupe hromatida na oba pola ćelije.

- Multinuklearne ćelije

Multinuklearnim ćelijama smatrani su svi mastociti sa više od jednog jedra. Ove ćelije su uglavnom krupne, okruglog oblika, sa jasno vidljivim granicama između jedara i citoplazme. Karakteristike jedra i citoplazme multinuklearnih ćelija su iste kao i kod ćelija sa jednim jedrom.

- Bizarna jedra

Pod bizarnim jedrima podrazumevana su sva jedra koja odstupaju od normalnog (okruglog) oblika, tipičnog za jedra mastocita. Ovakva jedra mogu biti režnjevita, elipsoidnog ili nepravilnog oblika i hiperhromatična.

- Kariomegalija

Kariomegalija podrazumeva patološko uvećanje jedra ćelije. Većina ćelija sa kariomegalijom sadrži veliki broj metahromatskih ćelija u svojoj citoplazmi. Povećana jedra su hiperhromatična sa prominentnim jedarcetom.

#### 4.2.3. **Imunohistohemijska metoda**

Imunohistohemijska obrada je obavljena u Laboratoriji za patohistologiju Katedre za patološku morfologiju, Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu. Imunohistohemijska tehnika na uzorcima fiksiranim u formalinu i ukalupljenim u parafinu predstavlja višestepenu proceduru koja obuhvata sledeće postupke:

- deparafinizacija
- demaskiranje antigena
- blokiranje endogene peroksidaze
- preinkubacija sa normalnim kozjim serumom
- imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike

#### *Deparafinizacija*

Isečci debljine 4 $\mu$ m, dobijeni sečenjem parafinskih kalupa tumora pomoću mikrotoma, nakon sušenja na 56°C – 12h, deparafinisani su po sledećoj proceduri:

|                    |              |
|--------------------|--------------|
| I ksilol .....     | 10 minuta    |
| II ksilol .....    | 10 minuta    |
| 100% alkohol ..... | 3 – 5 minuta |
| 100% alkohol ..... | 3 – 5 minuta |
| 96% alkohol .....  | 3 minuta     |
| 70% alkohol .....  | 3 minuta     |
| tekuća voda .....  | ispiranje    |

### *Demaskiranje antigena*

Deparafinirani preseči su preneti u plastičnu kivetu sa oko 250 ml radnog rastvora citratnog pufera (pH=6) i termički obrađeni u mikrotalasnoj pećnici 21 minut pri snazi od 560W, a zatim hlađeni dodavanjem destilovane vode 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon hlađenja, isprani su najpre u vodi iz česme, a zatim u destilovanoj vodi.

### *Blokiranje endogene peroksidaze*

Preparati su potopljeni 15 minuta u smešu 3% vodonik – proksida (3 ml) i metanola (177 ml), a zatim isprani u fosfatnom puferu (*phosphate-buffered-saline* – PBS, eng.). Nakon odlivanja viška pufera, preostala tečnost oko isečka pažljivo je obrisana.

### *Preinkubacija sa normalnim kozjim serumom*

Svaki isečak prekriven je 20% kozjim serumom i inkubiran 20 minuta na sobnoj temperaturi.

### *Imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike*

Za imunohistohemijsko bojenje korišćen je komercijalni kit (*Labelled streptavidin-biotin* LSAB+ metoda, DAKO, Danska). Bojenje se obavlja po sledećoj proceduri:

#### **FAZA I (primarno antitelo razblaženo po uputstvu proizvođača)**

1. odliti višak seruma, obrisati višak tečnosti oko isečka
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (50-150  $\mu$ L) primarnog antitela
3. inkubirati 60 minuta na sobnoj temperaturi
4. pažljivo isprati PBS iz špric boce (3 puta po 5 minuta)
5. prelići svežim puferom

## **FAZA II (biotinizovano vezno antitelo)**

1. odliti višak pufera, obrisati višak tečnosti oko isečka
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (50-150  $\mu$ L) LINK antitela
3. inkubirati 20 minuta na sobnoj temperaturi
4. pažljivo isprati PBS iz špric boce (3 puta po 5 minuta)
5. preliterati svežim puferom

## **FAZA III (streptavidin-peroksidaza)**

1. odliti višak pufera, obrisati višak tečnosti oko isečka
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (50-150  $\mu$ L) streptavidin-peroksidaze
3. inkubirati 20 minuta na sobnoj temperaturi
4. pažljivo isprati PBS iz špric boce (3 puta po 5 minuta)
5. preliterati svežim puferom

## **FAZA IV (supstrat hromogen)**

1. odliti višak pufera, obrisati višak tečnosti oko isečka
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (50-150  $\mu$ L) hromogena diaminobenzidina (DAB)
3. inkubirati 10 minuta na sobnoj temperaturi
4. isprati destilovanom vodom

## **FAZA V (kontrastiranje)**

1. staviti u Mayer-ov hematoksilin 1 sekundu
2. isprati prvo vodom iz česme, a zatim destilovanom vodom
3. pokriti vodenim medijumom za montiranje (Aquatex, Merck)

Mesta specifičnog vezivanja antitela su smeđe boje, dok hematoksilin boji plavo jedra svih ćelija za koje se nespecifično veže.

Celokupna procedura je korišćena za sledeća antitela, u odgovarajućim razblaženjima:

- CD117 (A4502, Polyclonal Rabbit Anti-Human, DakoCytomation, Danska), 1:400
- Ki-67 (M7240, Klon MIB-1, DakoCytomation, Danska), 1:50
- PCNA (M0879, Monoclonal Mouse Anti-, DakoCytomation, Danska), 1:200
- CD45RA (M0754, Monoclonal Mouse Anti-Human, DakoCytomation, Danska), *Ready to use*

Za svako primenjeno antitelo postojala je pozitivna i negativna kontrola. Kao pozitivne kontrole korišćeni su tkivni uzorci kod kojih je prethodno već postavljena dijagnoza mastocitoma. Kontrolni uzorci su tretirani jednako kao i ispitujući mastocitomi, s tim što je kod negativne kontrole tridesetominutna inkubacije sa primarnim antitelom zamenjena inkubacijom sa puferom.

Rezultati imunohistohemijskog bojenja su analizirani na svetlosnom mikroskopu (BX51, Olympus Optical, Japan).

#### 4.2.4. Morfometrijska analiza

Za morfometrijska ispitivanja korišćen je morfometrijski softver Olympus Cell B, uz upotrebu kamere Olympus Color View III.

Lokalizacija KIT proteina je određena na način opisan u istraživanju Webster *i sar.* (2007), s obzirom da se razlikuju membranski KIT proteini i dve vrste citoplazmatskih KIT proteina - fokalno i difuzno raspoređeni u citoplazmi.

Koji od KIT proteina preovlađuje, određivano je na osnovu prisustva u najmanje 10% neoplastičnih ćelija tumora. Ćelije na ivici tumora nisu uzimane u razmatranje.

Za Ki-67 antitelo i PCNA, najpre su pomoću svetlosnog mikroskopa, pri uvećanju 1000x, određena područja sa najvećom koncentracijom neoplastičkih mastocita. Nakon identifikacije visoko proliferativnih područja, broj imunopozitivnih ćelija je određivan pomoću mrežice za morfometriju, čija su polja površine  $1 \text{ cm}^2$  pri uvećanju 400X. Broj imunopozitivnih ćelija je određen u 10 polja, a zatim je izračunata prosečna vrednost.

Za CD45RA antitelo određivano je da li su tumori imunohistohemijski pozitivni ili negativni na CD45 receptore, bez određivanja broja imunopozitivnih ćelija po jedinici površine.

Digitalne fotografije su napravljene pomoću optičkog mikroskopa Olympus BX51 sa digitalnom kamerom Olympus Color View III.

#### 4.2.5. Metode molekularne detekcije mutacija

##### *Izolacija DNK*

DNK iz parafinskih isečaka mastocitoma debljine 5 $\mu$ m, izolovana je pomoću komercijalnog seta „KAPA Express Extract Kit” (Cat. No KK7152, Kapa Biosystems, Cape Town, South Africa).

Protokol za izolaciju DNK korišćenjem navedenog seta uključivao je sledeće korake:

1. Parafinski isečci tumora debljine 5  $\mu$ m i veličine 2x3mm stavljeni su u epruvetu zapremine 1,5 ml.
2. U svaku epruvetu je dodato po 88  $\mu$ l vode, 10  $\mu$ l 10x KAPA Express Extract pufera i 2  $\mu$ l KAPA Express Extract enzima. Sadržaj epruvete je vorteksovan 10s.
3. Inkubacioni korak protokola je omogućio lizu tkiva (20 min na 75°C) i inaktivaciju termostabilne KAPA Express Extract proteaze (5 min na 95°C).
4. Sadržaj epruvete je vorteksovan 10s, a zatim centrifugiran 1 minut na 130k rpm.
5. Nakon centrifugiranja, 50  $\mu$ l DNK izolata (supernatanta) je prebačeno u novu epruvetu zapremine 1,5 ml.
6. Tako dobijen izolat DNK razređen je u TE puferu u odnosu 1:5 i čuvan na -20°C do upotrebe u PCR reakciji.

##### *Lančana reakcija polimeraze (PCR)*

Kako bi se željeni fragment DNK mogao analizirati, neophodno je da se poveća njegova količina, što se postiže PCR amplifikacijom uz primenu specifičnih prajmera. U ovom radu korišćeni su prajmeri PE1 (CCA TGT ATG AAG TAC AGT GGA AG) i PE2 (GTT CCC TAA AGT CAT TGT TAC ACG) (Jones *i sar.*, 2004) koji omogućavaju amplifikaciju c-KIT jukstamembranog domena. PE1 je smešten na 5' kraju egzona 11, dok se PE2 nalazi u sredini introna 11. Navedeni prajmeri bi trebalo da generišu PCR produkt veličine ~191 baznih parova i drugi, veličine ~250 baznih parova.



PCR reakciona smeša je pripremljena upotrebom komercijalnog seta KAPA2G Robust HotStart ReadyMix prema uputstvima proizvođača. Reakciona smeša ukupne zapremine 25  $\mu$ l sadržala je 12,5  $\mu$ l KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (2X), 1,25  $\mu$ l svakog prajmera (PE1 i PE2) i 10  $\mu$ l izolovane DNK. PCR reakcija se odvijala u PCR aparatu – MultiGene Gradient (Labnet International Inc.) po programu:

- 1) Početna denaturacija na 95°C tokom 3 minuta;
- 2) Denaturacija na 94°C tokom 15 sekundi;
- 3) Hibridizacija na 59°C tokom 15 sekundi;
- 4) DNK ekstenzija na 72°C tokom 15 sekundi;

Koraci 2, 3 i 4 ponovljeni su u 40 ciklusa.

- 5) Finalna ekstenzija DNK na 72°C tokom 5 minuta.

KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (2X) sadrži KAPA2G Robust HotStart DNK polimerazu u odgovarajućem reakcionom puferu, sva četiri dNTP-a (0,2 mM svakog dNTP-a, 1X),  $MgCl_2$  (2 mM, 1X) i stabilizatore.

KAPA2G Robust DNK polimeraza je specijalno dizajnirana polimeraza koja obezbeđuje veću procesivnost i viši nivo tolerancije na uobičajene PCR inhibitore nego wild-type Taq polimeraza. U „hot start“ formulaciji, KAPA2G Robust DNK polimeraza je u kombinaciji sa specifičnim antitelom koje inaktivira enzim do prvog koraka denaturacije. To sprečava elongaciju prajmer–templat kompleksa koji nastaju kao rezultat nespecifičnog vezivanja prajmera u toku inicijalne denaturacije i povećava ukupnu efikasnost reakcije. KAPA2G Robust HotStart DNK polimeraza ima 5'-3' polimeraznu i 5'-3' egzonukleaznu aktivnost, ali nema 3'-5' egzonukleaznu (korigujuću) aktivnost. Vernost KAPA2G Robust HotStart DNK polimeraze je slična onoj koju ima wild-type Taq polimeraza; stopa pogrešnog ugrađivanja nukleotida je približno jedna greška na  $1.7 \times 10^5$  inkorporiranih nukleotida.

### *Elektroforeza i vizuelizacija PCR produkata*

Produkti PCR amplifikacije su razdvojeni elektroforezom na agaroznom gelu. Elektroforeza se temelji na različitoj brzini kretanja molekula DNK različitih veličina u agaroznom gelu pod uticajem električnog polja. Molekul DNK je negativno naelektrisan i u električnom polju se kreće prema pozitivnoj elektrodi (anodi). Odnos molekulske mase i naelektrisanja molekula je konstantan, pa se molekuli kroz gel kreću brzinom koja zavisi samo od njihove veličine. Molekuli manje molekulske mase kreću se brže kroz gel, dok se oni sa većom molekulskom masom kreću sporije.

Dvoprocentni agarozni gel pripremljen je rastvaranjem 0,8 g agaroze u 40 ml 1x TBE pufera (Tris-borat, EDTA). Nakon što je gel naliven u kalup i ohlađen tokom desetak minuta na sobnoj temperaturi, u svaki bunarčić gela nanešena je smeša 2,5  $\mu$ l PCR produkta i 1,5  $\mu$ l boje 6x Loading Dye Solution (Fermentas). U granične bunarčiće je nanešeno 2  $\mu$ l markera (O'RangeRuler™ 50bp DNA Ladder, Fermentas) koji je takođe prethodno pomešan sa 1,5  $\mu$ l boje. Gel je preliven sa 50 ml 1x TBE pufera. Elektroforeza se odvijala pri struji od 50 mA i naponu od 50 V u trajanju od 46 minuta.

Za vizuelizaciju molekula DNK u gelu korišćen je etidijum bromid koji se interkalira između lanaca DNK molekula i fluorescira kada se osvetli UV svetlom. Vizuelizacija molekula DNK u agaroznom gelu omogućena je bojenjem gela nakon elektroforeze u rastvoru od 20  $\mu$ l etidijum bromida u 200 ml destilovane vode tokom 15 minuta. Gel je zatim ispran destilovanom vodom tokom 15 minuta, postavljen pod UV svetlo transiluminatora i fotografisan kako bi se dobio trajni zapis rezultata elektroforetske analize. Prisustvo mutacija određivano je vizuelnim pregledom slike gela.

#### **4.2.6. Statistička obrada podataka**

U statističkoj analizi dobijenih rezultata, kao osnovne statističke metode, korišćeni su deskriptivni parametri. Ovi parametri su omogućili opisivanje dobijenih rezultata i njihovo tumačenje. Od deskriptivnih aritmetičkih parametara korišćene su aritmetička sredina i standardna devijacija.

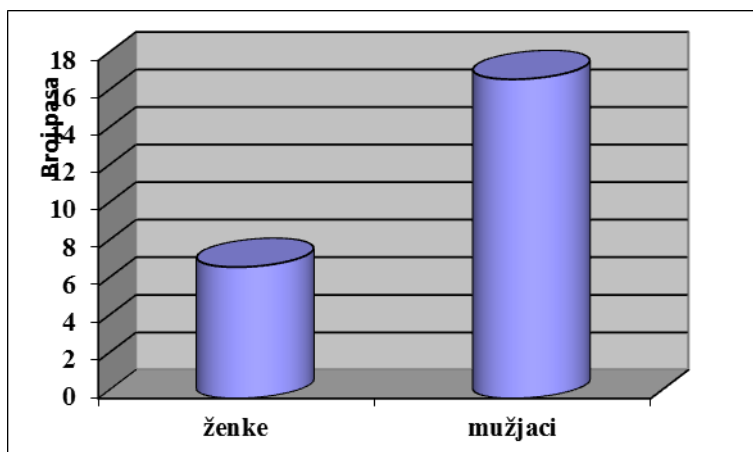
Prilikom testiranja i utvrđivanja statistički značajnih razlika korišćena su dva testa: t - test proporcije i  $\chi^2$  test. Pomoću ovih testova utvrđivano je postojanje statistički signifikantne razlike između ispitivanih parametara. Statistički signifikantna razlika utvrđena je na nivou značajnosti od 5% i 1%. Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Statistička analiza dobijenih rezultata izvedena je u statističkom paketu SPSS i MS Excel.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Određivanje polne, starosne, rasne i topografske distribucije kutanog mastocitoma kod ispitanih pasa

#### 5.1.1. Polna distribucija mastocitoma

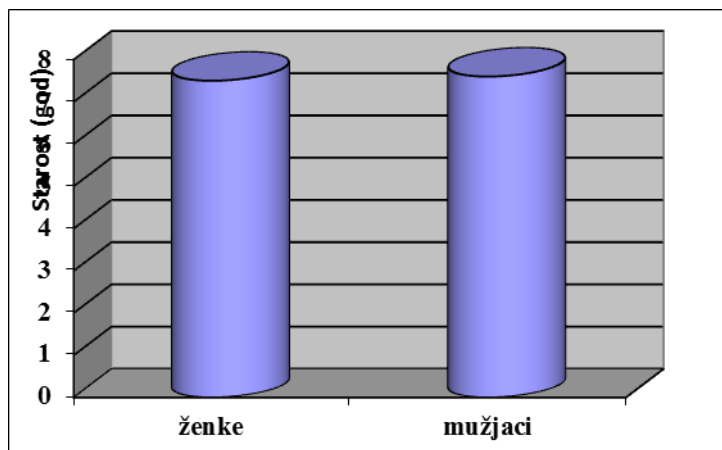
Kutani mastocitom je dijagnostikovao kod 24 pasa, i to kod 7 ženki (29,17%) i 17 mušjaka (70,83%) (Grafikon 1). Podaci pokazuju da u ispitanoj grupi postoji statistički signifikantna razlika između pola pasa i pojave mastocitoma ( $p < 0,01$ ). Pse iz kontrolne grupe činili su tri mušjaka i tri ženke.



*Grafikon 1.* Zastupljenost kutanog mastocitoma u odnosu na polnu distribuciju

### 5.1.2. Zastupljenost kutanog mastocitoma u odnosu na starost pasa

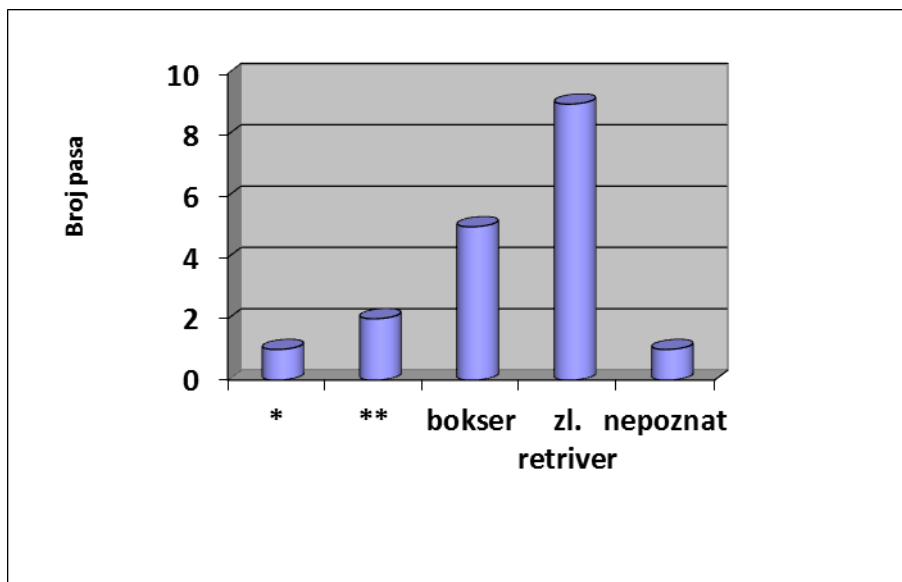
Starost pasa kod kojih je dijagnostikovano mastocitom je od 3 do 11 godina, dok je prosečna starost obolelih pasa  $7,56 \pm 2,45$  godina. Obolele ženke su prosečne starosti  $7,43 \pm 2,52$  godina, dok je prosečna starost obolelih mužjaka  $7,62 \pm 2,48$  godina (Grafikon 2). Podaci pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika između starosti pasa i pojave mastocitoma ( $p > 0,05$ ). U kontrolnoj grupi bili su psi prosečne starosti  $7,0 \pm 4,15$  godina.



*Grafikon 2.* Zastupljenost kutanog mastocitoma u odnosu na starosnu distribuciju

### 5.1.3. Rasna distribucija kutanog mastocitoma

Ispitanu grupu obolelih pasa čine po jedan (4,2%) foks terijer, dogo argentino, maltezer i američki staford terijer, po dva (8,3%) mešanca, labradora i američka buldoga, pet boksera (20,7%) i devet zlatnih retrivera (37,5%). Za jednog (4,2%) psa ne postoje podaci o rasi (Grafikon 3). Iz navedenih podataka se može uočiti da su mastocitomi više zastupljeni kod rasnih pasa u odnosu na mešance. Podaci pokazuju da postoji statistički značajna razlika u pojavi mastocitoma između različitih rasa pasa ( $p = 0,005401$ ). U kontrolnoj grupi su se nalazile dve pudle i po jedan veliki šnauzer, nemački lovni terijer, maltezer i mešanac.



\*foks terijer, dogo argentino, maltezer i američki staford terijer

\*\* mešanac, labrador i američki buldog

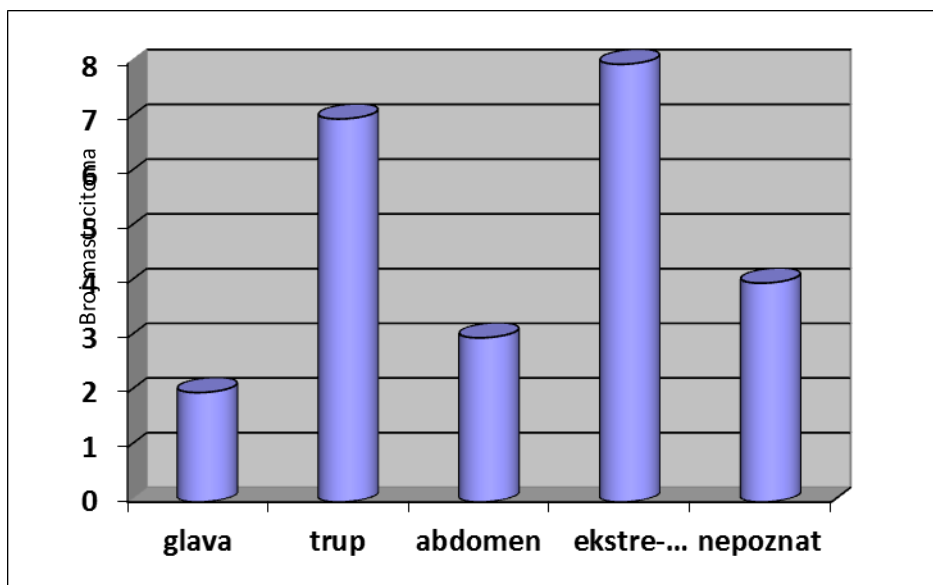
**Grafikon 3.** Zastupljenost kutanog mastocitoma u odnosu na rasnu distribuciju

#### 5.1.4. Topografska distribucija kutanog mastocitoma

Najčešća lokalizacija mastocitoma kod pasa je uočena na ekstremitetima (Slika 2), i to kod 8 pasa (33,3%), zatim na trupu kod 7 pasa (29,2%) i na abdomenu kod 3 psa (12,5%). Dva mastocitoma (8,3%) su odstranjena sa različitih mesta na glavi obolelih pasa. Za četiri tumora (16,6%) nije poznata lokalizacija (Grafikon 4). Podaci pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u pogledu lokalizacije mastocitoma na različitim anatomskim regijama tela psa ( $p=0,232501$ ).



*Slika 2.* Kutani mastocitom na ekstremitetu psa

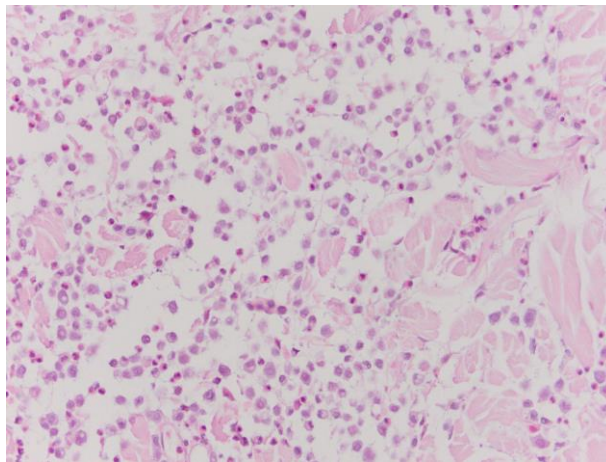


*Grafikon 4.* Zastupljenost mastocitoma u odnosu na topografsku distribuciju

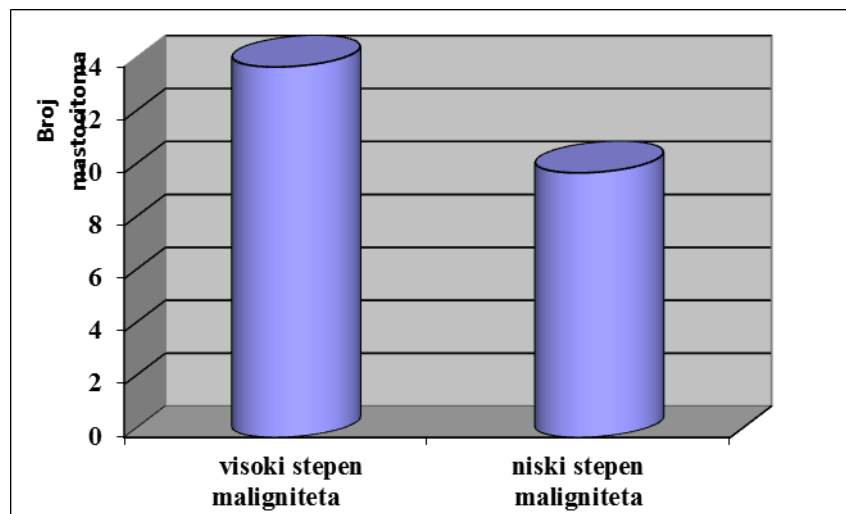
## 5.2. Morfološke karakteristike mastocitoma

### 5.2.1. Mikroskopski nalaz na preparatima bojenim hematoksilin – eozinom (HE)

Od 24 dijagnostikovana mastocitoma (Grafikon 5), ustanovljeno je 10 dobro diferentovanih mastocitoma. U ovim tumorima se uočavaju ćelije uniformnog oblika sa centralno postavljenim jedrom i granulisanom citoplazmom. Tumorske ćelije su poređane u umereno zbijene redove odvojene kolagenom (Slika 3).



*Slika 3.* Ćelije dobro diferentovanog mastocitoma, HE, x400

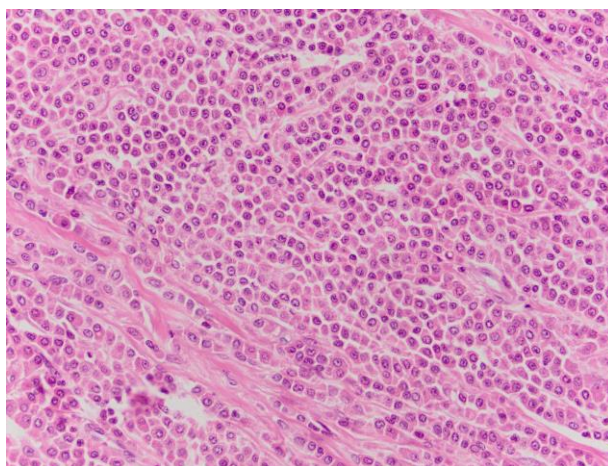


*Grafikon 5.* Broj mastocitoma visokog i niskog stepena maligniteta



Mikroskopskim pregledom patohistoloških preparata, kod 14 slabo diferentovanih mastocitoma uočavaju se ćelije sa jasno izraženim granicama, jedra su velika, nepravilnog oblika (Slika 4), dok pojedine ćelije imaju više jedaraca. Prisutne su višejedarne ćelije, a mitotske figure su brojne. Kod 5 mastocitoma ćelije su poredane u redove, dok su kod ostalih mastocitoma nepravilno raspoređene. Tumorske ćelije duboko infiltruju subkutis. Uočavaju se i nekrotična polja.

Na histopatološkim preparatima 6 uzoraka kože uzetih od pasa iz kontrolne grupe nisu uočene promene.



*Slika 4.* Ćelije slabo diferentovanog mastocitoma, HE, x 400

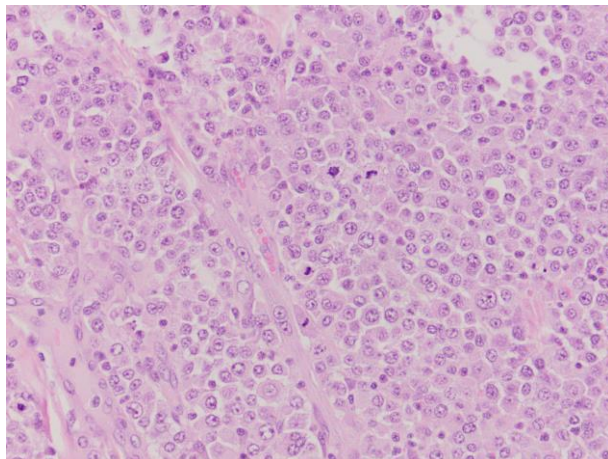
Većina tumora oba gradusa je infiltrovana različitim ćelijama zapaljenja, uglavnom limfocitima i plazma ćelijama i u različitoj meri eozinofilnim granulocitima.

#### *Prisustvo mitotskih figura*

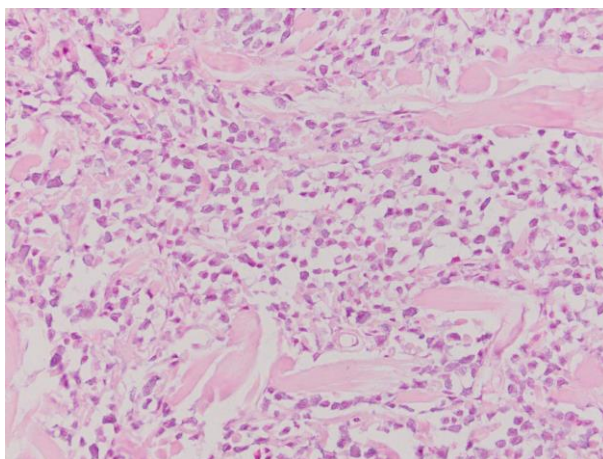
Histološkom analizom isečaka mastocitoma bojenih hematoksilin-eozinom ćelije u mitozu se uočavaju kao hiperhromatske figure. Osim toga, kod njih se ne zapažaju jasno jedarne membrane, a umesto samog jedra vidljivi su hromozomi nalik tamnim nitima. Veliki broj umnoženih hromozoma često ćeliji daje "čupav" izgled. Boja citoplazme ćelija u mitozu je slabijeg inteziteta, dok su jedra ovih ćelija intenzivnije boje u odnosu na ćelije u interfazi.

Kod 7 mastocitoma prisutno je više od šest mitotskih figura na 10 hpf (*High-power Fields* – hpf, eng.) (Slika 5), dok se 17 mastocitoma odlikuje slabijom mitotskom aktivnošću (Slika 6). Svih sedam mastocitoma sa povećanim brojem mitotskih figura pripada

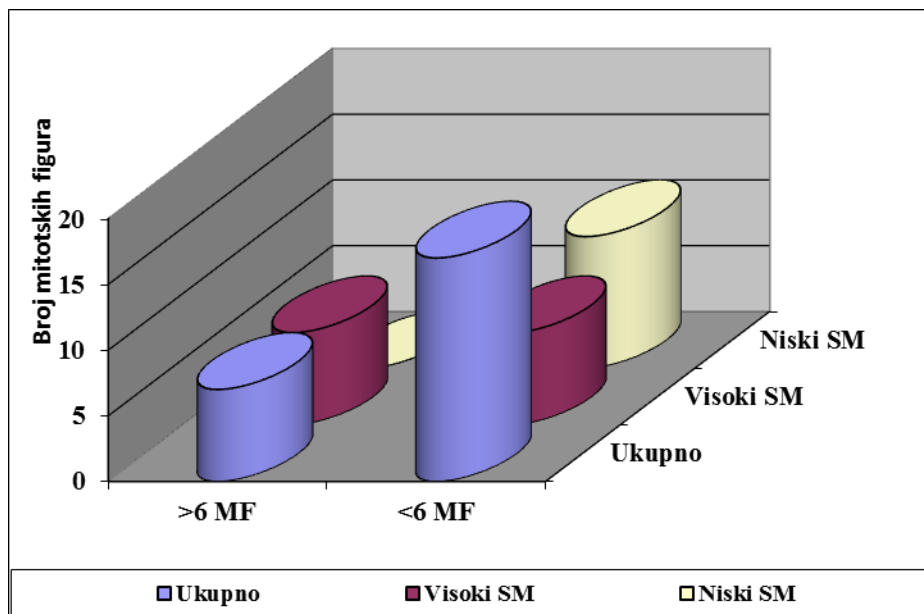
mastocitomima višeg stepena maligniteta (Grafikon 6). S obzirom da su mitotske figure prisutne kod 7 (50%) mastocitoma visokog stepena maligniteta, njihovo prisustvo u ovom istraživanju nije statistički značajno ( $p > 0,05$ ) za klasifikaciju mastocitoma po Kiupel-u.



**Slika 5.** Mitotske figure kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, HE, x 400



**Slika 6.** Odsustvo mitotskih figura kod mastocitoma niskog stepena maligniteta, HE, x 400

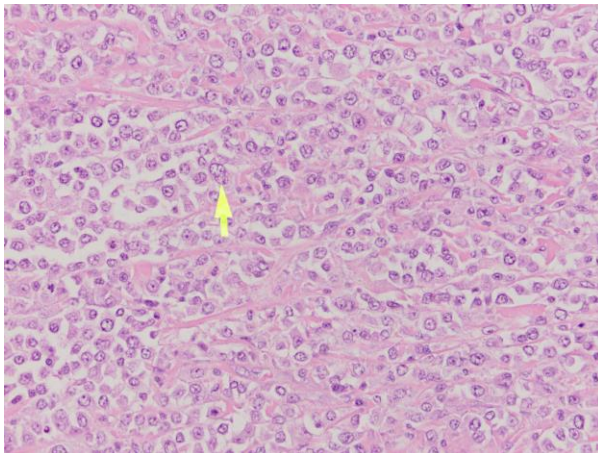


**Grafikon 6.** Prisustvo mitotskih figura kod mastocitoma visokog i niskog stepena maligniteta

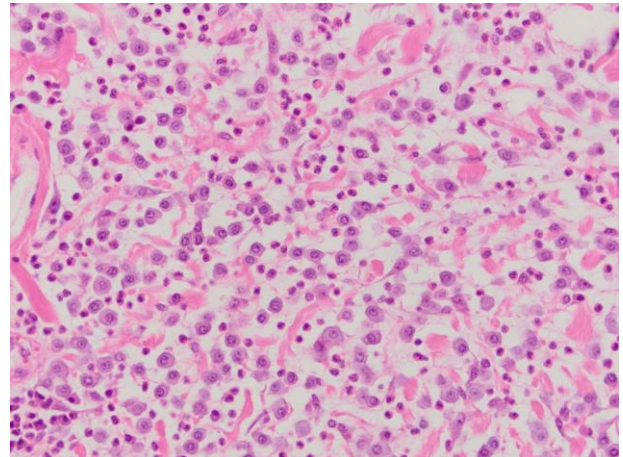
### *Prisustvo multinuklearnih ćelija*

Mikroskopski je utvrđeno prisustvo multinuklearnih ćelija u preparatima bojenim HE. Većina multinuklearnih ćelija ima dva jedra, dok su ćelije sa većim brojem jedara znatno ređe.

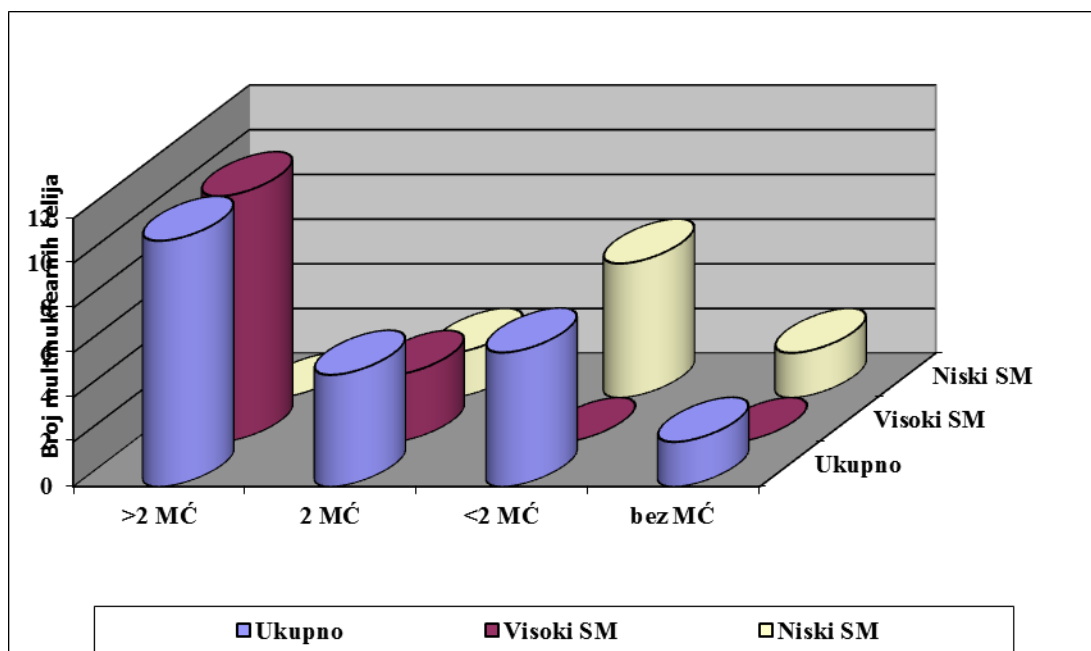
Histološkim pregledom uzoraka, kod 11 mastocitoma je uočeno prisustvo više od dve multinuklearne ćelije na 10 hpf (Slika 7). Kod 5 mastocitoma su prisutne po dve multinuklearne ćelije, dok je kod 6 mastocitoma uočena po jedna multinuklearna ćelija na istom broju vidnih polja. Multinuklearne ćelije nisu uočene kod 2 mastocitoma (Slika 8, Grafikon 7). Iz napred navedenog se uočava da su kod 78,57% mastocitoma visokog stepena prisutne više od dve multinuklearne ćelije na 10 hpf, što ukazuje da je ovaj parametar statistički značajan ( $p < 0,01$ ) za klasifikaciju mastocitoma po Kiupelu.



**Slika 7.** Multinuklearne ćelije kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, HE, x 400



**Slika 8.** Odsustvo multinuklearnih ćelija kod mastocitoma niskog stepena maligniteta, HE, x 400



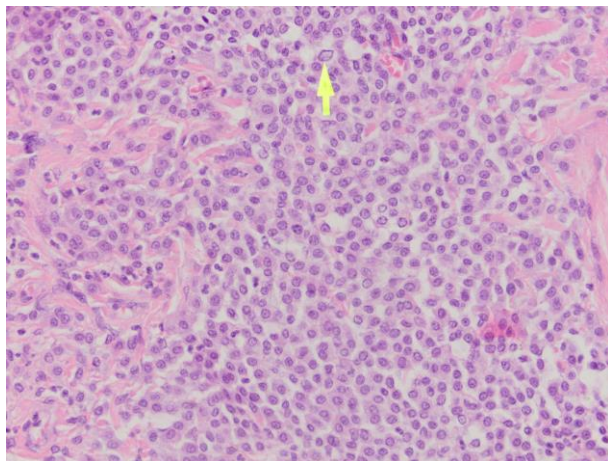
**Grafikon 7.** Prisustvo multinuklearnih ćelija kod mastocitoma visokog i niskog stepena maligniteta

#### *Prisustvo bizarnih jedara*

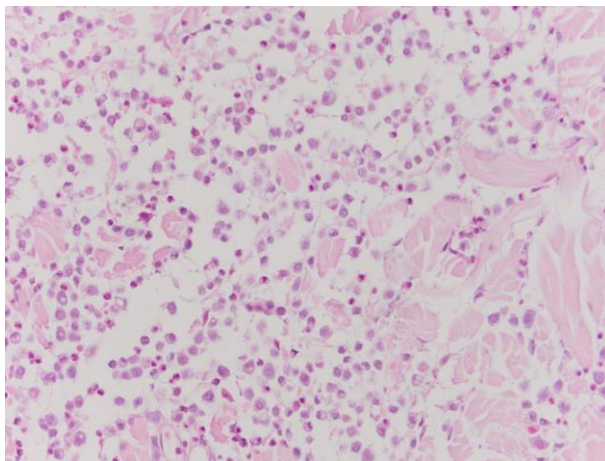
U patohistološkim preparatima mastocitoma uočavaju se tumorske ćelije bogate citoplazmom, sa jedrima koja odstupaju od okruglog oblika.

Više od dve ćelije sa bizarnim jedrom na 10 hpf prisutne su kod 10 mastocitoma (Slika 9). Svih deset mastocitoma su mastocitomi visokog stepena maligniteta. Dve ćelije sa bizarnim jedrom na istom broju vidnih polja uočene su kod jednog mastocitoma, dok je po jedna ćelija sa bizarnim jedrom prisutna kod 10 mastocitoma. Kod 3 mastocitoma nisu uočene ćelije sa bizarnim jedrima (Slika 10, Grafikon 8). S obzirom da se bizarna jedra uočavaju kod 71,43% mastocitoma visokog stepena maligniteta, njihovo prisustvo se može smatrati statistički značajnim parametrom ( $p < 0,05$ ) za klasifikaciju mastocitoma po Kiupelu,.

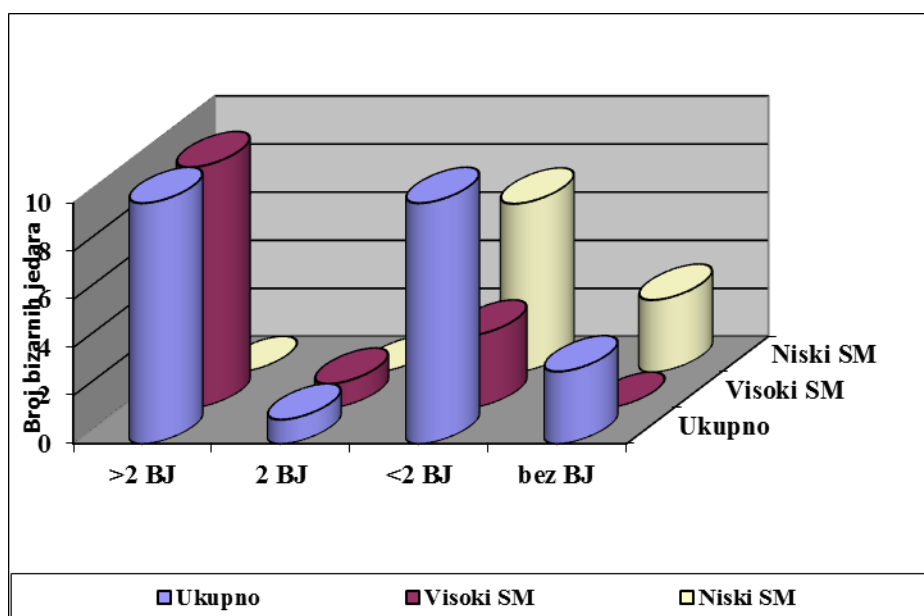




**Slika 9.** Bizarna jedra kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, HE, x 400



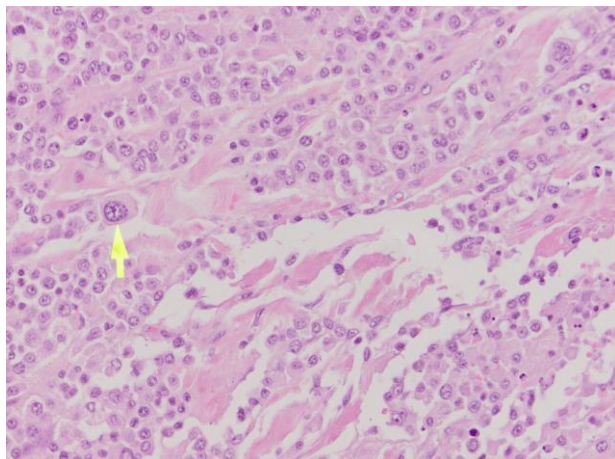
**Slika 10.** Odsustvo bizarnih jedara kod mastocitoma niskog stepena maligniteta, HE, x 400



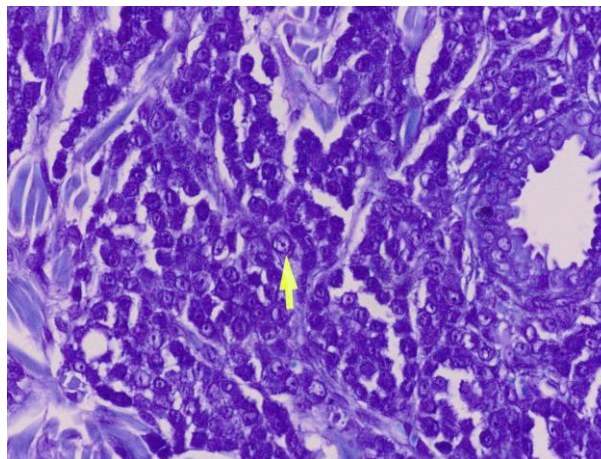
**Grafikon 8.** Prisustvo bizarnih jedara kod mastocitoma visokog i niskog stepena maligniteta

### *Prisustvo kariomegalije*

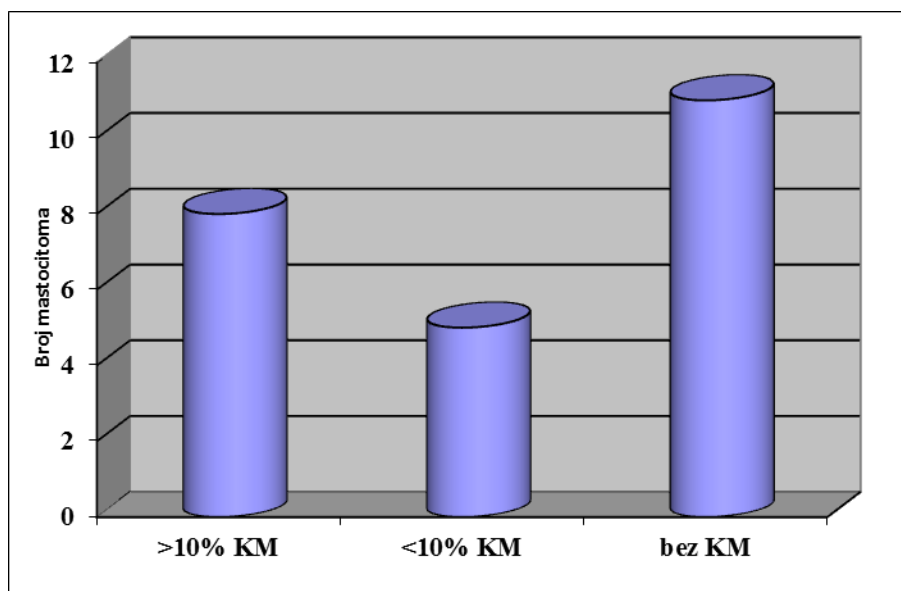
Osam mastocitoma sadrži više od 10% anaplastičnih mastocita sa jedrima promera oko 8-10 mikrometara (Slika 11 i 12), dok 5 mastocitoma sadrže manje od 10% ćelija sa povećanim jedrom. Kod 11 mastocitoma nije prisutna kariomegalija (Grafikon 9). Prisustvo kariomegalije je uočeno kod 57,14% mastocitoma visokog stepena maligniteta i ne može se smatrati statistički značajnim ( $p > 0,05$ ) parametrom za klasifikaciju mastocitoma po Kiupel-u.



**Slika 11.** Kariomegalija kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, HE, x 400



**Slika 12.** Kariomegalija kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, TB, x 600

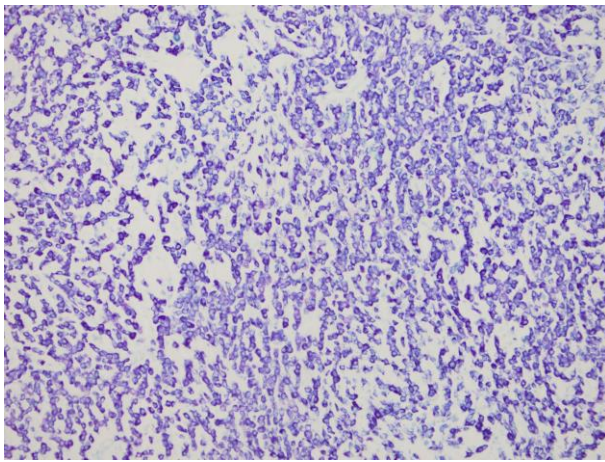


**Grafikon 9.** Prisustvo kariomegalije kod mastocitoma visokog i niskog stepena maligniteta

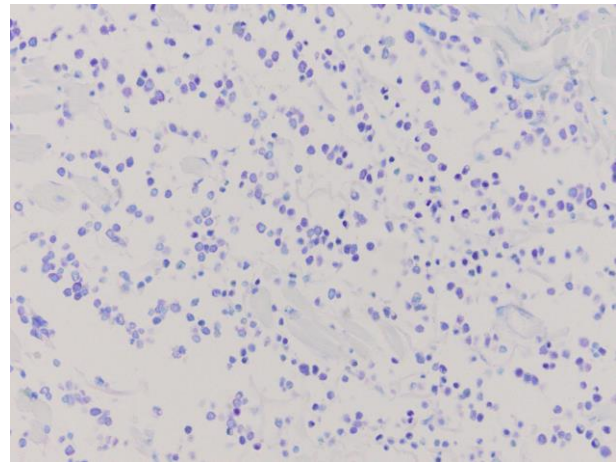
Na histopatološkim preparatima 6 uzoraka kože uzetih od pasa iz kontrolne grupe nije uočeno prisustvo mitotskih figura, multinuklearnih ćelija, bizarnih jedara i kariomegalije.

### 5.2.2. Mikroskopski nalaz na preparaima bojenim toluidine blue metodom

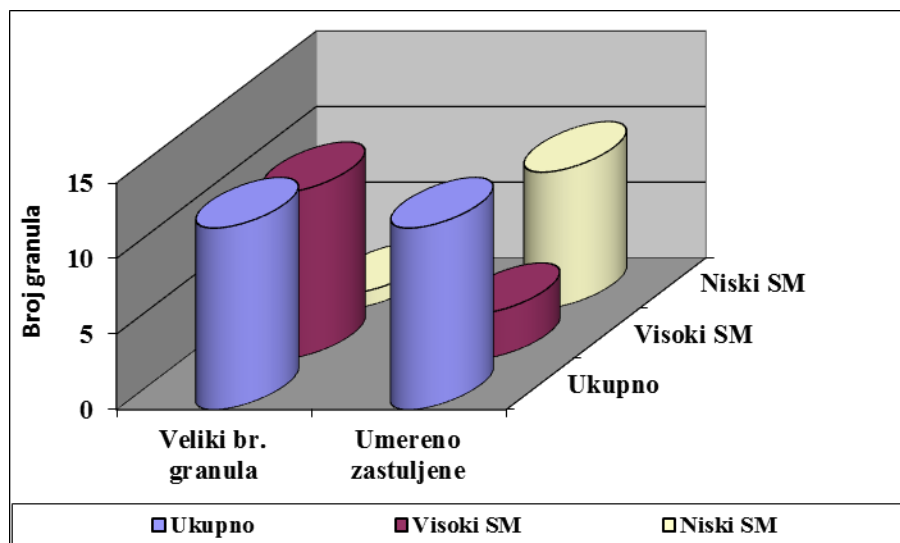
Radi potvrđivanja dijagnoze, preparati su obojeni *toluidin blue* metodom radi vizuelizacije granula. Kod svih 24 uzoraka tumora citoplazmatske granule su pokazale metahromaziju, čime je potvrđena dijagnoza mastocitoma (Slika 12 i 13). Kod 13 tumora (jedanaest mastocitoma visokog stepena maligniteta i dva mastocitoma niskog stepena maligniteta) granule su bile prisutne u malom broju, dok su kod preostalih 11 mastocitoma one bile zastupljene u većem broju (3 mastocitoma visokog i 8 mastocitoma niskog stepena maligniteta) (Grafikon 10).



**Slika 13.** Prisustvo velikog broja citoplazmatskih granula kod mastocitoma, TB, x 400



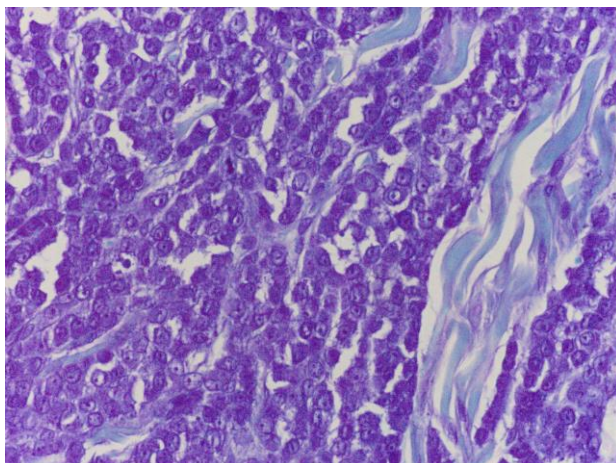
**Slika 14.** Prisustvo malog broja citoplazmatskih granula kod mastocitoma, TB, x 400



**Grafikon 10.** Stepen degranulacije mastocita kod mastocitoma visokog i niskog stepena maligniteta



Intenzivna degranulacija mastocita uočena je kod 12 tumora, od kojih je jedan niskog stepena maligniteta, a 11 visokog stepena maligniteta (Slika 15).



**Slika 15.** Degranulacija mastocita u mastocitomima visokog stepena maligniteta, TB, x 600

### **5.3. Klasifikacija mastocitoma**

Na osnovu:

1. prisustva mitotskih figura
2. prisustva multinuklearnih ćelija
3. prisustva bizarnih jedara
4. prisustva kariomegalije

svi mastocitomi su klasifikovani prema Kiupel-ovom predlogu dvostepene gradacije (Kiupel *i sar.*, 2011). U ispitanom materijalu 14 od 24 mastocitoma ima ili najmanje 7 mitotskih figura ili najmanje 3 multinuklearne ćelije ili najmanje 3 bizarna jedra na 10 hpf ili prisustvo kariomegalije kod minimum 10% anaplastičnih mastocita, te su svrstani u visoki stepen maligniteta, dok je 10 mastocitoma niskog stepena maligniteta (Tabela 3).



**Tabela 3.** Histopatološke karakteristike mastocima visokog i niskog gradusa

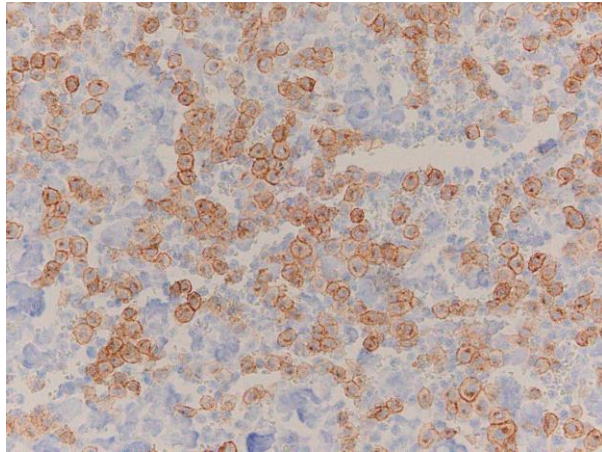
| Karakteristika tumora                              | >6 MF | ≤6 MF | >2 MĆ | ≤2 MĆ | >2 BJ | ≤2BJ | >10% KM |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|------|---------|
| Broj tumora  | 7     | 17    | 11    | 13    | 10    | 14   | 8       |
| Ukupan broj mastocitoma visokog stepen maligniteta | 14    |       |       |       |       |      |         |
| Ukupan broj mastocitoma niskog stepen maligniteta  | 10    |       |       |       |       |      |         |

Histopatološke osobine tumora: MF=broj mitotskih figura, MĆ=broj multinuklearnih ćelija, BJ=broj bizarnih jedara, KM=kariomegalija

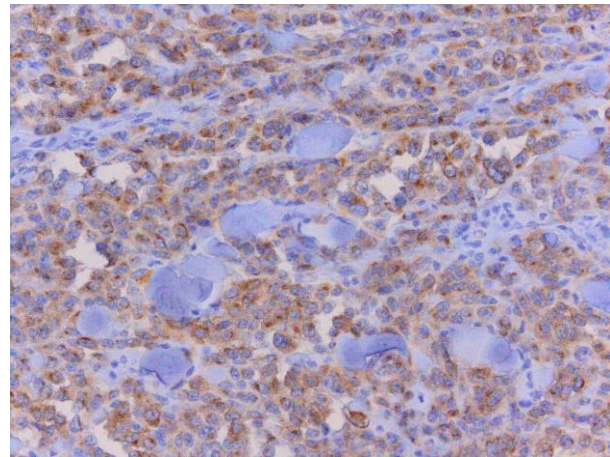
#### **5.4. Imunohistohemijski parametri značajni za klasifikaciju mastocitoma**

##### **5.4.1. Imunohistohemijska ekspresija KIT receptora (CD117) u mastocitomima**

Imunohistohemijskim bojenjem potvrđeno je prisustvo CD117 receptora u isečcima tkiva kože pasa sa mastocitomom. Mikroskopskim pregledom preparata uočavaju se tri tipa imunohistohemijskog bojenja mastocita pozitivnih na CD117. Tip I se karakteriše prebojavanjem membrane mastocita usled lokalizacije KIT proteina u membrani ćelija, dok je prebojavanje citoplazme prisutno u maloj meri ili potpuno izostaje (Slika 16). Tip II se karakteriše difuznim prebojavanjem citoplazme (Slika 17). Tip III je takođe vezan za prisustvo KIT proteina u citoplazmi neoplastičnih mastocita i karakteriše se intenzivnim fokalnim prebojavanjem citoplazme neoplastičnih mastocita.



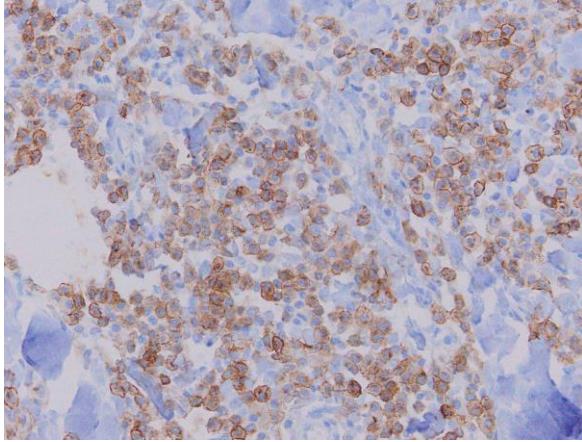
**Slika 16.** Ekspresija CD117, tip I – intenzivna membranska reakcija mastocita, citoplazmatska reakcija prisutna u maloj meri ili potpuno izostaje, CD117, LSAB2, x 400



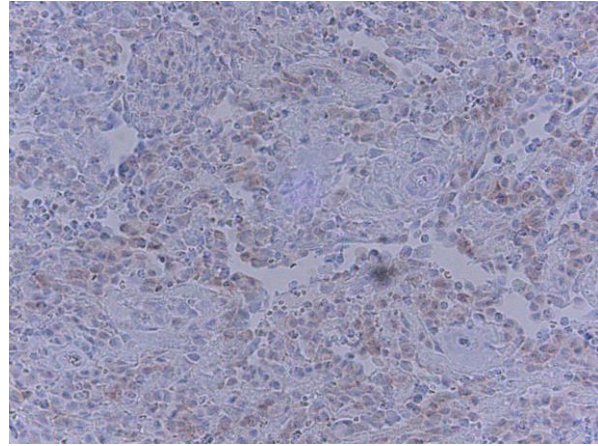
**Slika 17.** Ekspresija CD117, tip II – difuzna citoplazmatska reakcija mastocita, CD117, LSAB2, x 400

Membransku ekspresiju CD117 ima 62,5% (15 od 24) mastocitoma i to svih 10 mastocitoma niskog stepena maligniteta i 5 mastocitoma visokog stepena maligniteta. Od ukupnog broja mastocitoma, 20,8% (5 od 24) ispoljava difuznu citoplazmatsku ekspresiju CD117, dok nijedan mastocitom ne pokazuje samo fokalnu citoplazmatsku reakciju mastocita na CD117. Mešoviti tip ekspresije KIT proteina takođe se uočava kod pojedinih tumora gde postoji varijabilan odnos mastocitoma sa različitim tipom ekspresije: 12,5% od ukupnog broja tumora (3 od 24) pokazuje i fokalnu citoplazmatsku i membransku ekspresiju (Slika 18), dok 4,2% (1 od 24) mastocitoma ima membransku i difuznu citoplazmatsku ekspresiju KIT proteina (Slika 19).

Dobijeni rezultati pokazuju da ne postoji statistički signifikantna razlika između različitih tipova citoplazmatske ekspresije CD117 kod mastocitoma visokog stepena maligniteta ( $p=0,285049$ ).



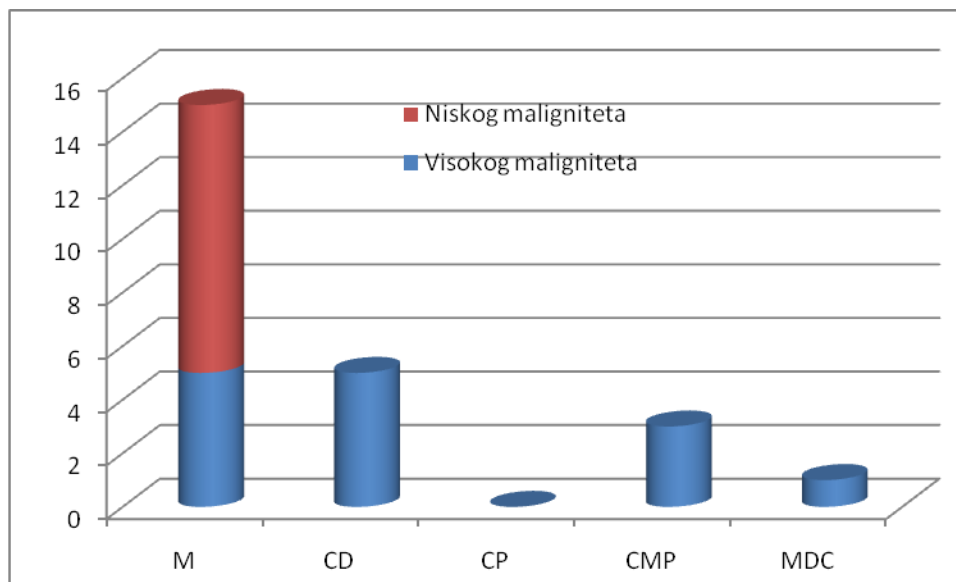
**Slika 18.** Ekspresija CD117, mešoviti tip – membranska i fokalna citoplazmatska reakcija mastocita, CD117, LSAB2, x 400



**Slika 19.** Ekspresija CD117, mešoviti tip – membranska i difuzna citoplazmatska reakcija mastocita, CD117, LSAB2, x 400

Odnos između različitih tipova ekspresije KIT proteina i histološkog stepena maligniteta prikazan je na Grafikonu 11. Od mastocitoma višeg stepena maligniteta 5 mastocitoma ispoljava membranski tip ekspresije. Svi mastocitomi nižeg stepena maligniteta ispoljavaju samo membransku ekspresiju CD117.

Nijedan od navedenih tipova ekspresije KIT proteina nije uočen na preparatima kože pasa iz kontrolne grupe nakon imunohistohemijskog bojenja na CD117.

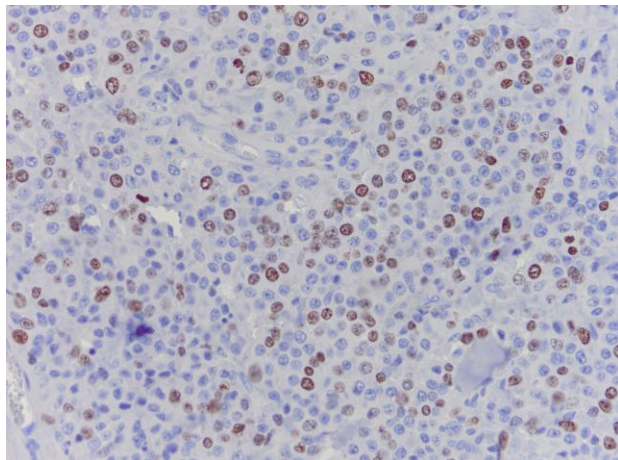


**Grafikon 11.** Ekspresija CD117 (KIT) u mastocitomima visokog i niskog stepena maligniteta: M- membranska, CD- difuzna citoplazmatska, CP- fokalna citoplazmatska, CMP- fokalna citoplazmatska i membranska, MDC- membranska i difuzna citoplazmatska

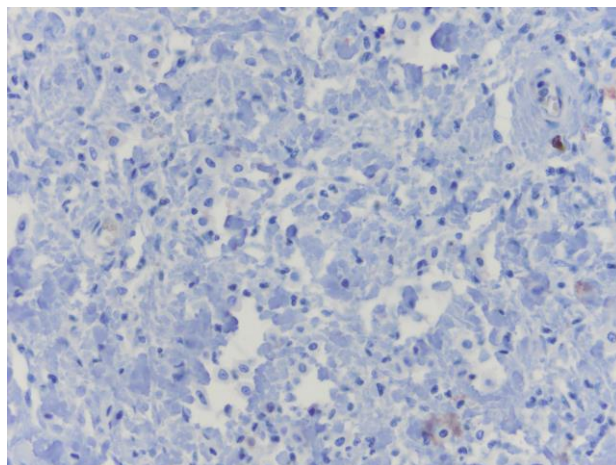
#### 5.4.2. Imunohistohemijska ekspresija Ki-67 u mastocitomima

Ki-67 protein je prisutan u svim aktivnim fazama ćelijskog ciklusa (G1, S, G2 i mitozu), ali ga nema u fazi mirovanja ćelije (G0). Jedra mastocita imunohistohemijski pozitivnih na Ki-67 obojena su smeđe, imajući u vidu da je DAB korišćen kao hromogen (Slika 20), dok se u citoplazmi ne uočavaju obojena područja. Pozitivne ćelije su ravnomerno raspoređene u neoplastičnom tkivu mastocitoma.

Od ukupno 24 mastocitoma, 9 mastocitoma je Ki-67 pozitivno, od čega 7 pripada mastocitomima višeg stepena maligniteta, a dva, mastocitomima nižeg stepena maligniteta. Petnaest mastocitoma je Ki-67 negativno (Slika 21, Grafikon 12).



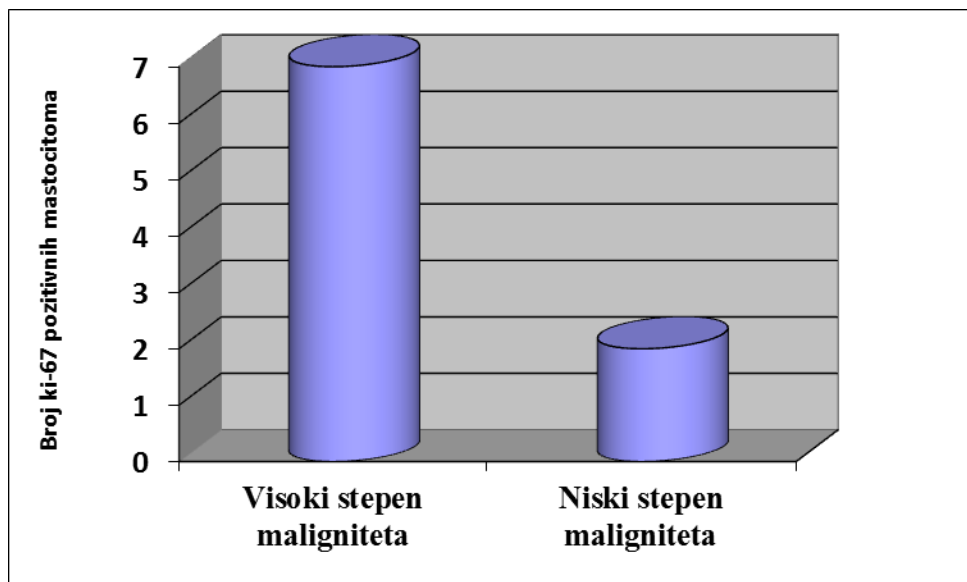
**Slika 20.** Mastocitomi visokog stepena maligniteta - ekspresija Ki-67 u jedrima mastocitima, Ki-67, LSAB2, x 400



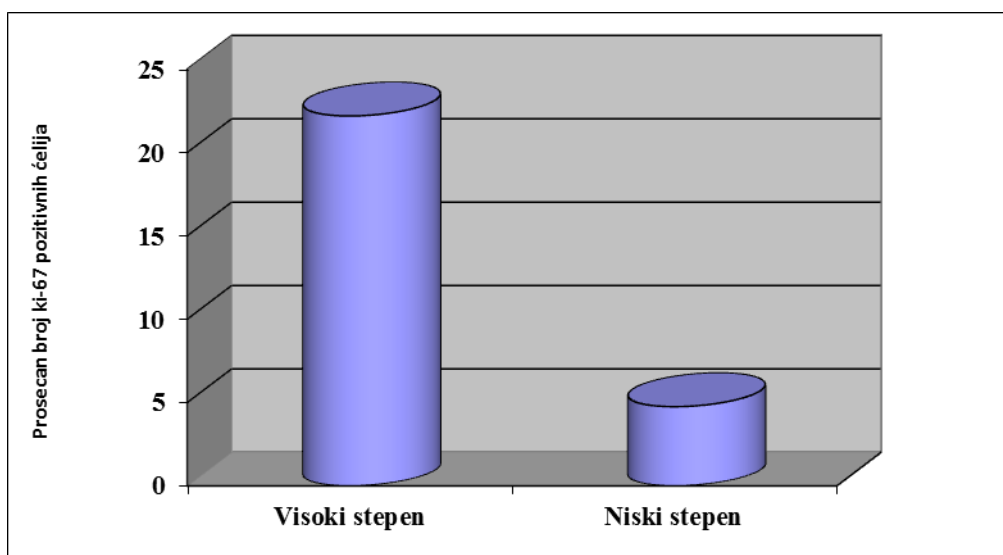
**Slika 21.** Mastocitom niskog stepena maligniteta - ne uočava se ekspresija Ki-67, Ki-67, LSAB2, x 400

Prosečna vrednost broja Ki-67 pozitivnih ćelija na 10 polja velikog uvećanja (10hpf) kod mastocitoma visokog stepena maligniteta iznosi  $22,19 \pm 4,75$ , dok je za mastocitome niskog stepena maligniteta pomenuta vrednost  $4,75 \pm 2,13$  (Grafikon 13). Na osnovu dobijenih vrednosti uočavamo da postoji statistički značajna razlika u broju Ki-67 pozitivnih ćelija kod mastocitoma visokog i mastocitoma niskog stepena maligniteta ( $t=10,80$ ).

Imunohistohemijским bojenjem isečaka kože pasa iz kontrolne grupe na Ki-67 nije uočena ekspresija Ki-67 pozitivnih ćelija.



*Grafikon 12.* Broj Ki-67 pozitivnih mastocitoma visokog i niskog stepena maligniteta

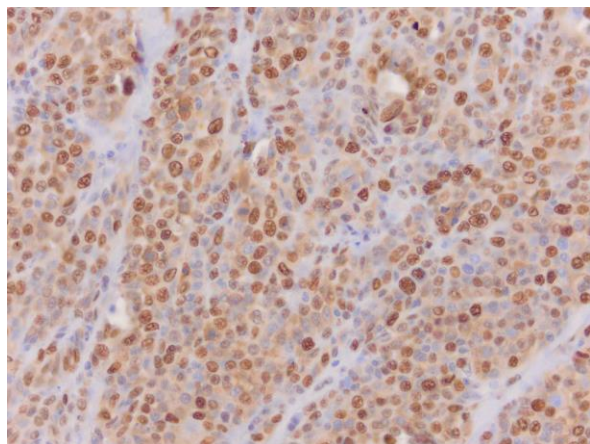


*Grafikon 13.* Prosečan broj Ki-67 pozitivnih ćelija kod mastocitoma u odnosu na stepen maligniteta

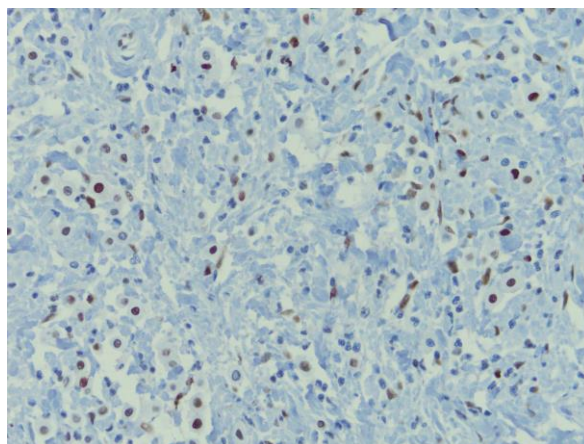


### 5.4.3. Imunohistohemijska ekspresija PCNA u mastocitomima

Imunohistohemijskim bojenjem na PCNA označavaju se ćelije koje su u deobi ili kod kojih je došlo do reparacije DNK. Jedra mastocita pozitivnih na PCNA su narandžaste do crvene boje, uglavnom granularne strukture (Slika 22 i 23). Pozitivne ćelije se nalaze u manjim grupama, a intenzitet boje varira.



*Slika 22.* Mastocitomi visokog stepena maligniteta - ekspresija PCNA na mastocitima, PCNA, LSAB2, x 400



*Slika 23.* Mastocitomi niskog stepena maligniteta - ekspresija PCNA na mastocitima, PCNA, LSAB2, x 400

Svi ispitani mastocitomi su PCNA pozitivni mastocitomi. Razlika postoji u intenzitetu ekspresije PCNA. Kod mastocitoma visokog stepena maligniteta uočava se veliki broj PCNA pozitivnih ćelija koje su intenzivno obojene (Slika 22), dok su PCNA pozitivne ćelije kod mastocitoma niskog stepena maligniteta malobrojnije i intenzitet prebojavanja je znatno slabiji (Slika 23). Uočena razlika u intenzitetu ekspresije PCNA kod mastocitoma visokog i niskog stepena maligniteta nije statistički značajna.

Prosečna vrednost broja PCNA pozitivnih ćelija na 10 polja velikog uvećanja (10hpf) kod mastocitoma visokog stepena maligniteta iznosi  $29,22 \pm 7,79$ , a kod mastocitoma niskog stepena maligniteta  $28,81 \pm 8,09$ . Na osnovu dobijenih vrednosti uočavamo da ne postoji statistički značajna razlika u broju PCNA pozitivnih ćelija kod mastocitoma visokog i mastocitoma niskog stepena maligniteta ( $t=0,22$ ).

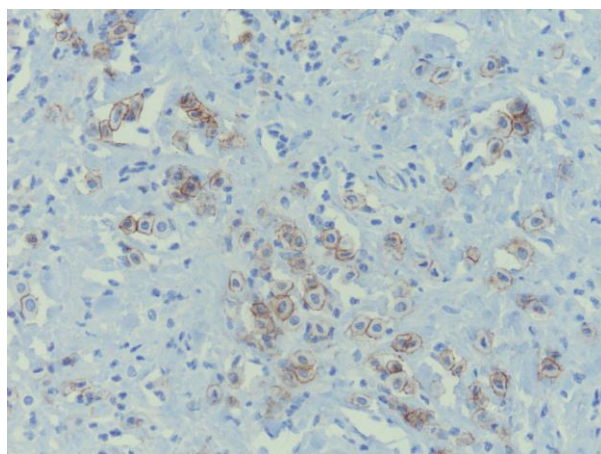
Isečci kože pasa iz kontrolne grupe, nakon imunohistohemijškog bojenja na PCNA, u dva slučaja pokazuju umerenu ekspresiju PCNA pozitivnih ćelija.

#### 5.4.4. Imunohistohemijška ekspresija CD45RA u mastocitomima

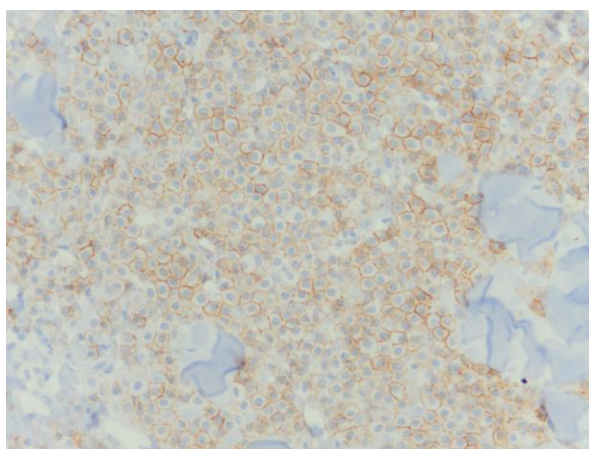
CD45RA je izoforma CD45 i predstavlja receptorski molekul koji se osim na mastocitima, ekspirira i na B-limfocitima, CD4+ i CD8+ T-limfocitima.

Ekspresija CD45RA se uočava kako na mastocitima visokog stepena maligniteta (Slika 24), tako i na mastocitima niskog stepena maligniteta (Slika 25).

Imunohistohemijškim bojenjem isečaka kože pasa iz kontrolne grupe na CD45RA uočena je slaba ekspresija CD45RA pozitivnih ćelija.



**Slika 24.** Mastocitomi visokog stepena maligniteta - ekspresija CD45RA na mastocitima, CD45RA, LSAB2, x 400

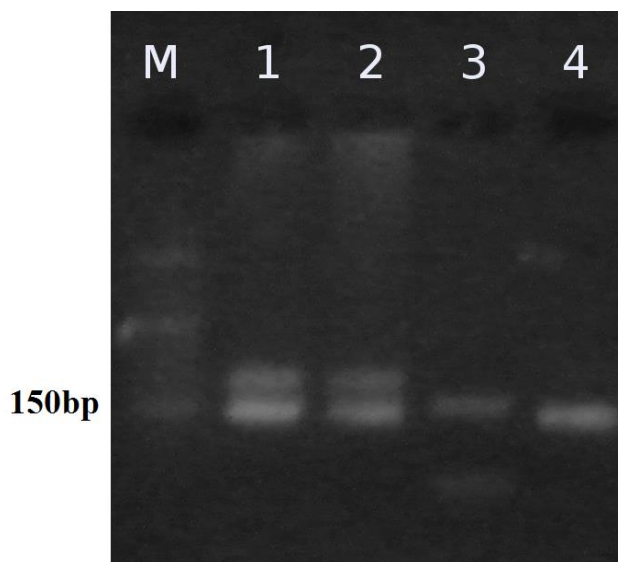


**Slika 25.** Mastocitomi niskog stepena maligniteta - ekspresija CD45RA na mastocitima, CD45RA, LSAB2, x 400

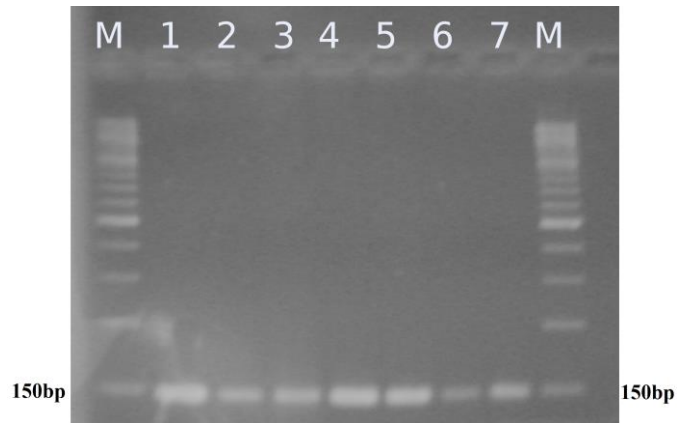


## 5.5. Prisustvo mutacija

Određivanje prisustva c-KIT mutacija na parafinskim isečcima uzoraka mastocitoma fiksiranih u formalinu je vršeno kod 24 psa, kao i na uzorcima zdrave kože 6 pasa iz kontrolne grupe. Ni kod jednog od ispitivanih uzoraka nije detektovano prisustvo c-KIT mutacije (prisustvo ITD na egzonu 11), odnosno na svim uzorcima izostaje prisustvo dve trake veličine ~150bp i ~250bp koje se mogu zapaziti kod pozitivne kontrole za koju je korišćen uzorak mastocitoma sa c-KIT mutacijom (Slika 26). Kod svih ispitivanih mastocitoma je detektovan normalan c-KIT protoonkogen, tj. vizuelizovana je jedna traka veličine ~150bp (Slika 27).



**Slika 26.** PCR amplifikacija egzona 11 c-KIT protoonkogen mastocitoma pasa;  
M – Marker, 1 – Pozitivna kontrola (interna tandem duplikacija), 2 – Pozitivna kontrola (interna tandem duplikacija), 3 – Normalni c-KIT protoonkogen, 4 – Normalni c-KIT protoonkogen



**Slika 27.** PCR amplifikacija egzona 11 c-KIT protoonkogeno mastocitoma pasa;  
M – Marker, 1 – Normalni c-KIT protoonkogen, 2 – Normalni c-KIT protoonkogen, 3 – Normalni c-KIT protoonkogen, 4 – Normalni c-KIT protoonkogen, 5 – Normalni c-KIT protoonkogen, 6 – Normalni c-KIT protoonkogen, 7 – Normalni c-KIT protoonkogen, M – Marker

## 6. DISKUSIJA

Prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (*The World Health Organization – WHO*, eng.) tumora kod domaćih životinja, mastocitomi pripadaju grupi mezenhimskih tumora kože i mekih tkiva. Pored kože, mastocitomi se mogu javiti i na crevima, jetri, slezini i drugim organima (Hendrick *i sar.*, 1998). Biološko ponašanje mastocitoma je vrlo različito, neki tumori su benignog karaktera, dok drugi pokazuju agresivan rast i sklonost ka metastaziranju (Preziosi *i sar.*, 2007). Kutani mastocitomi čine 7% do 21% svih tumora kože pasa i stoga su jedan od najučestalijih tumora kože. Oni predstavljaju 11% do 27% svih zloćudnih tumora kože pasa. Obično se javljaju pojedinačno, mada su zabeleženi i multipli kožni mastocitomi. Nejasno je da li su multipli mastocitomi posledica metastaza primarnog mastocitoma ili svaki tumor ima odvojeno poreklo (Turin *i sar.*, 2006; Thamm *i sar.*, 2007).

Na osnovu rezultata dobijenih u našem istraživanju najveća učestalost mastocitoma uočena je kod pasa rase zlatni retriver (37,5%), a zatim kod pasa rase bokser (20,7%). Većina autora navodi da su mastocitome najčešće dijagnostikovali kod pasa rase bokser (London *i sar.*, 2003; Webster *i sar.*, 2006a; Gil da Costa *i sar.*, 2007; Welle *i sar.*, 2008). Drugi smatraju da iako bokseri imaju povećan rizik od nastanka mastocitoma, kod njih se uglavnom javljaju mastocitomi niskog stepena maligniteta koji imaju povoljniju prognozu (Thamm *i sar.*, 2007). Za razliku od prethodnih autora, drugi autori su najveći broj mastocitoma dijagnostikovali kod pasa rase labrador retriver (Romansik *i sar.*, 2007). Poređenjem naših rezultata sa navedenim nalazima drugih istraživača, jasno je da se može govoriti o rasnoj predispoziciji za mastocitome kod pasa rase bokser i labrador retriver.

Praćenjem pojave mastocitoma u pojedinim starosnim kategorijama, ustanovili smo da prosečna starost pasa sa mastocitomima u našem materijalu iznosi 7,6 godina, što je u korelaciji sa starošću pasa koji su obuhvaćeni sličnim ispitivanjima. Tako na primer, pojedini autori navode prosečnu starost pasa sa mastocitomom od 7,7 godina (Simoes *i sar.*, 1994), kod drugih ta starost iznosi 7 godina (Fulcher *i sar.*, 2006), odnosno 7,3 godine (Ginn *i sar.*, 2007).

Dok usaglašenost postoji sa drugim autorima po pitanju starosti i rasne pripadnosti obolelih pasa, naši rezultati vezani za pol pasa sa mastocitomima, znatno se razlikuju. Mastocitomi su kod pasa sa teritorije Republike Srbije u većem broju dijagnostikovani kod mužjaka nego kod ženki, tako da približan odnos iznosi 2:1 u korist mužjaka. Za razliku od naših nalaza, većina autora (Simoes *i sar.*, 1994; Fulcher *i sar.*, 2006; Ginn *i sar.*, 2007) navodi da su mastocitomi češće prisutni kod ženki (približno 1:1,3). Drugi autori iznose podatke po kojima ne postoji predispozicija vezana za pol (Thamm *i sar.*, 2007).

Kod najvećeg broja pasa kod kojih smo dijagnostikovali mastocitom, pomenuti tumor je bio lokalizovan na ekstremitetima (33,3%). Prema jednom istraživanju, ekstremiteti se takođe opisuju kao najčešća lokalizacija mastocitoma, dok su u jednoj grupi pasa ovi tumori najčešće bili lokalizovani na trupu životinje (Thompson, 2012). Prema ranijim ispitivanjima na našoj teritoriji, takođe je zabeležena najveća zastupljenost mastocitoma na ekstremitetima pasa (Kovacevic *i sar.*, 2005). Međutim, u zemljama u okruženju navodi se da su mastocitomi kod pasa najčešće bili lokalizovani na trupu (50-60%), ekstremitetima (25 - 40%), glavi i vratu (10%), dok se na skrotumu, međici, leđima i repu tumor ređe sreće (Welle *i sar.*, 2008). Lokalizacija mastocitoma prema nekim autorima veoma je bitna sa prognostičkog aspekta (Turrel *i sar.*, 1988; Thamm *i sar.*, 2006). Prema njihovim ispitivanjima, psi sa mastocitomima na trupu imaju lošiju prognozu, dok drugi smatraju da ne postoji takva korelacija, već da se tumori na ekstremitetima lakše uoče dok su još manjih dimenzija, odnosno u ranijem stadijumu (O'Connell *i sar.*, 2011).

Objektivni prediktivni parametri kod mastocitoma ipak su uslovljeni mikroskopskim pregledom. U našem materijalu na tkivnim isečcima bojenim hematoksilin-eozinom, mikroskopskim pregledom kod dobro diferentovanih mastocitoma, uočavaju se ćelije uniformnog oblika sa obilnom citoplazmom i okruglim jedrom. Brojne metahromatske granule, dokazane *toluidin blue* metodom, ispunjavaju citoplazmu tumorskih ćelija. Drugi autori opisuju postojanje uniformnih ćelija kod dobro diferentovanih mastocitoma. One su poređane u redove ili su u vidu rastresitih ploča. Granice ćelija su jasno vidljive, a u citoplazmi su prisutne sivkasto-plave granule (Gross *i sar.*, 2005). Većina neoplastičnih mastocita sadrži citoplazmatske granule koje se sasvim diskretno boje sivo-plavo pri bojenju uzorka hematoksilin-eozinom, odnosno intenzivno plavo-ljubičasto ukoliko se preparat boji *toluidin blue* bojenjem (Hendrick *i sar.*, 1998). Granule mastocita, između ostalog, sadrže i histamin, tako da prilikom degranulacije

mastocita dolazi do oslobađanja histamina sa posledičnom pojavom svraba. Upravo zbog mogućnosti oslobađanja histamina prilikom ekscizije tumora, mora se voditi računa o širini hirurških margina kako ne bi došlo do oštećenja tumorskih ćelija.

Kod slabo diferentovanih mastocitoma uočili smo ćelije sa jasno izraženim granicama, čija su jedra velika i nepravilnog oblika, dok pojedine ćelije imaju više jedaraca. Kod manjeg broja slabo diferentovanih mastocitoma ćelije su poređane u redove, dok su kod ostalih mastocitoma one nepravilno raspoređene. Tumorske ćelije duboko infiltruju subkutis i mogu se uočiti brojne mitotske figure. Na preparatima se zapažaju i nekrotična polja. Značajan broj mastocitocita je degranulisan, tako da se citoplazmatske granule uglavnom uočavaju i izvan ćelija, a u malom broju u citoplazmi samih mastocita. Sličan histopatološki nalaz za slabo diferentovane mastocitome sreće se i kod drugih autora koji ih opisuju kao nedovoljno diferentovane, slabo ograničene sa prodiranjem duboko u subkutis. Veoma se često zapažaju ulceracije i nekroza. Ćelije ovakvih tumora su okrugle do poligonalne, često i izrazito polimorfne. Uglavnom su tumorske ćelije poređane u redove ili obrazuju gnezda. Granice ćelija su slabo definisane, jedra su krupna sa prominentnim jedarcetom, dok je citoplazma svetla sa oskudnim brojem granula (Gross *i sar.*, 2005).

Pored stepena diferencijacije na osnovu mikroskopskog nalaza, u cilju predviđanja biološkog ponašanja tumora, koriste se i različiti drugi kriterijumi, kao što su klinička slika, stepen rasta i proliferativna aktivnost mastocitoma. Histološka građa se čini najdosljednijim prediktivnim parametrom i u bliskoj je vezi sa sistemom klasifikacije mastocitoma koji je predložio Patnaik (Patnaik *i sar.*, 1984; Preziosi *i sar.*, 2007). Najčešće korišćeni histopatološki sistemi klasifikacije mastocitoma su Bostock-ov sistem klasifikacije iz 1973. godine i Patnaik-ov sistem klasifikacije iz 1984. godine. Oba sistema podrazumevaju klasifikaciju mastocitoma u tri stepena, s tim što klasifikaciju vrše obrnutim redosledom, pa se tako dobro diferentovani mastocitomi prema Bostock-u svrstavaju u mastocitome III stepena, dok prema Patnaik-u oni pripadaju mastocitomima I stepena. Na osnovu oba sistema klasifikacije, slabo diferentovani mastocitomi uzrokuju kraće vreme preživljavanja pacijenta, u poređenju sa srednje i dobro diferentovanim mastocitomima (Bostock, 1973; Patnaik *i sar.*, 1984). Histološki kriterijumi ocenjivanja mastocitoma koji se koriste prilikom Bostock-ove klasifikacije obuhvataju: odnos citoplazme i jedra, mitotske figure, pleomorfnost ćelija, tumorsku celularnost i prisustvo metahromatskih granula (Bostock, 1973). Prema Patnaik-u mastocitomi se dele na tri stepena

maligniteta na osnovu stepena diferentovanosti, celularnosti, ćelijske morfologije, mitotskog indeksa, reakcije tkiva i stromalne reakcije (Patnaik *i sar.*, 1984).

Mitotski indeks je veoma pouzdan pokazatelj ćelijske proliferacije kao i AgNOR i Ki-67. Dok je za dokazivanje AgNOR i Ki-67 potrebno uraditi imunohistohemijsko bojenje preparata, procena mitotskog indeksa ne zahteva posebne metode bojenja i može se vršiti u rutinskoj dijagnostici na preparatima isečaka tkiva bojenih hematoksilin-eozinom. U humanoj medicini, mitotski indeks je veoma bitan prognostički faktor za slabo diferentovani karcinom tiroidee, a pokazao se i kao najbolji parametar za procenu ishoda nakon hirurške terapije gastrointestinalnog stromalnog tumora (Wong *i sar.*, 2003; Volante *i sar.*, 2004). Nekoliko istraživanja ukazuje na značaj mitotskog indeksa u prognozi ishoda kod pacijenata koji boluju od kancera dojke, te je, stoga, često uključen u određivanje gradusa tumora (Biesterfeld *i sar.*, 2001). Prema Patnaik-u kod mastocitoma I stepena ne uočavaju se mitotske figure, kod mastocitoma II stepena mitotski indeks iznosi 0 - 2 mitotske figure po vidnom polju velikog uvećanja (*High-power Fields* – hpf, eng.), dok se kod mastocitoma III stepena taj broj kreće od 3 do 6 mitotskih figura po hpf (Patnaik *i sar.*, 1984).

Klasifikacija mastocitoma prema Patnaik-ovom sistemu na mastocitome niskog (stepen I), srednjeg (stepen II) i visokog (stepen III) stepena maligniteta uglavnom se vrši na osnovu subjektivnih parametara (Thomson, 2012). Iako se histološka građa mastocitoma smatra zlatnim standardom za njihovu klasifikaciju, dominacija mastocitoma II stepena i subjektivnost ocenjivača su karakteristike koje se često navode kao slabosti Patnaik-ove klasifikacije mastocitoma (Northrup *i sar.*, 2005; Kiupel *i sar.*, 2011). Kao dodatni nedostatak Patnaik-ovog sistema klasifikacije smatra se kriterijum po kome mastocitomi III stepena imaju 3-6 mitotskih figura na jednom polju velikog uvećanja (400x), čime se isključuje jedan broj tumora sa niskim mitotskim indeksom za koje se smatra da takođe mogu biti biološki agresivni (Kiupel *i sar.*, 2011; Stern 2012). Procenat recidiva kod nepotpuno hirurški odstranjenih mastocitoma iznosio je 50% (Ozaki *i sar.*, 2007), što ukazuje na potrebu postojanja preciznijeg sistema klasifikacije mastocitoma (Stern, 2012).

Zbog navedenih nedostataka dosadašnjih histopatoloških sistema klasifikacije, Kiupel 2011. godine predlaže dvostepeni sistem klasifikacije mastocitoma na mastocitome visokog i niskog stepena maligniteta. Prema novom, dvostepenom sistemu klasifikacije mastocitoma, postoji značajna korelacija između mastocitoma visokog stepena maligniteta i bržeg javljanja

metastaza, kao i kraćeg vremena preživljavanja pacijenata (Kiupel *i sar.*, 2011; Stern, 2012). Predloženi dvostepeni sistem gradiranja trebao bi da se koristi pri svakom rutinskom histološkom ispitivanju i dijagnostikovanju mastocitoma. Za mastocitome visokog stepena maligniteta treba primeniti dodatna ispitivanja, kao što su određivanje ekspresije KIT receptora i skrining na c-KIT mutacije, kako bi se odredila adekvatna terapija. Životinje sa mastocitomima niskog stepena maligniteta treba klinički pratiti, a dalje prognoze davati na osnovu ekspresije markera proliferacije (Ki-67 i PCNA), KIT ekspresije, postojanja c-KIT mutacija i drugih parametara, kako bi se odredio rizik nastanka metastaza i odabrao odgovarajući vid terapije (Kiupel *i sar.*, 2011).

Prema kriterijumima dvostepene klasifikacije, mastocitomi pregledani u okviru našeg istraživanja klasifikovani su u mastocitome visokog i mastocitome niskog stepena maligniteta. Od ukupno 24 mastocitoma pasa, četrnaest pripada mastocitomima visokog stepena maligniteta, dok deset mastocitoma ima morfološke karakteristike koje ukazuju na nizak stepen maligniteta. Na osnovu dvostepene podele, mastocitomi visokog stepena maligniteta ispunjavaju bar jedan od navedenih kriterijuma: prisustvo najmanje 7 mitotskih figura na 10 hpf, najmanje 3 multinuklearne ćelije na 10 hpf, najmanje 3 bizarna jedra na 10 hpf ili prisustvo kariomegalije kod najmanje 10% neoplastičnih ćelija (Kiupel *i sar.*, 2011).

Od 14 mastocitoma visokog stepena maligniteta u ispitanom materijalu, kod 7 je uočeno više od šest mitotskih figura na 10 hpf. Dok pojedini autori smatraju da i mastocitomi nižeg stepena maligniteta, I i II stepena prema Patnaikovoj podeli, mogu da metastaziraju, te da određivanje samo mitotskog indeksa nije pouzdan način predviđanja ponašanja tumora (Patnaik *i sar.*, 1984; Weisse *i sar.*, 2002; Séguin *i sar.*, 2006; Webster *i sar.*, 2007), drugi autori smatraju da je mitotska aktivnost ključna osobina za prognozu ponašanja mastocitoma (Romansik *i sar.*, 2007; Kiupel *i sar.*, 2011). Neki autori u svojim radovima nisu zabeležili značajne razlike u vremenu preživljavanja pasa sa tumorima čiji je mitotski indeks 0-4/10 hpf i onih čiji je mitotski indeks 5-10/10 hpf. Međutim, stopa smrtnosti je znatno viša kod pasa sa tumorima čiji je mitotski indeks veći od 10/10 hpf (Bostock *i sar.*, 1989; Scarpa *i sar.*, 2013).

Pojedini autori smatraju da se smrtnost povećava već u slučajevima kada je mitotski indeks veći od 5/10 hpf (O'Connell i Thomson, 2011). Drugi smatraju da je mitotski indeks bitan parametar za predviđanje biološkog ponašanja kutanog mastocitoma i ukazuju na značajnu

povezanost mitotskog indeksa i pojave metastaza poreklom od mastocitoma. Ovim ujedno ukazuju i na vreme preživljavanja (Romansik *i sar.*, 2007).

Mikroskopskim pregledom materijala kod 11 mastocitoma visokog stepena maligniteta u našem ispitanom materijalu, uočeno je prisustvo više od dve multinuklearne ćelije na 10 hpf, dok kod mastocitoma niskog stepena maligniteta nije zabeleženo prisustvo multinuklearnih ćelija. Činjenica da su više od dve multinuklearne ćelije prisutne kod 78,57% ispitanih uzoraka mastocitoma visokog stepena maligniteta ukazuje na značajnu povezanost prisustva multinuklearnih ćelija i većeg maligniteta mastocitoma. Neka ispitivanja ukazuju da postoji značajna povezanost između broja multinuklearnih ćelija u mastocitomu i vremena preživljavanja pasa, tako da se vreme preživljavanja pasa smanjivalo sa povećanjem broja multinuklearnih ćelija (Thompson, 2012). Tako, na primer pretpostavljeno vreme preživljavanja za psa sa mastocitomom, kod koga je mitotski indeks veći od 4 uz prisustvo multinuklearnih ćelija, iznosilo je 140 dana, dok kod onih sa mitotskim indeksom manjim od 4, ali bez multinuklearnih ćelija, vreme preživljavanja je iznosilo 950 dana. Uz pomenute histološke parametre, našom analizom histoloških uzoraka mastocitoma uočeno je 10 mastocitoma sa više od dve ćelije sa bizarnim jedrom na 10 hpf, pri čemu svih 10 mastocitoma pripada mastocitomima visokog stepena maligniteta.

Takođe, je uočeno da osam mastocitoma sadrži više od 10% anaplastičnih mastocita sa jedrima promera oko 8-10 mikrona. Jedarna atipija je opšta karakteristika malignih tumora i u vezi je sa brzinom deobe ćelije. Kao posledica oštećenja genoma, često dolazi do nepravilnog reasortiranja hromozoma tokom mitoze. Usled povećanog broja hromozoma dolazi do pojave velikih jedara, jedara nepravilnog oblika ili jedara čija je membrana naborana. Takođe, ovakva jedra imaju višak gena koji nema nikakvu funkciju, tako da dolazi do formiranja kompaktnih masa heterohromatina. Što je prisutan veći broj bizarnih jedara, to je tumor agresivniji.

Posle deobe maligne ćelije, novostvorene ćelije ostaju nezrele jer je njihova diferencijacija prekinuta i one pokazuju znake anaplazije (Knežević *i sar.*, 2008). Većina anaplastičnih mastocita uz bizarna jedra pokazuje slabu granulaciju citoplazme (Meuten, 2008).

U cilju daljeg određivanja stepena maligniteta tumora potrebno je precizno proceniti koliko je ćelija u fazi deobe. Neki autori smatraju da mitotske figure koje se uočavaju na isečcima tumorskog tkiva bojenog HE u manjoj meri ukazuju na stvarni broj ćelija koje su u deobi, jer ćelijski ciklus kratko traje i da su bolji pokazatelji mitotske aktivnosti ćelija markeri



proliferacije, kao što su AgNOR, Ki-67 i PCNA (Ishikawa *i sar.*, 2006). Drugi smatraju da je stepen ekspresije Ki67/PCNA/AgNOR u ćelijama mastocitoma u direktnoj korelaciji sa stepenom maligniteta mastocitoma (Bergman *i sar.*, 2004). Pojedini autori navode da je količina AgNOR po jedru proporcionalna stepenu ćelijske proliferacije i vremenu deobe ćelije *in vitro*, odnosno rastu tumora *in vivo* (Ofner *i sar.*, 1992; Trere *i sar.*, 1996; Webster *i sar.*, 2007; Welle *i sar.*, 2008), te služe kao markeri brzine razvoja i napredovanja tumora i metaboličke aktivnosti tumora (Welle *i sar.*, 2008).

Ki-67 je nuklearni protein čija se ekspresija uočava u svim aktivnim fazama ćelijskog ciklusa, ali nije prisutan u fazi mirovanja ćelije (Scholzen *i sar.*, 2000). Stoga je odličan marker za određivanje ćelija u fazi proliferacije u neoplazmama ljudi i životinja (Abadie *i sar.*, 1999; Mukaratirwa, 2005a; Ozaki *i sar.*, 2007). Određivanje indeksa Ki-67 u tumorskom tkivu, primenom imunohistohemijskog bojenja, koristi se kao dijagnostički marker kod nekoliko tumora pasa: u diferencijalnoj dijagnostici tumora aorte i karotidnih tumora pasa, kutanog histiocitoma i transmisivnog veneričnog tumora, keratinizujućeg akantoma i dobro diferentovanog skvamoznog karcinoma kože, kao i za klasifikaciju epitelijalnih tumora pluća na adenoskvamozne i skvamozne karcinome (Mukaratirwa, 2011). Na 24 tkivna isečka mastocitoma koji su imunohistohemijski bojena na Ki-67, ekspresija ovog markera proliferacije uočena je kod 9 mastocitoma. Od devet Ki-67 pozitivnih mastocitoma, sedam je iz grupe mastocitoma visokog stepena maligniteta, što odgovara broju mastocitoma visokog stepena maligniteta kod kojih su uočene mitotske figure. Mastocitomi niskog stepena maligniteta koji su Ki-67 pozitivni pokazuju ekspresiju ovog markera proliferacije znatno slabijeg inteziteta nego mastocitomi visokog stepena. Prosečna vrednost broja Ki-67 pozitivnih ćelija u našem materijalu, prema dvostepenoj Kiupel-ovoj klasifikaciji, kod mastocitoma visokog stepena maligniteta iznosi  $22,19 \pm 4,75$ , dok je za mastocitome niskog stepena  $4,75 \pm 2,13$ . Naši nalazi su sa navedenim vrednostima u saglasnosti sa Patnaik-ovim sistemom klasifikacije, prema kome srednja vrednost Ki-67 indeksa iznosi za mastocitome I stepena 2,5, za mastocitome II stepena 6,0 i za mastocitome III stepena maligniteta 20,6. Takođe, jasno je uočljivo i postojanje statistički značajne razlike u ekspresiji Ki-67 kod mastocitoma višeg i mastocitoma nižeg stepena maligniteta. Ispitivanja ukazuju da je 8 puta veća stopa smrtnosti pasa sa mastocitomom u slučajevima kada je indeks Ki-67  $\geq 10,6$  (Vascellari *i sar.*, 2012). Drugi navode rezultate ispitivanja prema kojima postoji statistički

značajna razlika u ekspresiji Ki-67 kod mastocitoma I i II stepena maligniteta, kao i između mastocitoma II i III stepena maligniteta (Sakai *i sar.*, 2002).

PCNA se sintetiše od sredine G1 faze ćelijskog ciklusa i tokom S faze, ali se može detektovati tokom celog ćelijskog ciklusa zbog dugog vremena polu-života (Mukaratirwa, 2005a). Imunohistohemijskim bojenjem na PCNA označavaju se ćelije koje su u deobi ili kod kojih je došlo do reparacije DNK (Simoes *i sar.*, 1994). Iako postoje podaci u literaturi da je vrednost PCNA indeksa bitna za prognozu ponašanja MCT pasa (Simoes *i sar.*, 1994), rezultati našeg istraživanja pokazuju da su svi ispitani mastocitomi PCNA pozitivni, s tim da se kod mastocitoma visokog stepena maligniteta uočava veliki broj PCNA pozitivnih ćelija koje su intenzivno obojene, dok su PCNA pozitivne ćelije kod mastocitoma niskog stepena maligniteta malobrojnije i intenzitet prebojavanja je znatno slabiji. Pojedini autori smatraju da ne postoji značajna veza između vremena preživljavanja pasa sa mastocitomom i ekspresije PCNA u ćelijama tih mastocitoma (Scase *i sar.*, 2006). Sličnog mišljenja su i drugi autori, s tim što smatraju da iako ne postoji statistički značajna veza između PCNA ekspresije s jedne strane i stope smrtnosti i vremena preživljavanja obolelih pasa s druge strane, ipak postoji korelacija između PCNA i Ki-67 ekspresije (Strefezzi *i sar.*, 2010).

Interesantan nalaz u našem materijalu čini ekspresija PCNA u nekim uzorcima kože pasa iz kontrolne grupe koji nisu imali neoplastične lezije. Povećana PCNA aktivnost u ćelijama epidermisa ukazuje prema nekim istraživanjima, na aktiviranje keratinocita (Groneberg *i sar.*, 2005). Poznato je takođe, da kod različitih oblika dermatitisa dolazi do migracije mastocita u epidermis.

Negativnim prognostičkim faktorima smatraju se povećanje ekspresije AgNOR, povećanje ekspresije PCNA/Ki-67, povećana prokrvljenost i/ili mitotski indeks, a u poslednje vreme sve veći značaj se pridaje i povećanju ekspresije KIT proteina (CD117) (Bergman *i sar.*, 2010).

Novija istraživanja ukazuju na postojanje, kako normalnih (membranskih), tako i aberantnih citoplazmatskih (fokalnih i difuznih) KIT receptora na mastocitima pasa (Morini *i sar.*, 2004; Gil da Costa *i sar.*, 2007). Za razliku od ranijih istraživanja (Reguera *i sar.*, 2000) koja proučavaju odnos između intenziteta imunohistohemijskog bojenja koji ukazuje na stepen ekspresije KIT proteina i stepena maligniteta tumora, naša studija istražuje povezanost ekspresije aberantnih tipova KIT proteina i histopatološkog stepena mastocitoma. U ispitivanju koje smo

sproveli, uočava se da kod svih mastocitoma niskog stepena maligniteta postoji isključivo membranski tip ekspresije CD117 receptora, dok se kod mastocitoma visokog stepena maligniteta pored membranskog tipa ekspresije, javljaju i aberantni tipovi ekspresije KIT proteina. Iz naših rezultata se uočava da kod mastocitoma niskog stepena maligniteta nema aberantne ekspresije CD117 receptora. Naime, nijedan od aberantnih tipova ekspresije se ne izdvaja kao statistički značajan u odnosu na ostale aberantne tipove ekspresije KIT proteina. Međutim, jasna je povezanost aberantnih tipova ekspresije CD117 receptora i stepena maligniteta tumora. Pojedini autori navode da je KIT receptor transmembranski protein, i kao takav, imunoreaktivnost ovog proteina je lokalizovana na citoplazmatskoj membrani nepromenjenih mastocita (Kiupel *i sar.*, 2004b). S druge strane, neoplastični mastociti mastocitoma II i III stepena maligniteta (prema Patnaik-u) pokazuju ekspresiju KIT proteina kako na membrani, tako i u citoplazmi. Rezultati ispitivanja potvrđuju da što mastocitomi pasa imaju agresivnije biološko ponašanje, to imaju i veću ekspresiju KIT proteina u citoplazmi mastocita (Kiupel *i sar.*, 2004b). Takođe, isti autori smatraju da kutani mastocitomi pasa sa povećanom ekspresijom KIT proteina u citoplazmi neoplastičnih mastocita, imaju povećan rizik od lokalnog recidiva i kraće vreme preživljavanja. S druge strane, prema nekim autorima difuzni citoplazmatki tip ekspresije sreće kod klinički benignih tumora, odnosno kod tumora I stepena maligniteta prema Patnaik-u, a da je samo citoplazmatski perinuklearni tip ekspresije KIT proteina karakterističan za slabo diferentovane mastocitome III stepena maligniteta (Preziosi *i sar.*, 2004). Mastocitomi II stepena maligniteta pokazuju veći stepen heterogenosti u ekspresiji CD117 receptora, pa pored toga što se kod većine mastocitoma ovog stepena maligniteta uočava samo membranski tip ekspresije, kod pojedinih se mogu uočiti i difuzni citoplazmatski i mešoviti membransko/perinuklearni tip ekspresije KIT proteina (Preziosi *i sar.*, 2004). Neki autori naglašavaju da postoji jaka korelacija između citoplazmatske (aberantne) CD117 imunoekspresije i povećane ćelijske proliferacije, a samim tim i višeg stepena maligniteta, ali da nisu uočili značajne razlike između fokalne i difuzne citoplazmatske ekspresije CD117 receptora (Gil da Costa *i sar.*, 2007). Ovo sugerise da fokalna i difuzna citoplazmatska ekspresija KIT proteina možda odražavaju slične ćelijske promene. Poznato je da se citoplazmatska ekspresija CD117 receptora dovodi u vezu i sa nekrotičnim i ulceroznim promenama. Naime, citoplazmatska ekspresija CD117 receptora je u vezi sa povećanom proliferacijom mastocita, a pojava nekroza u mastocitomu može biti odraz povećane ćelijske proliferacije koju nije u

moгуćnosti da isprati odgovarajuća angiogeneza. S druge strane, korelacija između citoplazmatska ekspresije CD117 receptora i pojave epidermalnih ulceracija može biti posledica CD117 – posredovanog oslobađanja histamina i serotonina, što uzrokuje intenzivan svrab (Gil da Costa *i sar.*, 2007).

Mastociti različitih životinjskih vrsta sadrže serotonin, monoamin koji je sposoban da uzrokuje brojne složene radnje u organizmu, između ostalih i da utiče na rast tumora (Froberg *i sar.*, 2009). Za razliku od ranijih radova u kojima nije dokazan serotonin u mastocitima pasa (Parratt i West, 1957; Meier, 1959; Beaven *i sar.*, 1982; Fernandez *i sar.*, 2005), u ispitivanju izvršenom na isečcima nepromenjene kože i na 24 isečka mastocitoma sva tri stepena maligniteta, serotonin je dokazan i kod normalnih i kod neoplastičnih mastocita, i to kod 8/8 mastocitoma I stepena maligniteta, kod 7/8 mastocitoma II stepena maligniteta i kod 6/8 mastocitoma III stepena maligniteta (Froberg *i sar.*, 2009).

Za razliku od pasa, kod normalnih i hiperplastičnih mastocita mačaka nije dokazan serotonin (Mallett *i sar.*, 2012), što nije u skladu sa ranijim istraživanjima prema kojima je serotonin smatran glavnim biogenim aminom granula u mastocitima mačaka (Moore i Ogilvie, 2001).

Ukoliko je u mastocitima prisutna aberantna ekspresija KIT proteina, prognoza za oporavak pasa sa ovakvim mastocitomom je znatno lošija jer je smanjen period preživljavanja pacijenta, a vreme do remisije bolesti je skraćeno u odnosu na pacijente sa mastocitima u čijim mastocitima je prisutna samo membranska ekspresija KIT proteina (Webster *i sar.*, 2004; Webster *i sar.*, 2006).

Dokazano je da postoji veza između postojanja c-KIT mutacija i aberantne ekspresije CD117, iako mutacije nisu bile prisutne kod svih mastocitoma sa aberantnom ekspresijom KIT proteina (London *i sar.*, 1996; Morini *i sar.*, 2004; Webster *i sar.*, 2006). Pojedini autori su u svojim rezultatima dobili da sedam od devet mastocitoma sa c-KIT mutacijom ima aberantnu ekspresiju KIT proteina (Webster *i sar.*, 2006). Tačan mehanizam kojim povećana ekspresija KIT proteina izaziva malignu transformaciju mastocita je nepoznat (Kiupel *i sar.*, 2004b). Prema jednoj hipotezi, citoplazmatsku izoformu KIT proteina verovatno aktivira rastvorljivi faktor rasta matične ćelije (*Stem cell factor* – SCF, eng.) ili postojanje mutacije c-KIT protoonkogeno koja dovodi do inhibicije apoptoze, adhezije, migracije i proliferacije mastocita (Reguera *i sar.*, 2000). C-KIT protoonkogen kodira receptor tirozin kinazu KIT, te mutacije ovog gena mogu

dovesti do aktivacije KIT receptora u odsustvu liganda (Longley *i sar.*, 2001; Webster *i sar.*, 2006). Prisustvo mutacija c-KIT protoonkogeni se pre svega vezuje za jukstamembranski domen, i to prvenstveno za egzon 11, i dovodi se u vezu sa mastocitoma visokog stepena maligniteta (Zemke *i sar.*, 2002; Pryer *i sar.*, 2003; Webster *i sar.*, 2006; London *i sar.*, 2009; Kiupel *i sar.*, 2011). Kada su mastocitoma pasa u pitanju, mutacije c-KIT protoonkogeni u jukstamembranskom domenu se prvenstveno javljaju u vidu internih tandem duplikacija i delecija (Downing *i sar.*, 2002; Zemke *i sar.*, 2002).

a[im ispitivanjima ni kod jednog od 24 pregledana mastocitoma nisu detektovane mutacije na egzonu 11 jukstamembranskog domena. Odsustvo mutacija eventualno bi se moglo objasniti relativno malim brojem ispitanih mastocitoma. Naime, pojedini autori navode da se mutacije c-KIT protoonkogeni kod mastocitoma pasa sreću kod svega 15% uzoraka (Zemke *i sar.*, 2002; Webster *i sar.*, 2006), odnosno 16% mastocitoma (Webster *i sar.*, 2007). Sa druge strane, postoje podaci da se mutacije javljaju kod 50% mastocitoma (Downing *i sar.*, 2002), dok se kod drugih autora procenat učestalosti pojave mutacija c-KIT protoonkogeni kreće od 3 do 33% (Downing *i sar.*, 2002; Webster *i sar.*, 2006; Webster *i sar.*, 2007). Odsustvo mutacija na 11 egzonu jukstamembranskog domena zabeleženo je čak i kod pojedinih mastocitoma kod kojih je potvrđena autofosforilacija KIT proteina (Gleixner *i sar.*, 2007).

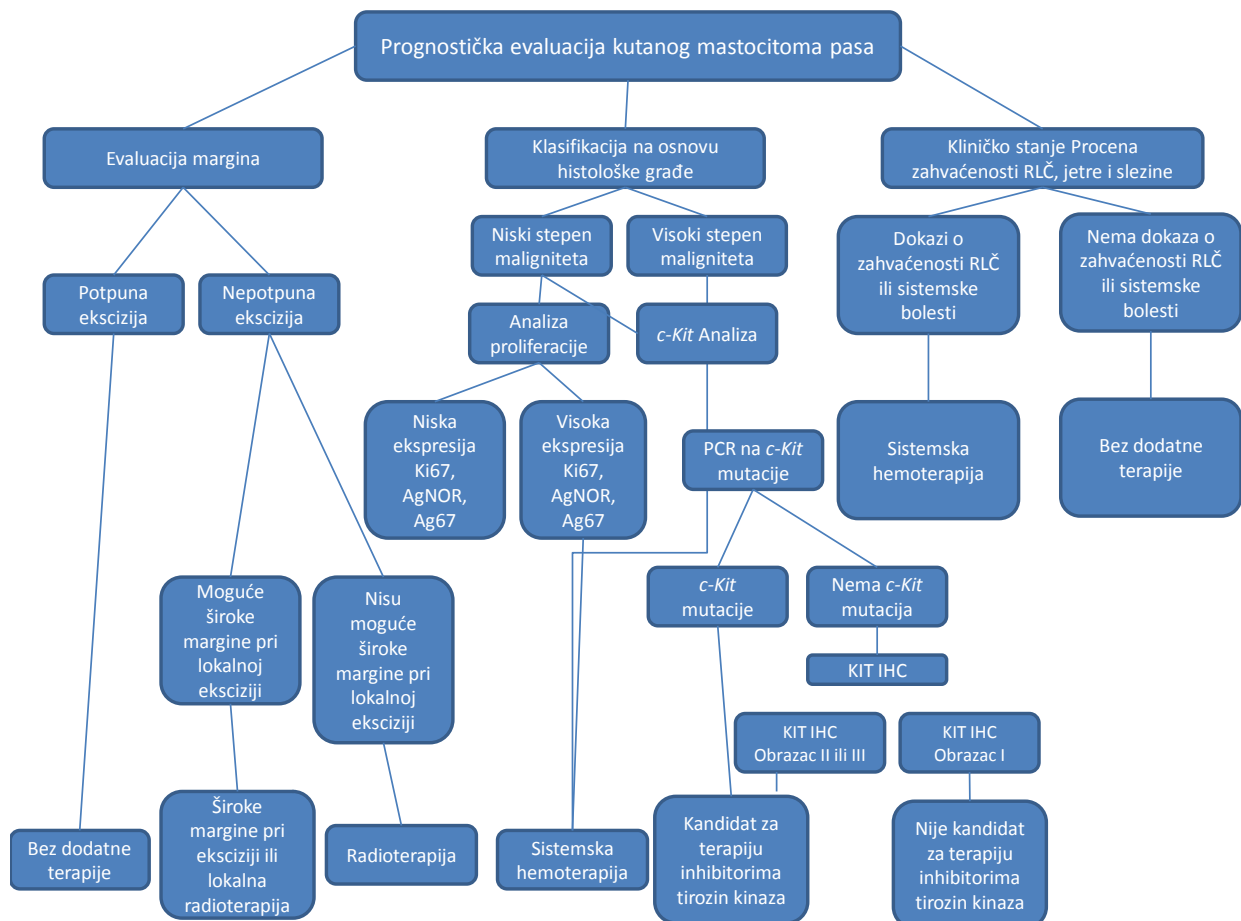
Prisustvo mutacija c-KIT protoonkogeni vezuje se za mastocitome II i III stepena maligniteta prema Patnaik-ovoj klasifikaciji mastocitoma (Zemke *i sar.*, 2002; Pryer *i sar.*, 2003; London *i sar.*, 2009; Thompson *i sar.*, 2010), u prilog čemu govore i rezultati koji ukazuju da postoji veza između prisustva ITD mutacija c-KIT protoonkogeni i povećanog indeksa proliferacije, merenog na osnovu imunohistohemijske ekspresije Ki-67 (Webster *i sar.*, 2007). Prisustvo ITD mutacija c-KIT protoonkogeni na egzonu 11 smanjuje vreme preživljavanja pasa sa mastocitomom (Webster *i sar.*, 2006a), dok kod mnogih drugih tipova mutacija c-KIT protoonkogeni koje dovode do ligand nezavisne aktivacije KIT receptora, nije uočena ovakva veza (Takeuchi *i sar.*, 2013).

Mutacije c-KIT protoonkogeni uzrokuju ligand nezavisnu fosforilaciju, a time i aktivaciju CD117 receptora u neoplazmatskim ćelijama tumora kod ljudi (Longley *i sar.*, 2001; Gil da Costa *i sar.*, 2007). Ovakve mutacije su verovatno uzrok povećane proliferacije ćelija mastocitoma i dovode do ekspresije CD117 i u citoplazmi mastocita. Postoji mišljenje da mutacije koje izazivaju ligand nezavisnu fosforilaciju CD117 receptora, mogu takođe da utiču i

na intracelularni transport CD117 i time dovedu do akumulacije ovog proteina u ćelijskim organelama, kao što su Goldžijev aparat ili endoplazmatski retikulum (Gil da Costa *i sar.*, 2007). Određivanje učestalosti i tipa ekspresije KIT proteina, kao i skrining na c-KIT mutacije su značajni i sa aspekta određivanja terapije (Kiupel *i sar.*, 2011).

Svi navedeni prognostički parametri značajno utiču na izbor terapije. Poslednjih nekoliko godina, protein kinaze se smatraju važnim „metama“ u terapiji lečenja mastocitoma (London, 2004; Takeuchi *i sar.*, 2012). Novija ispitivanja ukazuju da je u terapiji mastocitoma visokog stepena maligniteta potrebno koristiti i inhibitore tirozin kinaza receptora (Liao *i sar.*, 2002; Pryer *i sar.*, 2003; Gleixner *i sar.*, 2007; Kobie *i sar.*, 2007; Lin *i sar.*, 2010; Takeuchi *i sar.*, 2010; Gleixner *i sar.*, 2011). U veterinarskoj medicini najviše proučavani inhibitori tirozin kinaza receptora su *toceranib phosphate* i *masitinib* (Waltman, 2012). *Toceranib phosphate* dovodi do reakcije i kod mastocitoma sa c-KIT aktivirajućom mutacijom, ali i kod mastocitoma bez mutacija, s tim, da je stopa odgovora veća kod tumora sa c-KIT mutacijom nego u onima bez nje (London *i sar.*, 2009; Waltman, 2012). U novije vreme se ispituju inhibitori KIT receptora, kao što su *axitinib*, *imatinib*, *masitinib* i *vatalanib* (Takeuchi *i sar.*, 2012).

Za tumore različitog stepena klasifikacije, primenjivaće se različite metode lečenja, pa su u tu svrhu izrađeni posebni dijagnostički paneli (Slika 28) (Welle *i sar.*, 2008; Waltman, 2012).



**Slika 28.** Dijagnostički paneli za određivanje terapije kod kutanog mastocitoma pasa (Waltman, 2012)

Sa aspekta određivanja adekvatne terapije kod pasa obolelih od mastocitoma veoma je bitno odrediti stepen maligniteta mastocitoma, što podrazumeva odabir odgovarajuće metode i parametara klasifikacije mastocitoma. Pojedini autori smatraju da je Kiupel-ova klasifikacija mastocitoma superiornija, kada je u pitanju prognostička ocena, u odnosu na Patnaik-ovu klasifikaciju (Takeuchi *i sar.*, 2013). Međutim, postavlja se niz pitanja vezanih za adekvatnost nove, Kiupel-ove klasifikacije. Potrebno je ispitati da li dvostepeni sistem klasifikacije tačno identifikuje agresivne mastocitome sa niskim stepenom mitotskog indeksa, kao i da li postoje varijacije usled subjektivnosti ispitivača kod određivanja pojedinih parametara bitnih za klasifikaciju, kao što su prisustvo kariomegalije i bizarnih jedara. Sa kliničkog aspekta, potrebno je utvrditi koja klasifikacija mastocitoma zajedno sa dodatnim testiranjima (npr. određivanje ekspresije KIT proteina) omogućava najbolji izbor terapije. Dok se ne obave dalje studije

poređenja Patnaik-ovog i dvostepenog sistema klasifikacije mastocitoma, najprikladnije je za klasifikaciju mastocitoma koristiti kombinovano oba sistema ocenjivanja (Stern, 2012).



## 7. ZAKLJUČAK

1. Ispitanoj grupi od 24 psa sa kutanim mastocitomom pripada 29,17% ženki i 70,83% mužjaka. Razlika u polnoj distribuciji mastocitoma statistički je značajna ( $p < 0,01$ ). Starost 24 psa sa kutanim mastocitomom iznosi 3 do 11 godina. Ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ) između starosti pasa i pojave mastocitoma. Statistički je značajna razlika ( $p < 0,01$ ) između ispitanih rasa pasa i pojave mastocitoma. Ne postoji statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ) za topografsku distribuciju mastocitoma.
2. Mikroskopskom analizom 24 mastocitoma 41,67% je klasifikovano u mastocitome niskog stepena maligniteta (gradus I), a 58,33% u mastocitome visokog stepena maligniteta (gradus II). Prisustvo bizarnih jedara i multinuklearnih ćelija na 10 polja velikog uvećanja (hpf) su statistički značajni ( $p < 0,01$ ) morfološki kriterijumi za klasifikaciju mastocitoma.
3. Intenzivna degranulacija mastocita uočena je kod 50% mastocitoma, i to kod 10% mastocitoma niskog stepena maligniteta i 78,57% mastocitoma visokog stepena maligniteta. Intenzivna degranulacija je karakteristika mastocitoma visokog stepena maligniteta.
4. Citoplazmatska ekspresija tirozin kinaza receptora (CD117), uočena je kod 64,28% mastocitoma visokog stepena maligniteta. Kod svih mastocitoma niskog stepena maligniteta i kod 35,72% mastocitoma visokog stepena maligniteta prisutan je isključivo membranski tip CD117 ekspresije.

5. Ekspresija antigena ćelijske proliferacije (Ki-67 i PCNA) uočava se kod mastocitoma visokog i niskog stepena maligniteta. Prosečan broj Ki-67 pozitivnih ćelija kod mastocitoma visokog stepena maligniteta statistički je značajno veći ( $p < 0,01$ ) nego kod mastocitoma niskog stepena maligniteta. Razlika između prosečnog broja PCNA pozitivnih ćelija kod mastocitoma visokog i niskog stepena maligniteta nije statistički značajna ( $p > 0,05$ ). Ekspresija receptorskog molekula CD45RA uočava se kod mastocitoma visokog i niskog stepena maligniteta.
  
6. Primenom PCR reakcije ni u jednom od 24 uzorka mastocitoma nije detektovano prisustvo c-KIT mutacije (prisustvo internih tandem duplikacija na egzonu 11). Kod svih ispitanih mastocitoma je detektovan normalan c-KIT protoonkogen (vizuelizovana je jedna traka veličine ~150 bp). Mutacija c-KIT protoonkogenena nije neophodna za nastanak mastocitoma.

## 8. POPIS LITERATURE

1. Abadie J.J., Amardeilh M.A., Delverdier M.E., 1999, *Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and ki67 in mast cell tumors from dogs*, J Am Vet Med Assoc, 215(11):1629-34.
2. Aleksić-Kovačević S, Kukulj V, Marinković D, Knežević M, 2005, *Retrospective study of canine epithelial and melanocytic tumors*, Acta Veterinaria, 55(4):319-26.
3. Aleksić-Kovacević S, Kukulj V, Jelesijević T, Jovanović M, 2005, *Retrospective analysis of canine mesenchymal tumors of skin and soft tissues*, Acta Veterinaria, 55(5-6):521-29.
4. Allison N, Fritz DL, 2001, *Cutaneous mast cell tumor in a kid goat*, Vet Rec, 149(18):560-61.
5. Al-Dissi AN, Haines DM, Singh B, Kidney BA, 2011, *Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas*, Can Vet J, 51(10):1109–14.
6. Al-Sarraf R, Maudlin GN, Patnaik AK, Meleo KA, 1996, *A prospective study of radiation therapy for the treatment of grade 2 mast cell tumours in 32 dogs*, Journal of Veterinary Internal Medicine, 10(6):376-78.
7. Amorim RL, Pinczowski P, Neto RT, Rahal SC, 2010, *Immunohistochemical evaluation of prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor in canine cutaneous mast cell tumours*, Veterinary Comparative Oncology, 8(1):23-7.
8. Backer MV, Hamby CV, Backer JM, 2009, *Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling in angiogenic tumor vasculature*, Adv Genet, 67:1-27.
9. Baker-Gabb M, Hunt GB, France MP, 2003, *Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behaviour and response to surgery*, Australian Veterinary Journal, 81(12):732-38.

10. Bar-Sela G, Kuten A, Ben-Eliezer S, Gov-Ari E, Ben-Izhak, 2003, *Expression of HER2 and C-KIT in nasopharyngeal carcinoma: implications for a new therapeutic approach*, Mod Pathol, 16(10):1035-40.
11. Beaven MA, Soll AH, Lewin KJ, 1982, *Histamine synthesis by intact mast cells from canine fundic mucosa and liver*, Gastroenterology, 82(2):254-62.
12. Becker AB, Chung KF, McDonald DM *et al.*, 1985, *Mast cell heterogeneity in dog skin*, Anat Rec, 213(4):477-80, 530-31.
13. Bergman PJ, Craft DM, Newman SJ, Baer K, Camps-Palau MA, McKnight JA, Leibman NF, Brenn S, Finora K, Hohenhaus AE, Bartick T, Patnaik AK, Scase T, 2004, *Correlation of histologic grading of canine mast cell tumors with Ki67/PCNA/AgNOR/c-KIT scores: 38 cases (2002–2003)*, Veterinary and Comparative Oncology, 2(2):98.
14. Bergman P, 2010, *Mast cell tumors: Margins, markers and prognostic factors*, CVC in Kansas City proceedings.
15. Biesterfeld S, Reitmaier M, 2001, *Re-evaluation of prognostic mitotic figure counting in breast cancer: results of a prospective clinical follow-up study*, Anticancer Res, 21(1B):589-94.
16. Bloemen K, Verstraelen S, Van Den Heuvel R, Witters H, Nelissen I, Schoeters G, 2007, *The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung*, Immunol. Lett., 113(1):6-18.
17. Bookbinder PF, Butt MT, Harvey HJ, 1992, *Determination of the number of mast cells in lymph node, bone marrow, and buffy coat cytologic specimens from dogs*. J Am Vet Med Assoc., 200(11):1648-50.
18. Bostock DE, 1973, *The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs*, Journal of Small Animal Practice, 14(1):27-40.
19. Bostock DE, Crocker J, Harris K, Smith P, 1989, *Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours*, British Journal of Cancer, 59(6):915–18.
20. Boyce JA, 2007, *Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation*, Immunol Rev, 217:168-85.

21. Božić T, 2007, *Patološka fiziologija domaćih životinja*, Mladost biro d.o.o., Beograd.
22. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H, 1987, *Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNK polymerase-delta*, *Nature*, 326(6112):515-17.
23. Camps-Palau MA, Leibmann NF, Elmslie R *i sar.*, 2007, *Treatment of canine mast cell tumours with vinblastine, cyclophosphamide and prednisone: 35 cases (1997–2004)*, *Veterinary and Comparative Oncology*, 5(3):156-67.
24. Carmeliet P, Jain RK, 2011, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*, *Nature*, 473(7347):298-307.
25. Caughey GH, 2007, *Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense*, *Immunol Rev*, 217:141-54.
26. Chan PM, Ilangumaran S, La Rose J, Chakrabarty A, Rottapel R, 2003, *Autoinhibition of the KIT receptor tyrosine kinase by cystolic juxtamembrane region*, *Mol Cel Biol* 23(9):3067-78.
27. Cheville NF, 2006, *Introduction to Veterinary Pathology*, Blackwell Publishing, 3rd edition, 170.
28. Chichlowski M, Westwood GS, Abraham SN, Hale LP, 2010, *Role of mast cells in inflammatory bowel disease and inflammation-associated colorectal neoplasia in IL-10-deficient mice*, *PLoS ONE*, 5, 8.
29. De Mora F, Puigdemont A, Torres R, 2006, *The role of mast cells in atopy: what can we learn from canine models? A thorough review of the biology of mast cells in canine and human systems*, *Br. J. Dermatol.*, 155(6):1109-23.
30. Derenzini M, 2000, *The AgNORs. Micron*, 31(2):117-20.
31. Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL, 2003, *Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide*, *J Immunol* 170(5):2274-8.
32. Dobson i Cohen, 2004, *Treatment of canine mast cell tumours with prednisolone and radiotherapy*, *Veterinary and Comparative Oncology*, 2(3):132-41.
33. Dobson JM, Scase TJ, 2007, *Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs*, *J Small Anim Pract*, 48(8):424-31.
34. Downing S, Chien MB, Kass PH, Moore PE, London CA, 2002, *Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c-KIT in mast cell tumors of dogs*, *American Journal of Veterinary Research*, 63(12):1718-23.

35. Duncan R, Prasse W, 1979, *Cytology of canine cutaneous round cell tumours*, Vet. Pathol., 16(6):673-79.
36. Dunphy CH, 2005, *Evaluation of mast cells in myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes*, Arch Pathol Lab Med, 129(2):219-22.
37. El-Agamy DS, 2012, *Targeting c-KIT in the therapy of mast cell disorders: current update*, European Journal of Pharmacology, 690(1-3):1-3.
38. Ellis LM, Hicklin DJ, 2008, *VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity*, Nat Rev Cancer, 8(8):579-91.
39. Elston LB, Sueiro FA, Cavalcanti JN, Metze K, 2009, *The importance of the mitotic index as a prognostic factor for survival of canine cutaneous mast cell tumors: a validation study*, Vet Pathol, 46(2):362-64
40. Elting H i Ungemach FR, 1982, *Sexual hormone receptors in canine mast cell tumour cytosol*, Journal of Comparative Pathology, 92(4):629-30.
41. Erdei A, Andrasfalvy M, Peterfy H, Toth G, Pecht I, 2004, *Regulation of mast cell activation by complement-derived peptides*, Immunol Lett, 92(1-2):39-42.
42. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, 2006, *Schalm's Veterinary Hematology 5th edition*, Blackwell Publishing, 314–18.
43. Fernandez NJ, West KH, Jackson ML, Kidnet BA, 2005, *Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors*. Veterinary Pathology, 42(4):437-45.
44. Folkman J, 1971, *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*, N Engl J Med, 285(21):1182-86.
45. Frimberger AE, Moore AS, Larue SM, Gliatto JM i Bengtson AE, 1997, *Radiotherapy of incompletely resected, moderately differentiated mast cell tumours in the dog: 37 cases (1989 – 1993)*, Journal of the American Hospital Association, 33(4):320-4.
46. Freeman RS, *i sar.*, 2004, *NGF deprivation-induced gene expression: after ten years, where do we stand?*, Progress in Brain Research, 146:111-26.
47. Froberg GK, Lindberg R, Ritter M, Nordlind K, 2009, *Expression of serotonin and its 5-HT1A receptor in canine cutaneous mast cell tumours*, Journal of Comparative Pathology, 141(2-3):89-97.

48. Fulcher RP, Ludwig LL, Bergman PJ, Newman SJ, Simpson AM, Patnaik AK, 2006, *Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs*, Journal of the American Veterinary Medical Association, 228(2):210-5.
49. Fulciniti F, Di Mattia D, Curcio MP, Bove P, Rota AM, Botti G, 2007, *Canine mastocytoma: Report of 8 cases diagnosed by fine needle cytology and clinicopathologic correlations*, Acta Cytol, 51(4):616-20.
50. Galli SJ, Tsai M, Wershil PK, Tam SY, Costa JJ, 1995, *Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the c-KIT receptor*, Int. Arch. Allergy Immunol., 107(1-3):51-3.
51. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA, 2011, *Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils*, Nat Immunol 12(11):1035-44.
52. Gil da Costa RM, Matos E, Rema A, Lopes C, Pires MA, Gartner F, 2007, *CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers*, BMC Veterinary Research, 21(3):19.
53. Ginn PE, Mansell JE, Rakich PM, 2007, *Mast cell tumours*. In: *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 5th edn., Philadelphia, PA, Saunders Elsevier, 771–73.
54. Gleixner KV, Rebuzzi L, Mayerhofer M, Gruze A, Hadzijušufovic E, *i sar.*, 2007, *Synergistic antiproliferative effects of KIT tyrosine kinase inhibitors on neoplastic canine mast cells*, Exp Hematol, 35(10):1510-21.
55. Gleixner KV, Mayerhofer M, Cerny-Reiterer S, Hörmann G, Rix U, Bennett KL, Hadzijušufovic E, Meyer RA, Pickl WF, Gotlib J, Horny HP, Reiter A, Mitterbauer-Hohendanner G, Superti-Furga G, Valent P, 2011, *KIT-D816V-independent oncogenic signaling in neoplastic cells in systemic mastocytosis: role of Lyn and Btk activation and disruption by dasatinib and bosutinib*, Blood, 118(7):1885-98.
56. Goldschmidt MH i Hendrick MJ, 2002, *Tumour of the skin and soft tissues*. In *D. J.Meuten, Tumours in domestic animals*, Iowa State Press, 45-118.
57. Govier SM, 2003, *Principles of treatment for mast cell tumors*, Clinical Techniques in Small Animal Practice, 18(2):103-6.

58. Grabarević Ž, 2002, *Biologija i morfologija tumora*, In: Grabarević Ž (Ed) Veterinarska onkologija, DSK-FALCO, Zagreb.
59. Groneberg DA, Bester C, Grützkau A, Serowka F, Fischer A, Henz BM, Welker P., 2005, *Mast cells and vasculature in atopic dermatitis--potential stimulus of neoangiogenesis*, *Allergy*, 60, 1, 90-97.
60. Gross TL, Ihrke P, Walder EJ, Affolter VK., 2005, *Mast cell tumors. Skin Diseases of the Dog and Cat Clinical and Histopathologic Diagnosis*, 2nd edn. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 853–65.
61. Hahn KA, 2002, *Veterinary oncology*, 4th edn., Butterworth-Heinemann, 21-23.
62. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, Devauchelle P, Leblanc A, Legendre A, Powers B, Leventhal PS, Kinet JP, Palmerini F, Dubreuil P, Moussy A, Hermine O, 2008, *Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors*, *J Vet Intern Med*, 22 1301-09.
63. Hahn KA, Legendre AM, Shaw NG, Phillips B, Ogilvie GK, Prescott DM, Atwater SW, Carreras JK, Lana SE, Ladue T, Rusk A, Kinet JP, Dubreuil P, Moussy A, Hermine O, 2010, *Evaluation of 12- and 24-month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors*, *Am J Vet Res*, 71, 1354-61.
64. Harizi H, Corcuff JB i Gualde N, 2008, *Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology*, *Trends in Molecular Medicine*, 14, 461-69
65. Harvima IT i sar., 2008, *Is there a role for mast cells in psoriasis?* *Archives of Dermatological Research*, 300(9), 461 – 78.
66. Hauswirth AW, Florian S, Scherthaner GH, Krauth MT, Sonneck K, Sperr WR i sar., 2005, *Expression of cell surface antigens on mast cells: mast cell phenotyping*, *Methods Mol Biol*, 315, 77–90.
67. Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore FM, Vos JH, Walder EJ, 1998, *Mast cell tumors. In: World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, Histological Classification of Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues of Domestic Animals*, 2nd series, ed. Schulman FY, 28–29. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC.
68. Hottendorf GH, Nielsen SW, 1967, *Pathologic survey of 300 extirpated canine mastocytomas*, *Zentralblatt Veterinarmedizin A*, 14, 272–81.



69. Hundley TR *i sar.*, 2004, *Kit and Fc1RI mediate unique and convergent signals for release of inflammatory mediators from human mast cells*, *Blood*, 104, 2403–17.
70. Irani AM, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB., 1989, *Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies*, *J Histochem Cytochem.*, 37, 1509–15.
71. Ishikawa K, Sakai H, Hosoi M, Yanai T, Masegi T, 2006, *Evaluation of Cell Proliferation in Canine Tumors by the Bromodeoxyuridine Labeling Method, Immunostaining of Ki-67 Antigen and Proliferating Cell Nuclear Antigen*, *J Toxicol Pathol*, 19, 123–27.
72. Jamur MC i Oliver C, 2011, *Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors*. *Front Biosci*, 3, 1390-406.
73. Jelesijević T, Jovanović M, Knežević M and Aleksić-Kovačević S, 2003, Quantitative and qualitative analysis of AgNOR in benign and malignant canine mammary gland tumors, *Acta Veterinaria*, 53, 5-6, 353-60.
74. Jensen BM, Akin C, Gilfillan AM, 2008, *Pharmacological targeting of the KIT growth factor receptor: a therapeutic consideration for mast cell disorders*, *Br J Pharmacol*, 154, 1572-82.
75. Johnstone AC, 1972, *Two cases of hepatic mastocytoma in sheep*, *Vet Pathol* 9, 159-63
76. Jones CL, Grahn RA, Chien MB, Lyons LA, London CA, 2004, *Detection of c-KIT mutations in canine mast cell tumors using fluorescent polyacrylamide gel electrophoresis*, *J Vet Diagn Invest*, 16, 95–100.
77. Jovanović M, Aleksić-Kovačević S, Knežević M, 2012, *Specijalna veterinarska patologija*, Makarije d.o.o., 129, 404.
78. Joyce JA, 2005, *Therapeutic targeting of the tumor microenvironment*, *Cancer Cell*, 7, 513-20.
79. Jubb, Kennedy, Palmer, 2007, *Pathology of Domestic Animals*, Saunders Elsevier, 5th edition, 771-73.
80. Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, *i sar.*, 1995, *Constitutively activating mutations of c-KIT receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines*, *Blood*, 85, 790–98.

81. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, DeLay J, Detrisac CJ, Gamble D, Ginn PE, Goldschmidt MH, Hendrick MJ *I sar.*, 2004a, *Microscopic grading of canine cutaneous mast cell tumors: a multiinstitutional review*, Vet Pathol 41, 576.
82. Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB, Miller R i Yuzbasiyan-Gurkan V., 2004b, *The use of kit and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors*, Vet Pathol, 41, 371–77.
83. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, DeLay J, Detrisac CJ *i sar.*, 2011, *Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior*, Veterinary Pathology , 48, 147-55.
84. Klopfleisch R, Meyer A, Schlieben P, Weise C, Bondzio A *i sar.*, 2012, *Transcriptome and proteome analysis of tyrosine kinase inhibitor treated canine mast cell tumour cells identifies potentially kit signaling-dependent genes*, BMC Veterinary Research, 8, 96.
85. Knežević M, Jovanović M, 2008, *Opšta patologija za studente veterinarske medicine*, Makarije, Beograd.
86. Kosjerina Z, 1999, *Građa i funkcije mastocita i bazofilnih granulocita*, Pneumon, 37, 69-71.
87. Ladue T, Price GS, Dodge R, Page RL i Thrall DE, 1998, *Radiation therapy for incompletely resected canine mast cell tumours*, Veterinary Radiology & Ultrasound, 39, 57-62.
88. Lamm CG, Stern AW, Smith AJ, Cooper EJ, Ullom SW, Campbell GA, 2009, *Disseminated cutaneous mast cell tumors with epitheliotropism and systemic mastocytosis in a domestic cat*, J Vet Diagn Invest, 21, 710-15
89. Larsen AE i Grier RL, 1989, *Evaluation of canine mast cell tumors for presence of estrogen receptors*, American Journal of Veterinary Research, 50, 1779-80.
90. LaRue SM, Gillette EL, 2007, *Radiation therapy*, In: Withrow SJ, Vail DM, eds. *Small Animal Clinical Oncology*, 4th edn. Philadelphia, PA, Saunders, 193–210.
91. Leadbeater JC, Gutierrez-Nibeyro SD, Brown JA, 2010, *Mastocytoma in the common carpal sheath of the digital flexor tendons of a horse*, Aust Vet J, 88, 20-24.
92. Letard S, Yang Y, Hanssens K, Palmerini F, Leventhal PS, Guery S, Moussy A, Kinet JP, Hermine O, Dubreuil P, 2008, *Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors*, Mol. Cancer Res., 6, 1137–45.

93. Li L, Yao Z, 2004, *Mast cell and immune inhibitory receptors*, Cell Mol. Immunol., 1, 408–15
94. Liao AT, Chien MB, Shenoy N, Mendel DB, McMahon G, Cherrington JM, London CA, 2002, *Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors*, Blood, 100, 585-93.
95. Lin TY, Fenger J, Murahari S, Bear MD, Kulp SK, Wang D, Chen CS, Kisseberth WC, London CA, 2010, *AR-42, a novel HDAC inhibitor, exhibits biologic activity against malignant mast cell lines via down-regulation of constitutively activated KIT*, Blood, 115, 4217-25.
96. London CA, Kisseberth WC, Galli SJ, Geissler EN, Helfand SC, 1996, *Expression of stem cell factor receptor (c-KIT) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours*, Journal of Comparative Pathology, 115: 399–414.
97. London CA, Galli SJ, Yuuki T, Hu ZQ, Helfand SC, Geissler EN, 1999, *Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-KIT*, Exp Hematol, 27, 689–97.
98. London CA i Seguin B, 2003, *Mast cell tumors in the dog*, Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice, 33, 473-89.
99. London C, Hannah AL, Zadovoskaya R, Chien MB, Kollias-Baker C, Rosenberg M, Downing S, Post G, Boucher J, Shenoy N, Mendel DB i Cherrington JM, 2003a, *Phase I dose escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies*, Clinical Cancer Research, 9, 2755-68.
100. London C, 2004, *Kinase inhibitors in cancer therapy*, Veterinary and Comparative Oncology, 2, 177-93.
101. London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, i sar., 2009, *Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision*, Clin Cancer Res, 15, 3856–65.
102. Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y: *Classes of c-KIT activating mutations*, 2001, *Proposed mechanisms of action and implications in disease classification and therapy*, Leuk Res, 25, 571-76.

103. Ma Y, Longley BJ, Wang X, Blount JL, Langley K, Caughey GH, 1999, *Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms*, J Invest Dermatol 112,165–70.
104. Madewell BR, 2001, *Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications*, J Vet Intern Med, 15:334–40
105. Maga G, Hubscher U, 2003, *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partner*,. J Cell Sci 116:3051–60.
106. Maiolino P, Restucci B, Papparella S, De Vico G, 2002, *Nuclear morphometry in squamous cell carcinomas of canine skin*, Journal of Comparative Pathology, 127, 114–17.
107. Malaviya R, Ross EA, MacGregor JI, Ikeda T, Little JR, *i sar.*, 1994, *Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria*, J Immunol 152, 1907–14.
108. Mallett CL, Northrup NC, Saba CF, Rodriguez CO, Rassnick KM, Gieger TL, Childress MO, Howerth EW, 2012, *Immunohistochemical Characterization of Feline Mast Cell Tumors*, Veterinary Pathology, 50, 1, 106-09.
109. Marshall JS, 2004, *Mast-cell responses to pathogens*, Nat. Rev. Immunol. 4, 787–99.
110. Masson K, Ronnstrand L, 2009, *Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-KIT and Flt3*, Cellular Signalling, 21, 1717-26.
111. Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Weller K, Chatterjea D, Clouthier DE, Yanagisawa MM, Tsai M, Galli SJ, 2004, *Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity*, Nature, 432, 512–16.
112. McGavin MD, William WC, Zachary FJ, 2001, *Thomson's Special Veterinary Pathology*, Mosby, 3rd edition, 354-55.
113. Meininger CJ, Yano H, Rottapel R, Bernstein A, Zsebo KM, Zetter BR, 1992, *The c-KIT receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant*, Blood, 79, 958–63.
114. Meier H, 1959, *Serotonin (5-hydroxytryptamine) content of canine mastocytoma*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 100, 815-17.
115. Mekori YA, Oh CK, Metcalfe DD, 1995, *The role of c-KIT and its ligand, stem cell factor, in mast cell apoptosis*, Int Arch Allergy Immunol, 107, 136–38.
116. Metz M, Siebenhaar F, Maurer M, 2008, *Mast cell functions in the innate skin immune system*. Immunobiology, 213, 251-60.

117. Meuten DJ, 2008, *Tumors in Domestic Animals*, John Wiley & Sons, 4th ed..
118. Migaki G, Langheinrich KA, 1970, *Mastocytoma in a pig*, *Pathol Vet*, 7, 353-55.
119. Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, Citi S, Pisani G, Lorenzi D, Poli A, 2006, *The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops*, *Res Vet Sci*, 81, 350-57.
120. Misdorp W, 2004, *Mast cells and canine mast cell tumours: a review*, *Veterinary Quarterly*, 26, 156 – 69.
121. Moore AS, Ogilvie GK, 2001 *Splenic, hepatic, and pancreatic tumors*, In: Ogilvie GK, Moore AS, eds. *Feline Oncology: A Comprehensive Guide to Compassionate Care*, Trenton, NJ: Veterinary Learning Systems, 298.
122. Morini M, Bettini G, Preziosi R, Mandrioli L, 2004, *C-KIT gene product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections*, *J Histochem Cytochem*, 52, 705-08.
123. Morris J, Dobson J, 2001, *Small Animal Oncology*, Blackwell Science, 59-62.
124. Mukaratirwa S, Chipunza J, Chitanga S, Chimonyo M, Bhebhe E, 2005, *Canine cutaneous neoplasms: prevalence and influence of age, sex and site on the presence and potential malignancy of cutaneous neoplasms in dogs from Zimbabwe*, *Journal of the South African Veterinary Association*, 76, 59–62.
125. Mukaratirwa S, 2005a, *Prognostic and predictive markers in canine tumours. rationale and relevance*, *A Review of Veterinary Quarterly*, 27, 52–64.
126. Mullins MN, Dernell WS, Withrow SJ, Ehrhart EJ, Thamm DH, Lana SE, 2006, *Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004)*, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228, 91–95.
127. Murphy S, Sparkes AH, Smith KC, Blunden AS i Brearley MJ, 2004, *Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and effi cacy of surgical resection*, *Veterinary Record*, 154, 743-46.

128. Nakano A, Harada T, Morikawa S, Kato Y, 1990, *Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines*, Acta Pathol Jpn., 40, 2, 107-15.
129. Navega PR, 2011, *Mastocitomas em canídeos: estudo retrospectivo*, Universidade técnica de Lisboa.
130. Newman SJ, Mrkonjich L, Walker KK, Rohrbach BW, 2007, *Canine Subcutaneous Mast Cell Tumour: Diagnosis and Prognosis*, Journal of Comparative Pathology, 136, 231-39.
131. Nilsson G *i sar.*, 1994, *Stem cell factor is a chemotactic factor for human mast cells*, The Journal of Immunology, 153, 8, 3717-23.
132. Northrup NC, Harmon BG, Gieger TL, Brown CA, Carmichael KP, Garcia A, Latimer KS, Munday JS, Rakich PM, Richey LJ, Stedman NL, Cheng AL i Howerth EW, 2005, *Variation among pathologists in histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors*, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 17, 245-48.
133. Noviana D, Mamba K, Makimura S, Horii Y, 2004, *Distribution, histochemical and enzyme histochemical characterization of mast cells in dogs*, J Mol Histol, 35, 123-32.
134. O'Connell K, Thomson M, 2011, *Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases*, Veterinary and Comparative Oncology, 11, 1, 51-62.
135. Ofner D, Hittmair A, Marth C *i sar.*, 1992, *Relationship between quantity of silver stained nucleolar organizer regions associated proteins (Ag-NORs) and population doubling time in ten breast cancer cell lines*, Pathology, Research and Practice, 188, 742-46.
136. Oliveira FN, Elliott JW, Lewis BC, Mathews GG, Brown RM, Treadway CM, Langohr IM, 2013, *Cutaneous Mast Cell Tumor With Epitheliotropism in 3 Dogs*, Veterinary Pathology, 50(2):234-37.
137. Ozaki K, Yamagami T, Nomura K, Narama I, 2007, *Prognostic significance of surgical margin, Ki-67 and cyclin D1 protein expression in grade II canine cutaneous mast cell tumor*, J Vet Med Sci, 69, 1117-21
138. Palyada KS, Scott DW, Schlafer DH, Czajkowski M, 2008, *Diffuse cutaneous mastocytosis in a newborn calf*, Vet Dermatol, 19, 184-86

139. Patnaik AK, Ehler WJ i MacEwen EG, 1984, *Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs*, *Veterinary Pathology*, 21, 469-74
140. Parratt JR, West GB, 1957, *5-Hydroxytryptamine and tissue mast cells*. *Journal of Physiology*, 137, 169-178
141. Payne V i Kam PC, 2004, *Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance*, *Anaesthesia*, 59, 695–703
142. Pohlman ML, *Basophils, Mast Cells, and Their Disorders*, In: Schalm's *Veterinary Hematology*, 2010, Wiley-Blackwell, New York, 6th edition, 290-97
143. Poirier VJ, Adams WM, Forrest LJ, Green EM, Dubielzig RR, Vail DM., 2006, *Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumors*. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 42, 430–34
144. Preziosi R, Sarli G, Paltrinieri M, 2007, *Multivariate survival analysis of histologic parameters and clinical presentation in canine cutaneous mast cell tumours*, *Vet Res Commun*, 31, 287–96
145. Preziosi R, Morini M, Sarli G, 2004, *Expression of the kit protein (CD117) in primary cutaneous cell tumors of the dog*, *J Vet Diagn Invest*, 16:554–561
146. Pryer NK, Lee LB, Zadovaskaya R, Yu X, Sukbuntherng J, Cherrington JM, London CA, 2003, *Proof of target for sul1654: inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors*, *Clin Cancer Res*, 9, 5729–34
147. Dahm RL i Latimer KS, 2001, *Mast Cell Disease in Dogs and Cats: An Overview*, *Veterinary Clinical Pathology Clerkship Program*
148. Rebuzzi L, Willmann M, Sonneck K, Gleixner KV, Florian S, Kondo R, Mayerhofer M, Vales A, Gruze A, Pickl WF, Thalhammer JG, Valent P, 2007, *Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells*, *Vet Immunol Immunopathol* 115, 320-333
149. Reguera MJ, Rabanal RM, Puigdemont A, Ferrer L, 2000, *Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor*, *Am J Dermatopathol*, 22, 49–54
150. Riva F, Brizzola S, Stefanello D, Crema S, Turin L, 2005, *A study of mutations in the c-KIT gene of 32 dogs with mastocytoma*, *J Vet Diagn Invest*, 17, 385–88
151. Romansik EM, Reilly CM, Kass PH, Moore PF, London CA, 2007, *Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors*, *Vet Pathol*, 44, 335–41

152. Roskoski JR, 2005, *Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase – the stem cell factor receptor*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 338, 1307–15
153. Roskoski RJ, 2007, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression*, Crit Rev Oncol Hematol, 62, 179-213
154. Sakai H, Noda A, Shirai N, Iidaka T, Yanai T, Masegi T, 2002, *Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and ki67 expression*, J Comp Pathol, 127:233-8.
155. Saleem TB i Ahmed I, 2009, *Gastrointestinal stromal tumour-evolving concepts*, Surgeon, 7:36-41
156. Scarpa F, Sabattini S, Berlato D, Bettini G, 2013, *Histological grading of canine mast cell tumors: Is two better than three*, The 31st meeting of the European Society and College of Veterinary Pathologists, London
157. Scase TJ, Edwards D, Miller J *i sar.*, 2006, *Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis*, Journal of Veterinary Internal Medicine, 20, 151–58
158. Scase TJ, Edwards D, Miller J, Henley W, Smith K, Blunden A, Murphy S., 2006, *Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis*, Journal of Veterinary Internal medicine, 20, 1, 151-8
159. Schmid S, Aboul-Enein F, Pfisterer W, Birkner T, Stadek C, Knosp E., 2010, *Vascular endothelial growth factor: the major factor for tumor neovascularization and edema formation in meningioma patients*, Neurosurgery, 67, 1703–08
160. Schlieben P, Meyer A, Weise C, Bondzio A, Einspanier R *i sar.*, 2012, *Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumours*, Veterinary Journal, 194, 2, 210-14
161. Schulman ES *i sar.*, 1983, *Heterogeneity of human mast cells*, Journal of Immunology, 131(4), 1936-41
162. Schwartz LB, Irani AA, Roller K, Castells MC, Schechter NM, 1987, *Quantitation of histamine, tryptase and chymase in dispersed human T and it mast cells*. J Immunol 138, 2611
163. Schwartz LB, 1994, *Mast cells: function and contents*. *Current Opinion in Immunology*, 6(1), 91-97



164. Schwartz LB, 2006, *Analysis of MCT and MCTC mast cells in tissue. The human mast cell. In: Mast Cells: Methods and Protocols*, ed. Krischnaswamy G, Chi DS, p. 53-62. New Jersey, USA, Humana Press Inc.
165. Scott DW, Miller WH, Griffin CG, 2001, *Mast cell tumor. In: Small Animal Dermatology*, ed. Scott DW, Miller WH, Griffin CG, 6th edn. St Louis, MO: W.B. Saunders, 1320–30
166. Scott MA, Stockham SL, 2000, *Basophils and Mast Cells*, 5th edn. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, 308–15
167. Sekis I, Gerner W, Willmann M, Rebuzzi L, Tichy A, Patzl M, Thalhammer JG, Saalmüller A, Kleiter MM, 2009, *Effect of radiation on vascular endothelial growth factor expression in the C2 canine mastocytoma cell line*, *Am J Vet Res*, 70, 1141-50
168. Sfiligoi G, Rassnick KM, Scarlett JM, Northrup NC, Gieger TL., 2005, *Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990–2001)*, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, 1368–74
169. Shahid M, 2009, *Histamine, Histamine Receptors, and their Role in Immunomodulation: An Updated Systematic Review*. *The Open Immunology Journal*, 9-41
170. Simeonov R, Simeonova G, 2007, *Nucleomorphometric analysis of feline basal cell carcinomas*, *Research in Veterinary Science*
171. Simoes JP, Schoning P, 1994, *Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques*, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6,458–65
172. Stanclift RM, Gilson S, 2008, *Evaluation of neoadjuvant prednisolone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumours in dogs*, *Journal of American Veterinary Medical Association*, 232, 53-62
173. Stern WA, 2012, *Histologic Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Is There a Good System?*, *J Vet Sci Med Diagn*, 1, 1
174. Stevens EC, Rosenthal NS, 2001, *Bone marrow mast cell morphologic features and hematopoietic dyspoiesis in systemic mast cell disease*, *Am J Clin Pathol*, 116, 177–182

175. Strefezzi RD, Kleeb SR, Xavier JG, Dias JL, 2010, *Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos*, Pesquisa Veterinária Brasileira, 30, 559-65
176. Strefezzi RF, Xavier JG, Catao-Dias JL, 2003, *Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors*, Vet Pathol, 40, 268–75
177. Strefezzi RF, Kleeb SR, Xavier JG, Catao-Dias JL, 2009, *Prognostic indicators for mast cell tumors*, Bray J Vet Pathol, 2, 110-21
178. Supajatura V i sar., 2002, *Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity*, J. Clin. Invest. 109, 1351–9
179. Sur R, Cavender D, Malaviya R, 2007, *Different approaches to study mast cell functions*, International Immunopharmacology 7, 555–67
180. Takahashi S, *Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy*, Biol Pharm Bull, 34, 1785-88
181. Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe M, Nakagawa T, Ohno K, Sasaki N, Sugano S, Tsujimoto H, 2010, *Aberrant autophosphorylation of c-KIT receptor in canine mast cell tumor cell lines*, Vet. Immunol. Immunopathol., 137, 208–16
182. Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe M, Takahashi M, Nakagawa T, Takeuchi A, Bonkobara M, Kobayashi T, Ohno K, Uchida K, Asano K, Nishimura R, Nakayama H, Sugano S, Ohashi Y, Tsujimoto H, 2013, *Validation of the prognostic value of histopathological grading or c-KIT mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study*, Veterinary Journal, 196, 492–8
183. Taylor F, Murphy S, Hoather T, Dobson J, Scase T, 2010, *TSLC1 tumoursuppressor gene expression in canine mast cell tumours*, Veterinary Comparative Oncology 8, 263–272
184. Terzić T, 2010, *Patohistološki i imunohistohemijski parametri značajni za prognozu i terapiju nediferentovanog karcinoma nazofarinksa*, Doktorska disertacija
185. Thamm DH, Turek MM, Vail DM: *Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy or high-risk canine mast cell tumor: 61 cases*, J Vet Med Sci 68:581-587, 2006
186. Thamm DH, Vail DM., *Mast cell tumors*, In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors, 2007, Small Animal Clinical Oncology, Philadelphia, Saunders, 402-24

187. Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, Kalogeromitros D, 2007, *Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation*, Immunol. Rev. 217, 65–78
188. Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D, 2010, *Mast cells and inflammation*, Biochim Biophys Acta, 1822, 21–33
189. Thompson JJ, Yager JA, Best SJ., Pearl DL, Coomber BL, Torres RN, Kiupel M and Foster RA, 2010, *Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors: Cellular Proliferation and KIT Expression as Prognostic Indices*, Veterinary Pathology, 48(1), 169-81
190. Thompson JJ, 2012, *Canine Mast Cell Tumours: Characterization of Subcutaneous Tumours and Receptor Tyrosine Kinase Profiling*, PhD Thesis, Guelph, Ontario, Canada
191. Trere D, Gramantieri L, Siringo S *i sar.*, 1996, *In hepatocellular carcinoma AgNOR protein expression correlates with tumour mass doubling time*, Journal of Hepatology, 24, 60–65
192. Tsai M, Takeishi T, Thompson H, Langley KE, Zsebo KM, Metcalfe DD, Geissler EN, Galli SJ, 1991, *Induction of mast cell proliferation, maturation and heparin synthesis by the rat c-KIT ligand, stem cell factor.*, Proc Natl Acad Sci USA, 88, 6382–86
193. Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, 2011, *Platelet-activating factor and pain*, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 34(8), 1159-62
194. Turrel JM, Kitchell BE, Miller LM, Theon A, 1988, *Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs*, Journal of the American Veterinary Medical Association, 193, 936-940
195. Turin L, Acocella F, Stefanello D, Oseliero A *i sar.*, 2006, *Expression of c-KIT proto-oncogene in canine mastocytoma: a kinetic study using real-time polymerase chain reaction*, J. Vet. Diagn. Invest, 18, 343–49
196. Urb M, Sheppard DC, 2012, *The Role of Mast Cells in the Defence against Pathogens*, PLoS Pathog, 8(4)
197. Valent P, Cerny-Reiterer S, Herrmann H, Mirkina I, George TI, Sotlar K, Sperr WR, Horny HP, 2010, *Phenotypic heterogeneity, novel diagnostic markers, and target expression profiles in normal and neoplastic human mast cells*, Best Pract Res Clin Haematol, 23, 369-78

198. Volante M, Cavallo GP, Papotti M, 2004, *Prognostic factors of clinical interest in poorly differentiated carcinomas of the thyroid*. *Endocr Pathol*, 15, 313–317
199. Vyas H, Krishnaswamy G, 2006, *Paul Ehrlich's "Mastzellen"--from aniline dyes to DNK chip arrays: a historical review of developments in mast cell research*, *Methods Mol Biol*, 315, 3-11
200. Wallace B. Morrison, 2002, *Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management*, 2nd edn. Teton NewMedia, 30, 451-59
201. Waltman SS, 2012, *Mast Cell Tumor Diagnostic Panels*, Southwest Veterinary Oncology, PLLC
202. Vascellari M, Giantin M, Capello K, Carminato A, Morello EM, Vercelli A, Granato A, Buracco P, Dacasto M, Mutinelli F, 2012, *Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors : Association With Grading and Prognosis*, *Veterinary Pathology* 00(0), 1-12
203. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, Miller R, Resau JH, Kiupel M, 2006a, *The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors*, *Neoplasia*, 8, 104-11
204. Webster JD, Kiupel M, Kaneene JB, Miller R, and Yuzbasiyan-Gurkan V, 2004, *The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors*, *Vet Pathol* 41,371 – 77
205. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, Miller R, Resau JH, Kiupel M, 2006a, *The role of c-KIT in tumorigenesis:evaluation in canine cutaneous mast cell tumors*, *Neoplasia*, 8, 2, 104 – 11
206. Webster JD, Kiupel M, Yuzbasiyan-Gurkan V, 2006b, *Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors*, *BMC Cancer*, 6, 85
207. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M., 2007, *Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication*, *Veterinary Pathology* 2007; 44: 298–308
208. Wedemeyer J, Galli SJ, 2000, *Mast cells and basophils in acquired immunity*, *Br.Med. Bull*, 56, 936–55

209. Weisse C, Shofer FS, Sorenmo K, 2002, *Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision*, J Am Anim Hosp Assoc 38:71–3
210. Welle MM, Rohrer CB, Howard J, Rüfenacht S, 2008, *Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment*, Veterinary Dermatology, Vol. 19(6), 321-339
211. Wong NA, Young R, Malcomson RD, Nayar AG, Jamieson LA, Save VE, Carey FA, Brewster DH, Han C, Al-Nafussi A, 2003, *Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach*. Histopathology, 43, 118–126
212. Wu H, Hayashi T, Inoue M, 2004, *Immunohistochemical expression of p27 and p21 in canine cutaneous mast cell tumors and histiocytomas*, Veterinary Pathology, 41, 296-9
213. Zemke D, Yamini B and Yuzbasiyan-Gurkan V, 2002, *Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs*, Vet Pathol 39, 529 – 35

## **BIOGRAFIJA**

Vučićević Ivana rođena je 19. februara 1978. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Studije veterinarske medicine u Beogradu upisala je 1997. godine, a diplomirala je u martu 2004. godine, sa prosečnom ocenom 9,64 (devet i 64/100). Iste godine je upisala postdiplomske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Tokom postdiplomskih studija bila je učesnik projekta na Fakultetu veterinarske medicine „Razvoj i primena novih proizvoda na bazi modifikovanih i oplemenjenih minerala u proizvodnji hrane“. Položila je sve ispite predvedene planom i programom i 2007. godine magistrirala na temu: „Uticaj peroralnog tretmana mineralnim adsorbentom na bazi zeolita na koncentraciju holesterola i žučnih kiselina u perifernoj krvi pasa“.

Pre izbora za asistenta na katedri za Patološku morfologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, radila je do 2008. godine u Ministarstvu poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije u Upravi za veterinu. Tokom 2008. godine bila je zaposlena na Naučnom Institutu za veterinarstvo Srbije u Beogradu, u okviru Odeljenja za epizootiologiju i zdravstvenu zaštitu živine i drugih ptica, a od 2009. do 2011. godine na projektu Svetske banke „Serbia Transitional Agriculture Reform Project (STAR)“ u okviru Sektora za ruralni razvoj Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije.

Zahvaljujući odličnom uspehu na studijama bila je dobitnik brojnih stipendija, kao što su Stipendija Kraljevine Norveške, Stipendija Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka, a Stipendiju Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije je primala tokom postdiplomskih studija.

Učestvovala je na brojnim simpozijumima i konferencijama. Stručnih i naučnih članaka, ukupno 17, publikovala je u domaćim i stranim časopisima. Od tog broja, jedan rad je publikovan u časopisu sa SCI liste.

## IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisana Vučićević Ivana

Broj upisa:

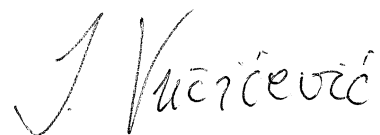
### Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom „EKSPRESIJA ANTIGENA ĆELIJSKE PROLIFERACIJE NA MASTOCITIMA I NJIHOV ZNAĀAJ ZA GRADACIJU MASTOCITOMA PASA“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati konkretno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,  
2014. godine

Potpis doktoranda:



**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE  
DOKTORSKOG RADA**

Ime i Prezime autora: Ivana Vučićević

Broj upisa:

Studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: EKSPRESIJA ANTIGENA ĆELIJSKE PROLIFERACIJE NA  
MASTOCITIMA I NJIHOV ZNAĀAJ ZA GRADACIJU MASTOCITOMA PASA.

Mentor: Dr Sanja Aleksić-Kovačević, redovni profesor

**Potpisana Vučićević Ivana**

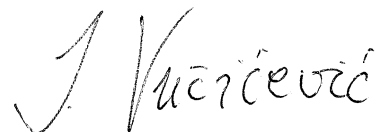
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,  
2014. godine

Potpis doktoranda:





## IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom „EKSPRESIJA ANTIGENA ĆELIJSKE PROLIFERACIJE NA MASTOCITIMA I NJIHOV ZNAČAJ ZA GRADACIJU MASTOCITOMA PASA“, koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- 3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu,  
2014. godine

Potpis doktoranda:

