



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Maša Efendić

**Serumska, tkivna i proteomska analiza  
biljega novotvorina testisa u pasa**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Maša Efendić

# **Serum, tissue and proteomic analyses of testicular tumor markers in dogs**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

MAŠA EFENDIĆ

# **Serumska, tkivna i proteomska analiza biljega novotvorina testisa u pasa**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Nino Maćešić  
prof. dr. sc. Dražen Vnuk

Zagreb, 2024.



University of Zagreb  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Maša Efendić

# **Serum, tissue and proteomic analyses of testicular tumor markers in dogs**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Prof. Nino Maćešić, PhD, DVM

Prof. Dražen Vnuk, PhD, DVM

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

## IZJAVA

Ja, Maša Efendić, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

---

(potpis studenta)

Zagreb, 2024.

ZAHVALA

Veliki broj ljudi je zaslužan za izradu ove doktorske disertacije te se ovim putem svima zahvaljujem od srca! Velika čast mi je bila prilikom istraživanja udružiti Kliniku za unutarnje bolesti, Laboratorij za proteomiku, Kliniku za porodništvo i reprodukciju, Kliniku za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju, Zavod za veterinarsku patologiju i Zavod za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Posebno bi se zahvalila svojim mentorima prof. dr. sc. Nini Maćešiću i prof. dr. sc. Draženu Vnuku koji su me podržali u svim mojim idejama, te su bili dostupni u svim momentima, reagirali i gurali me naprijed kada je bilo potrebno te su bili najveća podrška u cijelom mojem doktorskom studiju. Profesor Vnuk nije niti svijestan da je jedan neobvezan zajednički razgovor u čekaoni oko tumora testisa u pacijenta proizveo cijelu ideju oko cjelokupnog istraživanja te je time i opravdano zaslužio ulogu mentora koju je i opravdao. S druge strane, profesor Maćešić je još za vrijeme studentskih dana bodrio svaki moj korak, bio i još uvijek je podrška u svim mojim željama, idejama i odlukama, što je također razlog odluke da bude također mentor tijekom dokorskog studija. Kao mentor i prijatelj otvorio mi je vrata svog doma savjetima i uvelike olakšao pisanje ove disertacije i bio prisutan na svim mojim usponima i padovima ohrabrujući me i gurajući me naprijed. Meni kao pristupniku je iznimna čast imati ovakve mentore koji su primarno dobri i iskreni ljudi.

Također im hvala što su vjerovali i podržavali moje stavove i što su mi omogućili da cijelo istraživanje i pisanje doktorske disertacije odradimo kao jedan snažan tim.

Nadalje, željela bi se zahvaliti svim nastavnicima, tehničarima i svim djelatnicima svoje klinike za razumijevanje prilikom pisanja, što su mi olakšali i bili moralna podrška u cijelom periodu, kao i predstojnici izv. prof. dr.sc. Ivi Šmit na razumijevanju i podršci u svim oblicima. Također veliko hvala prof. dr. sc. Vladimiru Mrljku na mogućnosti izrade proteomskih analiza i na financijskoj podršci, te doc. dr. sc. Josipi Kuleš i kolegicama Ivani Rubić i Dini Rešetar Maslov na izdvojenom vremenu i dobroj volji te moralnoj podršci u Laboratoriju za proteomiku.

Zahvale također idu i našim djelatnicima na Zavodu za patologiju, a prvenstveno veliko hvala doc. dr. sc. Lidiji Medven Zagradičnik i prof. dr. sc. Marku Hohšteteru na izdvojenom vremenu i entuzijastičnom pristupu prilikom svih faza istraživanja. Također hvala i laboranticama Sandri Ii Sanji što su izdvojile vrijeme za pripremu mojih uzoraka.

Željela bi se zahvaliti i dekanu prof. dr. sc. Marku Samardžiji koji me je još od studentskih dana pratio u mojem znanstvenom usavršavanju i bio uvijek na raspolaganju te me pravilno usmjeravao, čime sam stekla dobar temelj za uspješno i lagodno pisanje doktorske disertacije.

Posebne zahvale idu mojoj majci koja me vodila i usmjeravala kroz život, bila i je životna podrška te ujedno ovu disertaciju posvećujem mojoj majci i mom pokojnom ujaku koji bi bio ponosan da je mogao biti dio ove cijele priče!



## SAŽETAK

### **Serumska, tkivna i proteomska analiza biljega novotvorina testisa u pasa**

Stariji su psi skloni razvoju novotvorina testisa koje su najčešće dobroćudne prirode, no u nekim slučajevima dolazi do zloćudnog biološkog ponašanja.

Dosadašnjim istraživanjima utvrđeni su serumski i imunohistokemijski biomarkeri za testikularne novotvorine pasa, ali ne i njihova međusobna povezanost. Na testisima pasa, za razliku od testisa muškaraca, provedeno je relativno malo istraživanja imunohistokemijskih biljega, a ona koja su provedena temeljila su se na relativno malom broju uzoraka.

Novija istraživanja stavljaju naglasak na proteomiku koja analizira kompletnu proteinsku komponentu, a u biomedicini se već počela koristiti u svrhu dijagnostičkih i prognostičkih markera novotvorina testisa. Proteomika je znanost koja se bavi proučavanjem proteina omogućujući njihovu identifikaciju i kvantifikaciju u stanicama, tkivima i biološkim tekućinama te analizu promjene proteinske ekspresije u zdravim i bolesnim stanicama. U biomedicini proteomika je već iznimno korisna u pronalaženju novih tumorskih biljega. Do sada nema proteomskih istraživanja na novotvorinama testisa u pasa.

Cilj je ovoga rada utvrditi povezanost ekspresije tumorskih markera u serumu i testikularnom tkivu pasa kao i mogućnost analize proteinskih komponenti u svrhu identifikacije novih molekularnih markera iz seruma i tkiva u pasa s novotvorinom testisa proteomskim tehnikama što će pridonijeti razvoju novih ranih dijagnostičkih postupaka u veterinarskoj medicini.

Rezultati su pokazali da postoji značajna razlika u ekspresiji anti-Müllerova hormona u serumu i tkivu tumorskih testisa u pasa kao i ekspresija različitih proteina povezanih s onkogenim učinkom u odnosu na zdrave pse.

Ključne riječi: novotvorine testisa pasa, serumski tumorski marker, imunohistokemijski tumorski markeri, proteomika.

## EXTENDED ABSTRACT

### INTRODUCTION

Older dogs are prone to the development of testicular tumors, which are mostly benign (non-cancerous), but in some cases malignant biological behavior (cancerous/malignant behavior) occurs. Tumors (lat. tumor - swelling) are accumulations of tissue consisting of abnormal cells. In human medicine, malignant forms of tumors are also referred to as cancer or neoplasm (Greek: *neos* - new, *plasia* - growth). Malignancy of a tumor refers to the ability of this tumor to invade and destroy the surrounding tissue and to form distant metastases in the body, i. e. to spread from the focus via the circulatory and lymphatic system to other parts of the body.

Reproductive diseases (prostatic hyperplasia, testicular tumors and cryptorchidism) are common in older, non-neutered dogs, and the method of choice for treating these diseases is orchiectomy. Testicular tumors are the most common type of tumor of the male dog's reproductive system and are otherwise the third most common type of tumor in dogs (after skin and fiber tumors).

According to the World Health Organization's classification of domestic animal tumors, the most common testicular tumors in dogs are testicular stromal tumors (sperm track tumors), germ cell tumors and mixed tumors, and the most common of the subtypes mentioned are Sertoli cell tumors and interstitial tumors, i. e. Leydig tumor cells.

A neoplasm or a tumor produces substances called markers, i. e. tumor markers (biomarkers). We can determine them in blood, body fluids or tissue, and they are specific for certain types of tumors. In healthy individuals they are present in small amounts, while with the appearance of tumors their amount also increases and their values rise with the growing tumors. For this reason, tumor markers are used as advanced diagnostics to detect tumors and/or to determine a specific therapy and to monitor the course of therapy.

Dogs with a testicular tumor often have no clinical signs, but a clinical examination may reveal changes in the consistency and/or size of the testicles that are usually indicative of a tumor process.

Due to the continuous progress of diagnostics in veterinary medicine, more and more emphasis is placed on the diagnosis of tumors based on tumor markers determined from blood, body fluids and tissue.

In previous research, serum and immunohistochemical biomarkers (tumor markers) have been determined for various types of tumors in dogs, including testicular tumors. When mentioning serum markers, anti-Muellerian hormone and insulin-like factor 3 are most frequently used markers, while testosterone and 17-beta estradiol are less frequently used.

Our aim as veterinarians is to provide the patient with the best possible medical care with the aim of curing or controlling the disease. For this reason, we strive for progress in veterinary medicine that follows medicine, so that the future of diagnostics and the choice of therapy for oncological patients also lies in proteome research.

Proteomics is a science that deals with the study of proteins and enables their identification and quantification in cells, tissues, and biological fluids as well as the analysis of changes in protein expression in healthy and diseased cells. In biomedicine, proteomics is already extremely useful for finding new tumor markers. It is important to mention that so far there are no proteomic studies on testicular tumors in dogs.

The desire of this research is to provide the owners of our patients with as detailed an insight as possible into the severity of the pathology when a testicular tumor is suspected, which often has a potentially malignant biological behavior that is neglected in veterinary medicine. The aim of this research is therefore to improve the early diagnosis and differentiation of testicular tumors in dogs through minimally invasive diagnostic procedures, e. g. by analyzing serum, tissue and proteomic components to detect new tumor markers.

## HYPOTHESIS AND AIMS OF THE RESEARCH

It is assumed that there is a correlation between increased serum and immunohistochemical expression of anti-Muellerian hormone and the detection of proteomes as tumor markers in dogs with testicular neoplasms compared to healthy dogs.

The main objectives of the research are to investigate the expression of tumor markers for the purpose of early diagnosis and differentiation of testicular neoplasms in dogs and to determine the prevalence of testicular neoplasms in dogs and their incidence in relation to age. Furthermore, to compare serum concentration and immunohistochemical expression of anti-Muellerian hormone as a tumor marker in dogs with testicular neoplasms compared to healthy dogs. Also, aim is to use application of proteomic techniques to differentiate additional markers for different types of testicular tumors in dogs and compare the serum proteome and the testicular tissue proteome of dogs with testicular neoplasms compared to healthy dogs.

## MATERIAL AND METHODS

After orchietomy, the examined dogs were divided into 3 groups based on the histopathological findings – tumors (N = 41), degeneration (N = 10) and control group (N = 21, healthy dogs). Prior to surgery, a preoperative examination of the dogs was performed to assess their health status. Health status was assessed by a clinical examination consisting of triage, inspection, palpation of the chest and abdomen, auscultation of the heart and lungs, hematologic blood analysis, determination of biochemical blood indicators, chest radiography in three projections and abdomen in two projections, and ultrasonography of the prostate and testes. Venous blood was drawn from the *v. cephalica antebrachii* using the "Vacutainer" system. For the purposes of this study, the following biochemical blood values were determined, among others: urea, creatinine, total proteins, albumins, sodium, potassium, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, C-reactive protein, glucose and total calcium.

After the clinical examination, individuals who showed pathophysiological changes unrelated to the reproductive system (fever, deviations from the reference values of the hematological and biochemical blood values and/or pathological changes detected by X-ray) were excluded from further examination.

The expression of the anti-Muellerian hormone marker from archived dog serum samples was determined using a sandwich ELISA test (Canine Anti-Muellerian Hormone Sandwich, ELISA kit). Serum samples were collected and stored on the day of orchiectomy. Quantitative measurement of anti-Muellerian hormone concentration in serum was performed in 72 dogs according to the ELISA kit manufacturer's protocol.

Histopathological examination of testicular tissue included microscopic examination of archived testicular tissue samples (N = 72 dogs) from the Department of Veterinary Pathology at the Faculty of Veterinary Medicine in Zagreb to detect pathological changes.

The immunohistochemical expression of the markers AMH and Ki-67 was then examined in all groups of dogs. The immunohistochemical analysis was performed on deparaffinized histological sections.

The immunohistochemical analysis was followed by proteomic analysis of serum and testicular tissue. Using a semi-quantitative proteomic approach using isobaric tags that allow multiplexing, proteomic analysis of serum and tissue was performed (on samples from 72 animals), and then the samples were analyzed by LC-MS/MS. Statistical and bioinformatic analyzes were performed on the proteomics data.

## RESULTS

Of the 72 dogs included in the study, 41 dogs (56.9 %) were diagnosed with testicular tumors based on histopathological analysis of the testicular tissue. Of the 41 dogs with testicular tumors, 23 dogs (56.1 %) had tumors in both testicles. If the dogs had one tumor-altered testis and the other was a degenerative or histopathological testis without pathology, they were classified in the group of dogs with testicular tumors.

In 10 dogs (13.9 %), degenerative changes were found in both testicles. Degenerative changes in only one testis were found in 6 dogs, testicular atrophy in 3 dogs and testicular fibrosis in 1 dog, while the other testis was tumorously altered in all cases. If one dog had a healthy testis and the other was degenerated, it was classified in the degeneration group. In 21 (29.2 %) dogs, no tumor was found in any testis.

The age of the dogs included in the study was between 1 and 18 years, the average age of all dogs included in the study was 9.4 years. Looking at the groups, the average age in the testicular tumor group was 11.4 years, in the degeneration group 6.3 years, while in the control group it was 7.0 years.

Of the dogs diagnosed with testicular tumors (N = 41), the most common were Leydig cell tumors, which were diagnosed in 16 dogs (39.0 %), and the proportion of dogs with other tumor types was as follows: Seminomas 13 (31.7 %), then mixed tumors 10 (24.4 %) and Sertoli tumors 2 (4.9 %).

Based on the histopathological findings, the dogs were divided into specific groups to determine the concentration of anti-Muellerian hormone in the serum. The highest anti-Muellerian hormone concentration was found in the seminoma group, followed by mixed tumors, Leydig cell tumors, while a significantly lower anti-Muellerian hormone concentration was found in the control group.

The analysis of the expression of the Ki-67 marker in the testicular tissue showed that there is a statistically significant difference between the control group and the degeneration group as well as between the control group and the tumor group. There was no statistical significance when comparing the degeneration and tumors groups.

When analyzing anti-Mueller hormone in testicular tissue using immunohistochemistry, comparing the control group, the group of dogs with testicular degeneration and the group of dogs with testicular tumor, and taking into account the types of tumors (Sertoli tumor, seminoma and Leydig cell tumor), there is a statistically significant difference between all groups except between the groups of Sertoli tumors and degeneration and the control group and Leydig cell tumors.

All samples from the studied dogs (N = 72) were analyzed by proteomic approach based on TMT labeling. Analysis of the collected data in Proteome Discoverer showed that a total of 128 proteins.

Using a proteomic approach based on TMT labeling, 92 tissue samples from dog testes were analyzed.

## CONCLUSIONS

The average age of dogs with testicular tumors is 11.4 years and the Leydig cell tumor is the most common type of testicular tumor. The concentration of anti-Muellerian hormone in serum is significantly higher in dogs with testicular tumors than in the control group of dogs, while the healthy dogs have the lowest level of anti-Muellerian hormone in serum. Seminomas have a significantly higher concentration of anti-Muellerian hormone in serum compared to other testicular tumors. The immunohistochemical marker Ki-67 does not show a higher expression in the group of dogs with testicular tumors than in the control group, while the immunohistochemical marker anti-Muellerian hormone shows a higher expression in Sertoli cell tumors and seminomas compared to the control group of dogs. Proteomic analyzes of serum revealed significant changes in protein expression in the group of dogs with testicular tumors compared to the control group, most of which proteins are involved in hemostasis. Proteomic analyzes of testicular tissue revealed significant changes in protein expression in the group of dogs with testicular tumors compared to the control group, most of which are involved in the immune system and the cellular response to stress. By proteomic analysis of testicular tissue, we found a higher expression of proteins related to oncogenic processes in the group of dogs with testicular tumors compared to the control group.

Keywords: testicular tumors in dogs, serum tumor markers, immunohistochemical tumor markers, proteomics.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA</b> .....	3
2.1. ANATOMIJA I FIZIOLOGIJA MUŠKIH SPOLNIH ORGANA .....	3
2.2. HORMONSKA REGULACIJA REPRODUKCIJSKIH FUNKCIJA U PASA.....	7
2.2.1. Hormoni hipofize .....	8
2.2.2. Hormoni testisa .....	10
2.3. PATOLOGIJA REPRODUKCIJSKOG SUSTAVA MUŠKIH PASA .....	12
2.3.1. Kriptorhizam .....	12
2.3.2. Bolesti prostate.....	13
2.3.3. Tumori testisa pasa.....	13
2.4. SERUMSKI BILJEZI TUMORA TESTISA .....	21
2.4.1. Biljeg anti-Müllerov hormon .....	22
2.4.2. Biljeg faktor 3 sličan inzulinu .....	25
2.4.3. Biljeg testosteron.....	25
2.4.4. Biljeg 17-beta estradiol .....	26
2.5. IMUNOHISTOKEMIJSKI BILJEZI TUMORA TESTISA .....	27
2.5.1. Biljeg anti-Müllerov hormon .....	27
2.5.2. Biljeg Ki-67.....	28
2.5.3. Ostali imunohistokemijski biljezi tumora testisa .....	29
2.6. ISTRAŽIVANJE PROTEOMA I RAZVOJ PROTEOMIKE .....	30
2.6.1. Proteomska istraživanja u pasa .....	36
2.6.2. Proteomska istraživanja u ljudi s tumorima testisa .....	36
<b>3. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	38
<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	40
4.1. PRIJEOPERACIJSKI PREGLED PASA I UZORKOVANJE KRVI.....	40
4.2. ORHIKTOMIJA .....	41
4.3. DOKAZIVANJE SERUMSKE EKSPRESIJE ANTI-MÜLLEROVA HORMONA	42
4.4. HISTOPATOLOŠKA ANALIZA TKIVA TESTISA .....	43
4.5. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA TKIVA TESTISA.....	45



4.5.1. Primijenjeni imunohistokemijski biljezi .....	45
4.6. PROTEOMSKE ANALIZE SERUMA I TESTIKULARNOG TKIVA .....	49
4.6.1. Priprema uzoraka za proteomsku analizu.....	49
4.6.2. Analiza uzoraka LC-MS/MS pristupom .....	51
4.6.3. Statističke i bioinformatičke analize .....	53
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>55</b>
5.1. UČESTALOST I HISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA TUMORA TESTISA PASA.	55
5.2. EKSPRESIJA ANTI-MÜLLEROVA HORMONA IZ SERUMA .....	59
5.3. PRISUTNOST IMUNOHISTOKEMIJSKIH BILJEGA.....	64
5.3.1. Biljeg Ki-67.....	64
5.3.2. Biljeg anti-Müllerov hormon .....	68
5.4. REZULTATI PROTEOMSKE ANALIZE SERUMA PRIMJENOM TEHNIKA LC-MS/MS .....	74
5.4.1. Analiza bioloških puteva proteina seruma .....	78
5.5. REZULTATI PROTEOMSKE ANALIZE TKIVA TESTISA PRIMJENOM TEHNIKA LC-MS/MS .....	79
5.5.1. Funkcionalna analiza proteina tkiva testisa.....	83
5.5.2. Analiza bioloških puteva proteina tkiva testisa.....	86
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>88</b>
6.1. UČESTALOST TUMORA TESTISA U PASA.....	88
6.2. ANALIZA HISTOLOŠKE KLASIFIKACIJE TUMORA TESTISA U PASA.....	89
6.3. ANALIZA SERUMSKE EKSPRESIJE ANTI-MÜLLEROVA HORMONA.....	91
6.4. ANALIZA NAZOČNOSTI I ZNAČAJNOSTI IMUNOHISTOKEMIJSKIH BILJEGA.....	93
6.5. PROTEOMSKA ANALIZA SERUMA ISTRAŽIVANIH PASA.....	94
6.6. PROTEOMSKA ANALIZA TKIVA TESTISA U ISTRAŽIVANIH PASA .....	99
<b>7. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>103</b>
<b>8. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>104</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA .....</b>	<b>115</b>

## 1. UVOD

Stariji su psi skloni razvoju tumora testisa koji su najčešće dobroćudne (nekancerogene) prirode, no u nekim slučajevima dolazi do zloćudnog biološkog ponašanja (kancerogeno/maligno ponašanje). Tumori (lat. *tumor*: oteklina) jesu mase tkiva formirane od abnormalnih stanica. Zloćudni oblici tumora u humanoj medicini još se nazivaju i rak, novotvorina ili neoplazma (grč. *neos*: nov, *plasia*: rast). Zloćudnost ili malignost nekog tumora odnosi se na svojstvo tog tumora da prodi i razara okolno tkivo i da stvara udaljene metastaze u organizmu, odnosno da se širi od žarišta na druge dijelove tijela putem krvožilnog i limfnog sustava.

U starijih nekastriranih pasa često je zastupljena reproduktivna patologija (hiperplazija prostate, tumori testisa i kriptorhizam), a metoda izbora liječenja kod navedenih bolesti je orhiektomija. Tumori testisa najčešći su tip tumora reproduktivnog sustava muških pasa, a inače su treći najčešći oblik tumora u pasa (nakon kožnih i fibroznih tumora). Prema klasifikaciji tumora domaćih životinja Svjetske zdravstvene organizacije, najzastupljeniji su tumori testisa u pasa tumori strome testisa (tumori sjemenog tračka), tumori zametnih stanica i mješoviti tumori, a najzastupljeniji su među navedenim podtipovima tumori Sertolijevih stanica (SCT) i intersticijski tumori, odnosno tumori Leydigovih stanica (LCT).

Novotvorina ili tumor proizvodi tvari koje se nazivaju biljezima odnosno tumorskim markerima ili biomarkerima. Možemo ih utvrditi u krvi, tjelesnim tekućinama ili tkivu. Pojedini su biljezi specifični za određene vrste tumora, a mogu biti i vrsno specifični. Kod zdravih jedinki biljezi su prisutni u malim količinama, dok se pojavom tumora povećava i njihova količina, a njihove vrijednosti rastu kako raste tumor. Upravo iz tog razloga tumorski biljezi služe kao napredan dijagnostički alat u otkrivanju postojanja tumora i/ili za određivanje specifične terapije kao i za praćenje napretka terapije.

Psi s tumorom testisa češće nemaju kliničke znakove, ali prilikom kliničkog pregleda moguće je primijetiti promjene u konzistenciji i/ili veličini testisa koje najčešće idu u prilog tumorskom procesu.

Budući da postoji stalan napredak dijagnostike u veterinarskoj medicini, sve je više naglasak na dijagnostici tumora na temelju tumorskih biljega.

Dosadašnjim istraživanjima utvrđeni su serumski i imunohistokemijski biljezi za različite vrste tumora u pasa, pa tako i za tumore testisa. Istraživanja za serumske biljege najčešće su zasnovana na anti-Müllerovu hormonu (AMH) i faktoru 3 sličnom inzulinu (engl. *insuline-like factor 3* – INSL3), a nešto su manje zastupljena istraživanja rađena na testosteronu i 17-beta estradiolu.

Na testisima pasa, za razliku od testisa muškaraca, provedeno je relativno malo istraživanja imunohistokemijskih biljega, a ona koja su i provedena temeljila su se na relativno malom broju uzoraka. Određeni imunohistokemijski biljezi koriste se za diferencijaciju humanih tumora testisa, a neki od njih su istraživani i na psima s tumorom testisa, kao što su AMH, Ki-67, E-kadherin, GATA-4, citokeratin, inhibin  $\alpha$ , OCT3/4, PGP 9.5, dezmin, vimentin, INSL-3, alf-fetprotein, laktat-dehidrogenaza, c-KIT, CD-30, TERT, PCNA i p53.

Ono čemu kao doktori veterinarske medicine težimo jest da pacijentu omogućimo što bolju medicinsku skrb, a sve u svrhu izlječenja ili kontrole bolesti. Zbog toga težimo napretku u veterini koja prati medicinu, pa tako i budućnost dijagnostike i izbor terapije onkoloških pacijenata leže i u proteomskim istraživanjima.

Proteomika je znanost koja se bavi proučavanjem proteina omogućujući njihovu identifikaciju i kvantifikaciju u stanicama, tkivima i biološkim tekućinama te analizu promjene proteinske ekspresije u zdravim i bolesnim stanicama. U biomedicini proteomika je već iznimno korisna za pronalaženje novih tumorskih biljega. Važno je napomenuti da do sada nema proteomskih istraživanja na tumorima testisa u pasa.

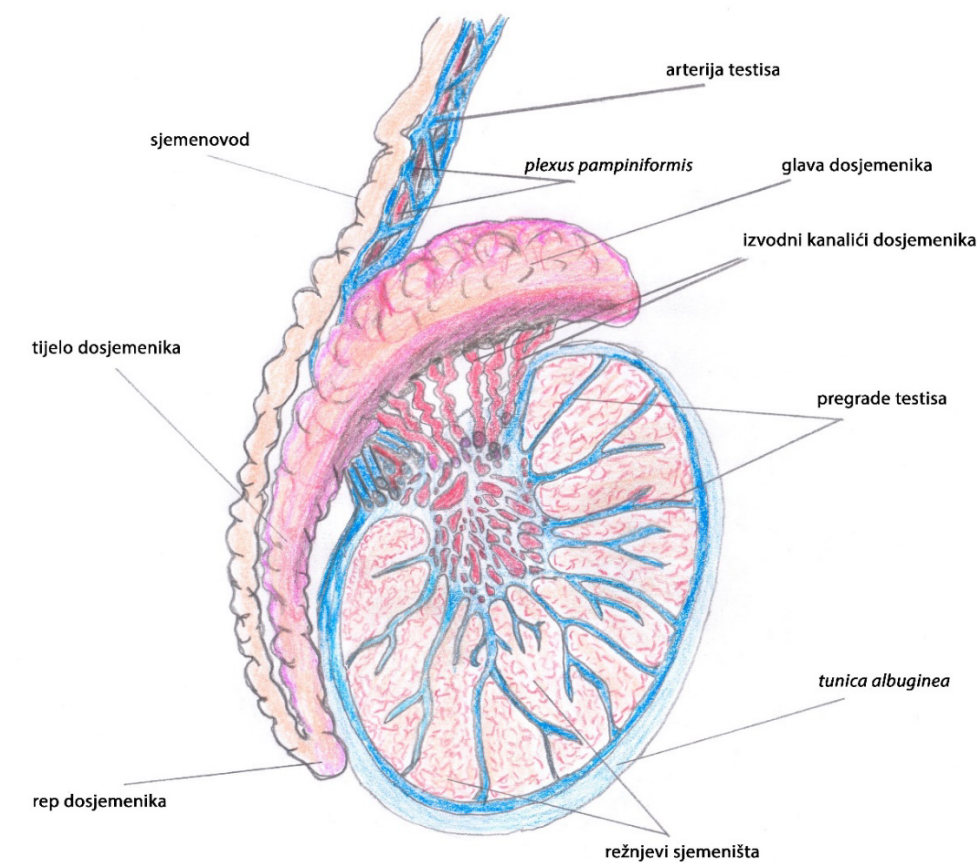
Namjera je ovog istraživanja omogućiti vlasnicima naših pacijenata da dobiju što detaljniji uvid u ozbiljnost patologije pri sumnji na tumor testisa, koja često u veterini ima zanemareno potencijalno maligno biološko ponašanje. U skladu s tim, cilj je ovoga istraživanja unaprijediti ranu dijagnostiku i diferencijaciju tumora testisa u pasa što manje invazivnim dijagnostičkim postupcima, kao što su analize seruma, tkiva i proteomskih komponenti u svrhu dokazivanja novih tumorskih biljega.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

### 2.1. ANATOMIJA I FIZIOLOGIJA MUŠKIH SPOLNIH ORGANA

Testisi ili sjemenici (lat. *testes*) muške su spolne žlijezde (gonade) koje se embrionalno razvijaju u slabinskom području te se zatim spuštaju u mošnjju (lat. *scrotum*) i smještaju ispod repa u perinealnoj regiji. Faza spuštanja naziva se *descensus testis*. Ako se jedan ili oba testisa ne spuste u mošnjju, tada govorimo o kriptorhizmu (lat. *kryptorchismus*). Mošnjja je dvodijelna kožna vreća koja visi izvan trbušne šupljine u kojoj su smješteni testisi i epididimisi te jednim dijelom sjemenovodi. Sastoji se od kože koja je vanjski sloj (lat. *dermis*) te od fibroelastičnog tkiva i glatkih mišića (lat. *tunica dartos*), potom se nalaze površna i duboka fascija (lat. *fascia scroti*) te parijetalni i visceralni sloj *tunica vaginalis*. Sjemensko uže (funikul; lat. *funiculus spermaticus*) proteže se od ingvinalnog prstena i povezuje se s dorzalnim krajem testisa. Sjemensko uže čine *arteria spermatica* i *vena spermatica*, koja tvori venski pletež (lat. *plexus pampiniformis*) oko arterije, limfne žile, simpatičkih živaca, *ductus deferens*, *musculus cremaster internus* te *tunica vaginalis propria* (JOHNSTON i sur., 2001.). Održavanje tjelesne temperature testisa, koja je bitna za spermatogenezu, odvija se uz pomoć *m. cremaster*, *tunica dartos* te *m. dartos*, tako da glatki mišići sjemenskog užeta svojim kontrakcijama podižu testise bliže tijelu, a relaksacijom izdužuju skrotum. Testise prekriva tanka, bijela, serozna opna *tunica vaginalis propria*, koja je visceralni list peritoneuma, odnosno potrbušnice. Opna prekriva čitavu površinu testisa, osim područja gdje iz sjemenog užeta u testis ulaze krvne žile i živci. Ispod nje se nalazi vezivnotkivna čahura (lat. *tunica albuginea testis*) koja je građena od kolagenih vlakana, a njome prolaze krvne žile (lat. *a. i v. testicularis*) čiji je tok vidljiv na površini testisa. Sljedeći sloj, koji naliježe na vezivnotkivnu čahuru, jest visceralni sloj peritoneuma (lat. *epiorchium*). Osim vezivnotkivne čahure, razlikujemo i vezivnotkivne pregrade (lat. *septula testis*) te vezivnotkivno tijelo (lat. *mediastinum testis*). Vezivnotkivne pregrade potječu od čahure te razdjeljuju testis na režnjeve (lat. *lobuli testis*), a one dalje oblikuju i vezivnotkivno tijelo koje je blago pomaknuto prema dosjemeniku/nuzsjemeniku odnosno epididimusu (lat. *epididymis*). Svaki režanj sastoji se od 2 do 3 sjemena kanalića (lat. *tubuli seminiferi contorti*) u kojima se odvija spermatogeneza (SAMARDŽIJA, 2006.).

Stvaranje spermija događa se u sjemenim kanalićima, a potaknuto je gonadotropnim hormonima (GH), luteinizacijskim hormonom (LH), folikulostimulacijskim hormonom (FSH) i somatotropnim hormonom (STH) prednjeg režnja hipofize (adenohipofize) te testosteronom i estrogenom. Otprilike 90 % mase testisa čine sjemeni kanalići koji prelaze u *tubuli recti*, a oni ulaze u mrežicu anastomozirajućih kanala obloženih epitelnim stanicama (lat. *rete testis*) iz kojih izlaze izvodni kanali (lat. *vasa efferentia*) koji se udružuju i prelaze u epididimis, dugačku vijugavu cijev koja se pruža uz dorzolateralnu granicu testisa (JOHNSTON i sur., 2001., FRESHMAN, 2002.). Sjemeni kanalići sastoje se od vezivnotkivne ovojnice, bazalne membrane i zametnog epitela koji čine dvije vrste stanica, Sertolijeve stanice i stanice spermatogeneze (slika 1).



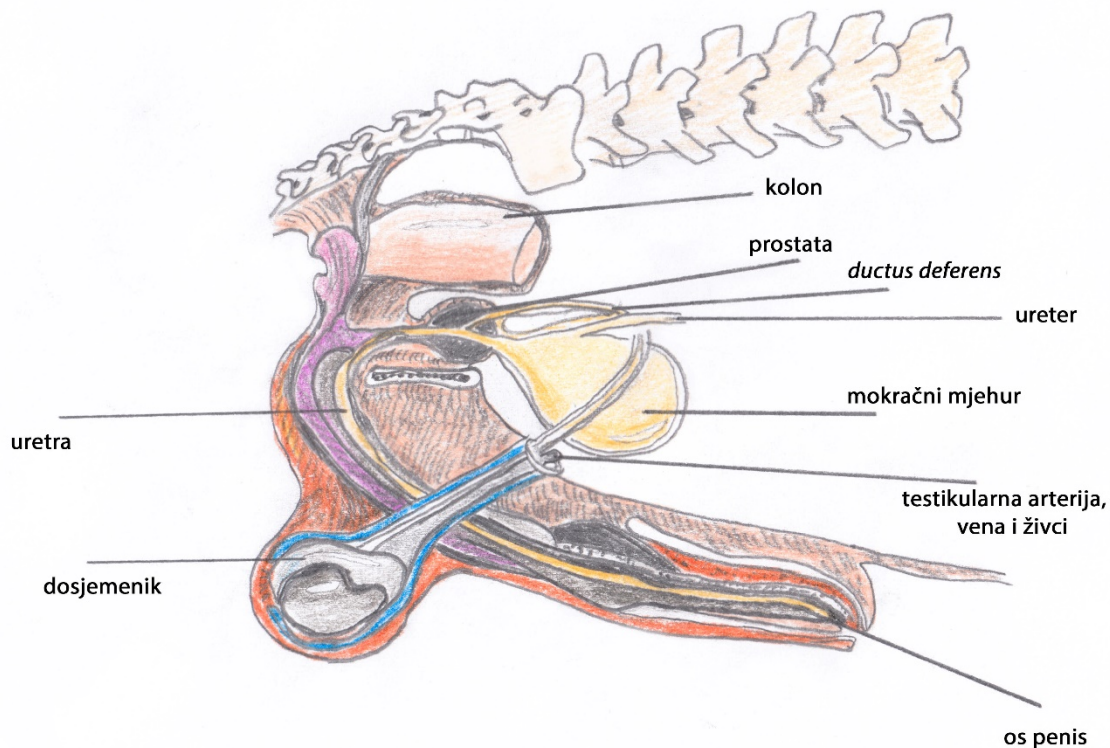
Slika 1. Anatomija testisa pasa (A. Šabanović)

Sertolijeve su stanice velike vretenaste stanice, manje brojne od spermatogonija, a nakon stimulacije FSH-om proizvode estrogene, inhibin, protein koji veže androgen (engl. *androgen binding protein* – ABP) i hranjive tvari koje pomažu preživljavanju spermija tijekom putovanja kroz tubule. Inhibin negativnom povratnom spregom djeluje na lučenje FSH (ROBINSON i NOAKES, 2019.). Otočići intersticijskog tkiva ili intersticijske (Leydigove) stanice smještene su u intersticiju s krvnim žilama i živcima između sjemenih kanalića. Leydigove stanice izlučuju muške spolne hormone (testosteron i druge androgene) iz sjemenih kanalića, spermiji zatim odlaze u parni organ dosjemenik (epididimis) gdje se potom spermiji skladište, sazrijevaju te dalje transportiraju u sjemenovod (lat. *vas deferens*). Tijekom sazrijevanja spermiji gube protoplazmatsku kapljicu te na osnovi nje razlikujemo zrele od nezrelih spermija.

Dosjemenici ili epididimisi sastavljeni su od zavijenih kanalića (lat. *ductus epididymis*) te su s testisima povezani fibroznim tkivom. Dosjemenik se sastoji od glave (lat. *caput epididymis*), tijela (lat. *corpus epididymis*) i repa (lat. *cauda epididymis*) koji se nastavlja duž dorzomedijalne površine kao sjemenovod (*ductus deferens*) te kroz ingvinalni kanal ulazi u abdomen i završava u dorzalnog dijelu prostate. Također je glavno mjesto skladištenja ejakulata. Glava dosjemenika sastoji se od izvodnih kanalića (lat. *ductuli eferentes*) koji izlaze iz *rete testis* i spajaju se u glavni kanal, *ductus epididymis*, koji potom prelazi u sjemenovod (lat. *ductus deferens*) (PROPADALO, 2019.). Spermiji prolaskom kroz epididimis dobivaju lipoproteinsku ovojnici koja ima zaštitnu ulogu od vanjskih utjecaja i daje im negativan električni naboj zbog čega se spermiji međusobno odbijaju, progresivno se gibaju te je spriječena njihova aglutinacija (GRINSWOLD, 2016.). Transport se dodatno poboljšava uz pomoć trepetiljkastog epitela od kojeg je građen epididimis, a sami spermiji postaju pokretljivi kada se pomiješaju sa sjemenom plazmom. Transport spermija dalje se odvija putem parnih organa, sjemenovoda koji se protežu dorzalno kroz *funiculus spermaticus*, potom prolaze kroz ingvinalni kanal sve do dugačke mišićno-sluznične cijevi uretre, odnosno mokraćnice (lat. *urethra masculina*). Uretra se proteže od vrata mokraćnog mjehura do glave penisa i završava s *orificium urethrae externum* te služi za odvod mokraće i sperme. Uretra je povezana s parnim otvorima sjemenovoda i okružena je akcesornom spolnom žlijezdom prostatom (lat. *glandula prostatica*).

Uloga prostate jest lučenje bistrog, vodeno-seroznog lužnatog sekreta koji je većinski dio treće frakcije ejakulata, a služi za pokretljivost spermija koji su do miješanja s ovim sekretom bili inaktivirani kiselim medijem epididimisa. Prostata psa reznjaste je strukture, podijeljena medijanom pregradom i obuhvaćena kapsulom koja se sastoji od glatkog mišićja i fibroznog vezivnog tkiva. Položaj i veličina prostate uvelike ovise o dobi, veličini i gojnom stanju psa te također i o postojanju moguće bolesti prostate, a ovisna je o androgenim hormonima (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.). Dva sjemena mjehurića (po jedan sa svake strane prostate) prazne se u prostatični kraj ampule. Sjemeni mjehurić vijugav je kanalić obložen sekrecijskim epitelom koji luči sluzavu tvar s obiljem fruktoze, limunske kiseline i drugih hranjivih tvari te veliku količinu prostaglandina i fibrinogena. Tijekom ejakulacije, oba sjemena mjehurića izliju svoj sadržaj u ejakulacijski kanal odmah poslije pražnjenja spermija iz sjemenovoda. Time se povećava količina ejakuliranog sjemena, a fruktoza i druge tvari u sjemenoj tekućini imaju važnu hranidbenu vrijednost za ejakulirane spermije. Sadržaj ampula i sjemenih mjehurića ulazi u ejakulacijski kanal koji prolazi kroz tijelo prostate i prazni se u unutarnju uretru. U ejakulacijski kanal ulijevaju se izvodni kanali prostate koji zatim odlaze u prostatični dio uretre. Uretra je završni dio veze između testisa i vanjske okoline. U uretru se ulijeva sluz iz velikog broja malih uretralnih žlijezda, smještenih uzduž cijele uretre te još više iz bilateralnih bulbouretralnih žlijezda (Cowperovih žlijezda), smještenih blizu početka uretre. Završni dio transporta spermija odvija se kroz muški kopulacijski organ, penis, koji u pasa ima kost (lat. *os penis*), koja održava rigidnost penisa tijekom prirodnog parenja, te ima *bulbus glandis* na anteriornom kraju penisa čija je uloga kopulacijsko vezanje tijekom parenja s obzirom na to da se bulbus napuni krvlju u erekciji (SAMARDŽIJA, 2006.) (slika 2).

Penis se sastoji od korijena (lat. *radix penis*), tijela (lat. *corpus penis*) i od glavića (lat. *glans penis*) koji proizlazi iz kavernoznog tijela uretre (lat. *corpus cavernosum urethrae*). Slobodni dio penisa prekriva dvostruka invaginacija kože koja se naziva prepucijem (lat. *preputium*) (JOHNSTON i sur., 2001., ROBINSON i NOAKES, 2019., VULJAK, 2021.).



Slika 2. Anatomija muškog spolnog sustava psa (A. Šabanović)

## 2.2. HORMONSKA REGULACIJA REPRODUKCIJSKIH FUNKCIJA U PASA

Reprodukcijska funkcija u pasa može se podijeliti u četiri glavne skupine:

- a) spermatogeneza odnosno stvaranje spermija u testisima
- b) sazrijevanje, transport i skladištenje spermija u epididimisu
- c) izvođenje spolnog akta
- d) regulacija reproduksijskih funkcija putem hormona.

S navedenim funkcijama povezani su i učinci muških spolnih hormona na akcesorne spolne žlijezde, stanični metabolizam, rast i druge funkcije u tijelu. Poznato je da stimulacija hormona hipofize potječe od sprege hipotalamus – hipofiza (ENGLAND, 2010.).



U hipotalamusu glavni odgovorni hormon, koji potiče aktivnost hormona hipofize koji sudjeluju u spolnim funkcijama, je peptidni hormon koji oslobađa gonadotropin (GnRH, engl. *gonadotropine releasing hormone*). Glavna mu je zadaća regulacija sekrecije FSH i LH iz adenohipofize. Po kemijskoj strukturi je dekaeptid, građen od 10 aminokiselina, a do danas je jedini poznati hormon koji ima sposobnost vezivanja hipofiznog receptora i stimulacije hipofiznih hormona FSH i LH. Njegov poluživot u plazmi je oko 4 minute (PETRAČ, 2015.). GnRH se luči na mahove tijekom nekoliko minuta, svakih jedan do tri sata. Osim pozitivne povratne sprege, moguća je i ona suprotna, negativna povratna sprega gdje postoji izravan učinak testosterona na hipotalamus kojim se smanjuje lučenje GnRH, što za rezultat ima smanjeno lučenje hormona prednjeg režnja hipofize. Zbog smanjenog lučenja GH, posebice LH, dolazi i do smanjenog lučenja testosterona (GUYTON i HALL, 2017.).

### 2.2.1. Hormoni hipofize

Fiziologija muških gonada u potpunosti je pod kontrolom hormona gdje najvažniju ulogu imaju hormoni hipofize, LH i FSH. Stoga na spolnu funkciju utječu hormoni prednjeg režnja hipofize (adenohipofize):

#### Gonadotropni hormoni

Oba gonadotropna hormona, LH i FSH, luče iste gonadotropne stanice koje se nalaze u adenohipofizi. Bez lučenja GnRH iz hipotalamusa, gonadotropne stanice u hipofizi gotovo uopće ne izlučuju glikoproteine LH i FSH.

#### Luteinizacijski hormon

Hormon LH glavni je poticaj na lučenje testosterona iz intersticijskih Leydigovih stanica. Lučenje luteinizacijskog hormona je ciklično kao i kod GnRH, odnosno LH prilično točno prati pulsirajuće izlučivanje GnRH. Izlučeni testosteron veže se na ABP u Sertolijevim stanicama te se time održava visoka koncentracija androgena (ROBINSON i NOAKES, 2019.).

### Foliklostimulacijski hormon

Poticanje spermatogeneze djelujući na pretvorbu spermatida u spermije odvija se uz pomoć FSH koji stimulira Sertolijeve stanice (ENGLAND, 2010.). Sertolijeve se stanice dijele tijekom fetalnog i prepubertalnog života ovisno o koncentraciji FSH te pružaju potporu, prehranu i zaštitu tijekom razvoja spermija. Djelovanjem FSH Sertolijeve stanice luče ABP koji održava visoku koncentraciju androgena, zatim estrogen, laktat, inhibin, transferin te tekućinu iz tubula. Inhibin svojom prisutnošću uzrokuje supresiju FSH negativnom povratnom spregom (ROBINSON i NOAKES, 2019.).

Istodobno testosteron i dihidrotestosteron koji u kanaliće difundira iz Leydigovih stanica u intersticijskim prostorima također ima snažan tropni učinak na spermatogenezu. Stoga su za započinjanje spermatogeneze potrebni i FSH i testosteron. Kada se spermiji ne stvaraju u sjemenim kanalićima, znatno se povećava lučenje FSH. Suprotno tome, kada je proces spermatogeneze prebrz, lučenje FSH iz adenohipofize se smanji. Smatra se da ulogu u navedenoj negativnoj povratnoj sprezi ima glikoproteinski hormon inhibin kojeg luče Sertolijeve stanice. Inhibin ima izravan i snažan učinak na adenohipofizu gdje koči lučenje FSH, a i slab učinak na hipotalamus gdje koči lučenje GnRH.

Izlučivanje FSH nije toliko podložno šiljcima GnRH, već se aktivnost mijenja polaganije tijekom više sati, prateći dugoročnije promjene izlučivanja GnRH (GUYTON i HALL, 2017.).

### Somatotropni hormon

U literaturi poznat kao hormon rasta čije lučenje također potječe iz adenohipofize, a potreban je za kontrolu temeljnih metaboličkih funkcija testisa. Ako postoji deficit hormona rasta u ranoj životnoj fazi, osim patuljastog rasta pasa, vrlo često će uzrokovati i neplodnost budući da potiče ranu diobu samih spermatogonija (GUYTON i HALL, 2017.).

### 2.2.2. Hormoni testisa

Testisi luče nekoliko muških spolnih hormona (androgeni hormoni) među kojima su testosteron, dihidrotestosteron i androstendion. Androgeni hormoni označuju bilo koji steroidni hormon koji ima maskulinizirajuće djelovanje, a mogu se sintetizirati iz kolesterola ili izravno iz acetil-koenzim A (GUYTON i HALL, 2017., SAMARDŽIJA i sur., 2018.).

#### Testosteron

Testosteron u embrionalnom razvoju najprije luče genitalni nabori, a zatim Leydigove stanice koje se nalaze u intersticiju testisa fetusa potaknute od LH. Stoga se količina testosterona koji se luči povećava razmjerno količini raspoloživog LH. Za vrijeme graviditeta, korionski gonadotropin posteljice također potiče testise fetusa na stvaranje umjerenih količina testosterona tijekom fetalnog razvoja i nekoliko tjedana nakon rođenja.

Taj je testosteron bitan za poticanje razvitka muških spolnih organa i nužan je za razvoj muških sekundarnih spolnih karakteristika, jačinu libida te za izražavanje spolnih refleksa. Također je odgovoran i za agresivno ponašanje i obilježavanje teritorija (CERGOLJ i SAMARDŽIJA, 2006.), stoga korionski gonadotropin djeluje na spolne organe gotovo jednako kao i LH.

Testosteron je nužan za rast i diobu zametnih stanica u testisu, za razvoj muških spolnih osobina, stvaranje penisa i skrotuma, razvoj prostate, sjemenih mjehurića i muških spolnih kanala te istodobno inhibira stvaranje ženskih spolnih organa. Testosteron je najvažniji i najzastupljeniji hormon testisa iako se velik dio ovog hormona u ciljnim tkivima, djelovanjem staničnog enzima 5-alfa-reduktaze, transformira u još aktivniji hormon dihidrotestosteron (GUYTON i HALL, 2017.). Testosteron iz Leydigovih stanica zaslužan je za održavanje visoke koncentracije androgena te stimulira spermatogenezu tako da normalno funkcioniranje Sertolijevih stanica ovisi o koncentraciji testosterona. Jednom kada se dosegne vrhunac u stvaranju spermatida, počinje lučenje inhibina koji negativnom povratnom spregom inhibira lučenje FSH. Ako postoje smetnje u radu hipotalamusa, dolazi do smanjenja koncentracije GnRH, a samim time i FSH i LH. Ako je smanjen ili inhibiran rad hipofize, to će uzrokovati smanjenje koncentracije gonadotropina, ali ne i GnRH. Ako je suprimiran rad gonada, koncentracije GnRH, LH i FSH su povećane, a androgene smanjene (ENGLAND, 2010.).

Kad se izluči iz testisa, većina testosterona (97 %) slabije se veže za albumin plazme ili čvršće za beta-globulin, odnosno globulin koji veže spolne hormone. U tom obliku testosteron cirkulira u krvi i do nekoliko sati te se za to vrijeme prenese u tkiva ili se razgradi u neaktivne proizvode koji se potom izluče. Veliki dio testosterona koji se pričvrsti u tkivima pretvara se unutar stanica u dihidrotestosteron, posebice u vanjskom spolovilu muškog fetusa i prostati odrasle jedinke.

Testosteron koji nije pričvršćen u tkivima brzo se u jetri pretvori u androsteron i dehidroepiandrosteron i istodobno se konjugira u glukuronide ili sulfate koji se izlučuju ili preko žuči u crijeva ili bubrezima u mokraću. Testosteron također povećava količinu koštanog matriksa i uzrokuje zadržavanje kalcija.

Vjeruje se da je povećanje koštanog matriksa posljedica općeg anaboličkog učinka testosterona na bjelančevine te odlaganja kalcijevih soli što je odgovor na povećanu količinu bjelančevina, posebice onih koje su odgovorne za stvaranje primarnih i sekundarnih spolnih osobina. Odgovor na anabolički učinak testosterona na bjelančevine je, također, povećanje intenziteta bazalnog metabolizma (GUYTON i HALL, 2017.).

### Estrogeni

Estrogeni su skupina steroidnih hormona, a izlučuju se u manjim količinama u razdoblju prije spolne zrelosti da bi im se tijekom spolne zrelosti količina povećala do 20 puta. Stvaraju se u obliku estradiola od testosterona u Sertolijevim stanicama, potaknuti FSH-om. Najvažniji estrogen jest hormon 17-beta-estradiol, a poznati su još estron, estriol i epistriol. Svi nastaju iz kolesterola i acetata, a tijekom djelovanja metaboliziraju jedni u druge. Hormon 17-beta-estradiol izlučuju jajnici i žuto tijelo, ali u manjim količinama i testisi i nadbubrežna žlijezda (GUYTON i HALL, 2017.). Koncentracija estrogena u tekućini sjemenih kanalića prilično je velika. Pretpostavka je da imaju važnu ulogu u spermiogenezi, a djeluju i na proliferaciju stanica i rast tkiva u svim organima vezanim uz primarna spolna obilježja i rasplodivanje. Također sudjeluju u procesima vezanim uz formiranje sekundarnih spolnih obilježja (SAMARDŽIJA i sur., 2010.). Mnogo veće količine estrogena stvaraju se iz testosterona i androstandiola u drugim tkivima, posebice u jetri (GUYTON i HALL, 2017.).

Estrogeni imaju brojne neugodne nuspojave, poput aplastične anemije uzrokovane supresijom koštane srži, endometritisom, piometrom, pseudogavidnošću te nastankom folikularnih cisti (ŠPOLJARIĆ i sur., 2018.), a kod muških životinja povišene koncentracije ovog hormona mogu prouzročiti sindrom feminizacije (SONG i sur., 2021.).

## 2.3.PATOLOGIJA REPRODUKCIJSKOG SUSTAVA MUŠKIH PASA

### 2.3.1. Kriptorhizam

Kriptorhizam označava poremećaj pri kojem se u doba rođenja testisi iz trbušne šupljine ne spuštaju u skrotum. Tijekom razvoja muškog fetusa testisi nastaju od spolnih nabora u trbušnoj šupljini. Tijekom šteneće faze testisi se kroz ingvinalne kanale normalno spuštaju u skrotum, odnosno u vrijeme kada počinje izlučivanje veće količine testosterona. No katkad se uopće ne spuste ili se ne spuste potpuno pa jedan ili oba testisa zaostaju u trbušnoj šupljini, u ingvinalnom kanalu ili negdje uzduž puta kojim se spuštaju. Zaostali testis u trbušnoj šupljini ne može stvarati spermije. Epitel kanalića s vremenom degenerira, a ostaju samo intersticijske tvorbe testisa. Temperatura, koja je nešto viša u trbušnoj šupljini u odnosu na onu u skrotumu, smatra se da je dovoljna da uzrokuje degeneraciju epitela kanalića pa tako i sterilnost. Lučenje testosterona iz fetalnih testisa normalan je podražaj za spuštanje testisa iz trbušne šupljine u skrotum. Stoga, u većini slučajeva, do kriptorhizma dolazi zbog abnormalne građe testisa zbog čega se ne može lučiti dovoljna količina testosterona. Kirurškom korekcijom kriptorhizma ne može se postići funkcionalni uspjeh, no suplementacija testosterona do trećeg mjeseca života šteneta može omogućiti spuštanje testisa kroz ingvinalni kanal u skrotum ako su testisi normalne građe te ako je ingvinalni kanal dovoljno širok. Nadomjestak testosterona koji za rezultat ima spuštanje testisa, dokaz je da je testosteron važan za razvoj muških spolnih osobina tijekom fetalnog života (GUYTON i HALL, 2017., ROBINSON i NOAKES, 2019.).

### 2.3.2. Bolesti prostate

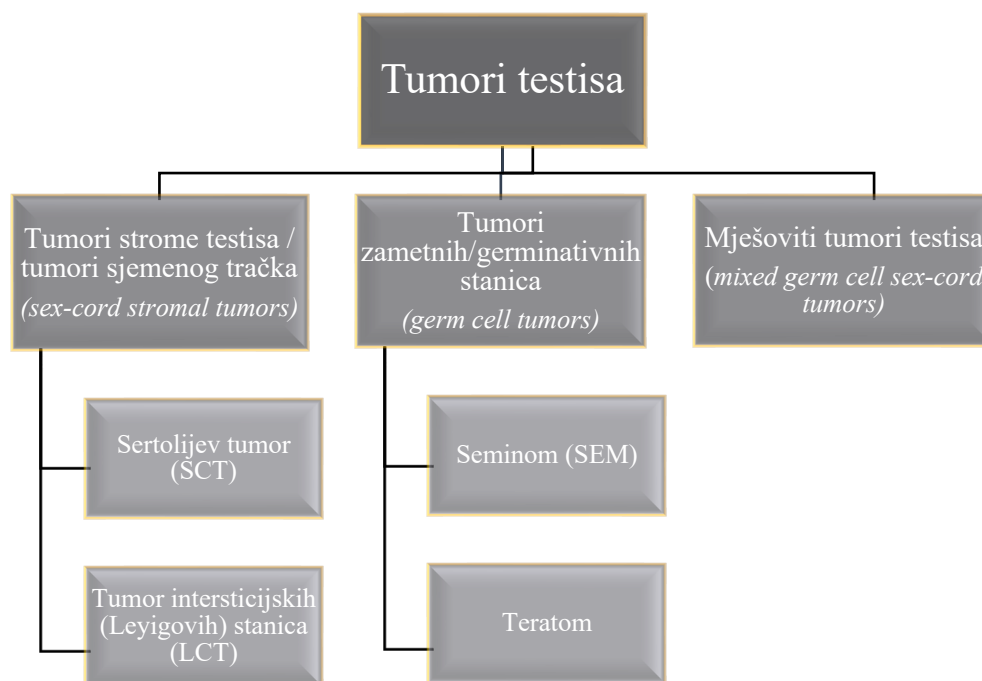
Veličina prostate ovisi o tjelesnoj masi i dobi životinje, a njezina sekrecija o androgenim hormonima. Kastracijom se pospješuje smanjenje volumena prostate, atrofija žljezdanih i vezivnotkivnih elemenata i smanjuje mogućnost proizvodnje i metaboliziranja androgena. Glavni androgen koji regulira rast prostate je 5-alfa-dihidrotestosteron koji se formira od testosterona. Treba uzeti u obzir navod da je prostata kod škotskih terijera fiziološki četiri puta veća nego kod ostalih pasa podjednake veličine (CAPAK i sur., 2012.).

Najčešća patologija prostate u pasa odnosi se na benignu hiperplaziju prostate, odnosno dobroćudno povećanje prostate čime se središnji dio prostate progresivno povećava. Hormonalni disbalans (nerazmjer androgena i estrogena) igra veliku ulogu u samom začetku bolesti. Starenjem se pojačava sinteza dihidrotestosterona, ali i sama prostata postaje osjetljivija zbog povećanja broja nuklearnih receptora za androgene. Do hiperplazije ne dolazi primarno zbog povećane mitotske diobe, već zbog smanjenja apoptoze stanica. Prvi simptom koji nastaje je pojava krvi u sekretu prostate, mokraći ili ejakulatu zato što dolazi do smanjenja sekrecijske sposobnosti prostate (COFFEY i sur., 1990.). Životinje s benignom hiperplazijom imaju često i dodatnu patologiju prostate kao što su intraprostaticke i ekstraprostaticke ciste, akutnu ili kroničnu upalu prostate (prostatitis), apsces prostate te, rjeđe, tumor prostate (adenokarcinom prostate i tumor prijelaznih stanica) koje mogu biti ovisne ili neovisne o androgenu (KAY, 2006., ADEL i KHADIDJA, 2017.).

### 2.3.3. Tumori testisa pasa

U starijih nekastriranih pasa često je zastupljena reproduktivna patologija (hiperplazija prostate, tumori testisa i kriptorhizam), a metoda izbora liječenja kod navedenih bolesti je orhiektomija koja se koristi i u svrhu prevencije nekontroliranog parenja. Tumori testisa su najčešći tip tumora reproduktivnog sustava muških pasa (čak u 90 % slučajeva), a inače su treći najčešći oblik tumora u pasa (nakon kožnih i fibroznih tumora). Primarni testikularni tumori histološki se klasificiraju kao tumori zametnih stanica (engl. *germ cell tumors*), tumori strome testisa/tumori sjemenog tračka (engl. *gonadostromalseks cord-stromal tumors*) i mješoviti tumori testisa (engl. M-CT – *mixed germ cseks-sex cord stromal tumors*).

Sertolijev tumor (SCT) i tumor Leydigovih stanica (LCT) histološki pripadaju tumorima sjemenog tračka, dok seminom (SEM) pripada tumoru zametnih stanica (HOHŠTETER, 2012., HOHŠTETER i sur., 2014., EFENDIĆ i sur., 2024.) što je vidljivo i na slici 3.



Slika 3. Grafički prikaz histopatološke podjele tumora testisa u pasa

Na temelju istraživanja utvrdilo se da je histopatološka pretraga objektivna dijagnostička metoda za razlikovanje tipova tumora testisa u pasa (MIHOKOVIĆ i sur., 2017.).

Autori HOLST i DREIMANIS (2015) koristili su podatke Norveškog registra tumora u pasa (*Norwegian Canine Cancer register*) i utvrdili da je od svih vrsta tumora kod muških pasa, 7,1 % je bila incidencija tumora testisa. Povećana prevalencija tumora testisa povezana s genetskim faktorom kao i predisponiranost neke pasmine. Malteški pas, pudl, shi-tzu, pomeranski špic i jorkširski terijer su pasmine za koje se smatra da imaju veći rizik nastanka tumora testisa, a od navedenih pasmina najčešća pojavnost kriptorhizma bila je u malteških pasa (LIAO i sur. 2009.).

Istraživanje autora ŠOŠTARIĆ i sur. (2013) navodi sličnu veličinu incidencije (7,97 %) pojavnosti tumora testisa u pasa u odnosu na ostale vrste tumora, dok LIAO i sur. (2009.) navode i dob, pasminu, kriptorhizam i vanjski utjecaj karcinogenih svojstava (fenoksi herbicid, dioksin, tetraciklin) kao utjecaj na veću pojavnost tumora testisa u pasa.

Kod ljudi, jedna najčešćih onkopatologija upravo su tumori testisa koje zahvaćaju dobnu skupinu muškaraca između 25 i 35 godina (POSASTIUC i sur., 2022.).

Prosječna starost pasa s dijagnozom tumora testisa je 10 godina, ali tumori testisa u kriptorhida se mogu pojaviti i ranije s prosjekom starosti od 7 do 8 godina (GOINATH i sur. 2009., LIAO i sur., 2009.).

U istraživanje autora EFENDIĆ i sur. (2021) bilo je uključeno 50 muških pasa koji su bili podvrgnuti orhiektomiji zbog reproduktivne patologije (hiperplazija prostate, kriptorhizam) ili kao elektivni zahvat. Na temelju kliničkog pregleda niti kod jedne životinje nije postavljena sumnja na tumor testisa. Rezultati histopatološke pretrage testisa bili su sljedeći: atrofija i/ili degeneracija testisa, zdravo testikularno tkivo, seminom, tumor Leydigovih stanica te mješoviti tumor testisa.

Prilikom elektivnih zahvata orhiektomije u pasa starijih od 6 godina pri više istraživanja dokazane su histopatološke promjene testikularnog tkiva. Naime, najčešći tip genitalnog tumora u muških starijih pasa upravo je testikularni tumor s najčešće zastupljenim sljedećim tipovima: LCT, SEM i SCT (HITOSHI i sur., 2014., HOHŠTETER i sur., 2014., HOLST i DREMAINS, 2015., EFENDIĆ i sur., 2023., SONG i sur., 2021.).

Teratomi su rijetki oblici tumora testisa u pasa (HOLST i DREMAINS, 2015.). Istraživanje LIAO i sur. (2009) govori o pojavnosti vrste tumora testisa te je raspodjela vrste tumora testisa bila: SEM, LCT, MGSCT, SCT, a prosječna dob pasa je bila 10.1 godina.

Najčešći tipovi tumora u kriptorhidnih testisa u istom istraživanju su bili MGSCT, SCT i SEM, dok je LCT bio rijetko prisutan.

Prema klasifikaciji tumora domaćih životinja Svjetske zdravstvene organizacije najzastupljeniji tumor testisa u pasa su tumori strome testisa (tumori sjemenog tračka), tumori zametnih stanica i MGSCT, a najzastupljeniji od navedenih podtipova su SCT i LCT.

Tumori testisa pasa obično se pojavljuju kao pojedinačni, ali se unutar jednog testisa mogu naći i multipli tumori (HOHŠTETER, 2012.).



Povećanim rizikom (14.3 %) za nastanak tumora testisa navodi se i kriptorhizam s dominantnom pojavnosti tumora SCT-a ili SEM-a, a češće je prisutan u desnom testisu (JOHNSTON i sur., 2001., GOPINATH i sur., 2009., LIAO i sur., 2009., HITOSHI i sur., 2014., HOLST i DREMAINS, 2015., SONG i sur., 2021.).

Psi s tumorom testisa češće nemaju kliničke znakove, ali prilikom kliničkog pregleda moguće je primjetiti promjene u konzistenciji i/ili veličini testisa koje najčešće idu u prilog tumorskom procesu. U slučaju ocjene ejakulata moguće je zamijetiti smanjenu i poremećenu spermatogenezu (HOLST i sur., 2015.).

SONG i sur. (2021) u prikazu slučaju zlatnog retrievera starog osam godina, nekastriranog bilateralnog kriptorhida s bilateralnim simetričnim alopecijama, ginekomastijom, hiperpigmentacijom na mjestu alopecija uz makularnu melanozu te s neregenerativnom normocitnom normokromnom anemijom navode da je potrebno je odrediti koncentraciju spolnih hormona (estrogen i testosteron) da se poveže klinička slika s hormonalnim poremećajem i postavi pretpostavka na tumor testisa. Konačna dijagnoza Sertolijeva tumora postavljena je na osnovi patohistološke pretrage. Isto tako, smatraju kako je puno značajnije mjerenje odnosa testosterona i estrogena u odnosu na mjerenje apsolutne vrijednosti estrogena kod pojave kliničkih znakova estrogenizacije kod muških pasa.

Provedeno je istraživanje (CAMARA i sur., 2014.) na 33 muška psa s patologijom testisa gdje su nakon orhiektomije uzeti uzorci *vas deferens* u svrhu evaluacije morfologije sjemena. Zaključak je istraživanja bio da su, nevezano za životnu dob ili pasminu, histološki potvrđene degeneracije testikularnog tkiva uzrokovale značajan porast odvojenih glava spermija.

Od rijetkih simptoma može se pojaviti sindrom feminizacije s ginekomastijom, kožna hiperpigmentacija i bilateralna alopecija uzrokovana lučenjem estrogena od strane tumora te eventualno pojava neplodnosti (GOPINATH i sur., 2009., PETERS i sur., 2000., HOHŠTETER, 2012., HITOSHI i sur., 2014., SONG i sur., 2021.).

Sindrom feminizacije pojavljuje se najčešće u pasa sa Sertolijevim tumorom (HITOSHI i sur., 2014.). Simptomi feminizacije opisani su najčešće kod pasa s SCT-om, a ponekad i s LCT-om i SEM-om (GOPINATH i sur., 2009.).

Tumori testisa rijetko imaju maligno biološko ponašanje (HOHŠTETER, 2012., HOHŠTETER i sur., 2014., EFENDIĆ i sur., 2021., EFENDIĆ i sur., 2024.), ali u slučaju pojave metastaza najčešće zahvaćena regija su ilijačni limfni čvorovi i pluća, ali mogu zahvatiti i bubrege, jetru, slezenu, nadbubrege te gušteraču (GOPINATH i sur., 2009., HOLST i DREMAINS, 2015., MIHOKOVIĆ i sur., 2017.). Prema nekim autorima kod pasa sa Sertolijevim tumorom metastaze se pojavljuju u manje od 15 % slučajeva (WITHERS i sur., 2016.).

Kod ljudi seminomi često imaju maligno ponašanje s visokim metastatskim potencijalom, dok su seminomi u pasa najčešće benignog biološkog ponašanja, ali u manje slučajeva postoji mogućnost metastaza (HOHŠTETER i sur., 2014.).

Hipoplazija koštane srži pojavljuje se kod pasa s SCT-om zbog hiperestrogenizacije i može se pojaviti puno ranije od ostalih spomenutih simptoma. Prognoza bolesti je nepovoljna u slučajevima gdje se razvije hipoplazija koštane srži (SHERDING i sur., 1981., GOPINATH i sur., 2009., WITHERS i sur., 2016., MARSHALL, 2018., SONG i sur., 2021.). Hipoplazija koštane srži i neregenerativna anemija pojavljuju se u 15 % pasa s SCT-om (HITOSHI i sur., 2014.).

Metoda protočne citometrije može pomoći u dijagnostici tumora testisa pasa, osobito ako se primjenjuje s histopatološkom pretragom. Protočnom citometrijom analiziraju se fizikalna svojstva stanica (veličina, oblik i zrnatost) kao i promjene u jezgri ili kariotipu stanica, broj mitoza, sadržaj DNK stanica, čime se procjenjuje heterogenost populacije stanica. Metoda protočne citometrije temelji se na mjerenju raspršenja svjetlosti i fluorescencije koja nastaje prolaskom suspenzije stanica kroz fokusiranu lasersku zraku. Na temelju navedene analize, moguće je odrediti u kojoj se fazi staničnog ciklusa nalazi određeni broj tumorski promijenjenih stanica (MIHOKOVIĆ i sur., 2017.).

a) Tumori strome testisa (tumori sjemenog tračka)

U njih se ubrajaju tumori SCT i LCT.

## Tumori Sertolijevih stanica

Tumori Sertolijevih stanica pojavljuju se u 50 % kriptorhidnih pasa, a razvijaju se iz potpornih stanica sjemenih tubula. Sindrom feminizacije pojavljuje se u oko 20 % slučajeva SCT-a, odnosno prisutan je estrogenski učinak koji može prouzročiti kliničke simptome u smislu alopecije ili hiperpigmentacije, feminizaciju, ginekomastiju, atrofiju kontralateralnog testisa, skvamoznu metaplaziju prostate s prostatitisom, alopeciju i atrofiju koštane srži (HOHŠTETER, 2012., SONG i sur., 2021.) kao i nastanak trombocitopenije ili anemije (JOHNSTON i sur., 2001.). Promjene u dlačnom pokrivaču se kod pasa s hiperestrogenizmom pojavljuju u obliku bilateralno simetričnih alopecija, atrofije epidermisa i dlačnih folikula. Keratinizacija pločastog epitela može biti izraženija zbog nakupljanja neutrofila i drugih upalnih stanica.

Ovi simptomi nestaju nakon kastracije, osim ako tumor nije metastazirao. Značajna AMH opisana je u pasa s SCT-om (HOLST i DREIMANIS, 2015.).

Gledajući SCT makroskopski, izgledaju kao tvrde, nodularne ili multinodularne proliferacije, nepravilnog oblika, a mogu biti i lobularni te su najčešće dobro ograničeni od ostatka zahvaćenog testisa i ne probijaju tuniku albugineju. U većini slučajeva zahvaćaju samo testis, no u slučaju malignog biološkog ponašanja, šire se u susjedne strukture tunike albugineje, epididimisa ili sjemenog užeta. Konzistencijom su znatno tvrdi od SEM ili LCT-a, a dijele se na osnovi histološkog izgleda u intratubularne ili difuzne oblike. Tvrdoća tumora je posljedica obilne strome, a histološki gledano mogu imati dva tipa (s invazijom ili bez invazije probijanja bazalne membrane) i difuzni oblik. U ranoj fazi i u dobro diferenciranih tumora stanice izgledaju kao normalne Sertolijeve stanice te su izdužene s malim okruglim do ovalnim jezgrama koje su tamne, bazofilne i smještene u pravilu bazalno. Citoplazma im je ili gusta ili vakuolizirana, eozinofilna te često sadržava lipokromne pigmentne granule. Kod slabije diferenciranih tumora stanice su također izdužene i imaju eozinofilnu citoplazmu, no jezgre su pleomorfne i izdužene te više nisu smještene bazalno (HOHŠTETER, 2012.).

Većina SCT-a je dobroćudna, no oko 10 – 15 % tumora je maligno. Metastaziranje je najčešće kod velikih tumora, a učestalost metastaziranja u tumora manjih od 2 cm je niska, osobito ako se terapiraju kastracijom. Biološko ponašanje difuznih histoloških oblika je češće maligno, dok su intratubularni oblici najčešće benigni. Metastaze su najčešće u regionalnim limfnim čvorovima sublumbalne ili zdjelčne regije i u unutrašnjim organima.

Metastatski čvorići imaju histološke karakteristike slične primarnim tumorima te također mogu biti hormonski aktivni. Prognoza u pasa s SCT-om je obično povoljna, ako nisu prisutne metastaze i/ili hipoplazija koštane srži. Ako dođe do hipoplazije koštane srži, smatra se da je smrtnost veća od 70 %. Životinje kod kojih je prisutna jaka trombocitopenija duže od dva tjedna, imaju slabiju prognozu (HOHŠTETER, 2012.).

#### Tumori intersticijskih (Leydigovih) stanica

Nastaju od intersticijskih stanica normalnog testisa te im histološki slične. Pojavljuju se obično kod starijih životinja, a postoje podaci da su LCT-i povezani s hiperplazijom prostate, tumorima prostate, perinealnim hernijama i tumorima perinealnih žlijezdi. Bez obzira na to što intersticijske stanice proizvode androgene hormone, a tumorske stanice proizvode još veće količine tih hormona, nema podataka da ovi tumori dovode do hiperandrogenizma. Rijetko kada ovi tumori uzrokuju sindrom feminizacije. Ultrazvučno se LCT obično vidi kao dobro ograničena hipohogena ili hiperhogena područja. Ovi tumori najčešće ne uzrokuju povećanje testisa, zbog svoje relativno male veličine (do 2 cm), no mogu uzrokovati promjenu oblika testisa, kao ispupčenja na površini malih, mekih i atrofičnih testisa. Histološki na presjeku su dobro ograničeni, ali nisu inkapsulirani ili su vrlo slabo inkapsulirani. Većina intersticijskih tumora benignog su biološkog ponašanja iako su opisani i maligni oblici (karcinom intersticijskih stanica). Prognostički gledano, u većini slučajeva kastracija dovodi do povoljne prognoze (HOHŠTETER, 2012.).

#### b) Tumori zametnih stanica

Tumori zametnih stanica nemaju veliku tendenciju hormonalne aktivnosti, ali ako se u njima razvije znatna količina tkiva posteljice, mogu lučiti velike količine hCG-a, hormona koji djeluje slično LH-u. Ovi tumori katkada luče estrogenske hormone (GUYTON i HALL, 2017.). U tumore zametnih odnosno germinativnih stanica spadaju SEM, teratomi, embrionalni karcinomi i karcinomi žumanjčanih vrećica. Kod domaćih životinja od navedenih, jedino se češće pojavljuju SEM, a vrlo rijetko teratomi (HOHŠTETER, 2012.).

## Seminomi

Seminomi često uzrokuju povećanje testisa s obzirom na to da mogu dostići veličinu i veću od 6 cm. Povećanje i bolnost testisa posljedica je intratubularnih krvarenja i nekroze. Seminomi su najčešće meke konzistencije, ponekad mogu biti i tvrdi, ali u manjoj mjeri u odnosu na SCT-e. Histološki se dijele na intratubularne i difuzne oblike. Mikroskopski gledano, najčešće se uz rub tumora mogu uočiti atrofični tubuli, a povremeno se u promijenjenom testisu mogu uočiti žarišta naglašene intratubularne spermatogonijske proliferacije. Kod ljudi se SEM pojavljuju češće u mlađih muškaraca te se uvijek smatraju malignim tumorima, dok u pasa češće imaju benigno biološko ponašanje, iako su metastaze češće kod SEM-a nego kod SCT-a i LCT-a. Različito biološko ponašanje u ljudi i pasa smatra se da je zbog različitog staničnog podrijetla.

Seminomi su histološki često lokalno invazivni te tumorske stanice infiltriraju okolne krvne žile ili tkivo tunike albugineje, epididimisa ili sjemenog užeta, što su jasni kriteriji maligniteta. Metastaze se kod pasa pojavljuju u manje od 10 % slučajeva. Metastaze najčešće zahvaćaju regionalne limfne čvorove, ali se pojavljuju i u plućima, jetri, slezeni, nadbubrežnoj žlijezdi, gušterači, središnjem živčanom sustavu, očima i u koži (HOHŠTETER, 2012.).

## Teratomi

Teratomi su građeni od više germinativnih slojeva. U pasa su iznimno rijetki (HOLST i DREMAINS, 2015.), a kod životinja se češće pojavljuju u pastuha kriptorhida između prve i pete godine života, što upućuje na mogućnost kongenitalnog razvoja. Razvoj ovog tumora u testisu može onemogućiti normalno spuštanje testisa, a može uzrokovati i povećanje testisa. Histološki im izgled varira. Tkivo testisa uz teratom obično pokazuje različite stupnjeve tubularne atrofije te je reducirana spermatogeneza. Teratomi mogu biti benigni, pojavljuju se češće, ili maligni (teratokarcinomi) koji kasnije postaju nediferencirani teratomi sa zrelim i embrionalnim elementima (HOHŠTETER, 2012.).

### c) Mješoviti tumori testisa

Da bi histološki proglasili MSCT, tumor treba zadovoljavati kriterije da sadržava dva ili više tipa tumora koja potječu od stromalnog ili intersticijskog tumora u jednom testisu, a sastoje se od usko povezanih zametnih i Sertolijevih stanica, ali ne i od intersticijskih stanica (CAMARA i sur., 2014.). Ovi se tumori u pravilu nazivaju kolizijskim tumorima jer predstavljaju spajanje dvaju različitih tumora. Mješoviti tipovi tumora imaju značajke SEM-a i SCT-a unutar jednog tumora odnosno testisa. Ovaj oblik tumora najčešće se pojavljuje u pasa, a rjeđe u pastuha. Biološko ponašanje slično je SEM-u ili SCT-u te u pravilu ne dovode do hiperestrogenizma (HOHŠTETER, 2012., EFENDIĆ i sur., 2024.).

## 2.4.SERUMSKI BILJEZI TUMORA TESTISA

Vrlo su važna istraživanja vezana uz mjerenja serumske koncentracije hormona u kriptorhidnih pasa koje su uspoređivane sa skupinom pasa s tumorom testisa i sa psima koji imaju zdrave testise. Istraživanja su najčešće bazirana na AMH-u, INSL3 te nešto manje zastupljena istraživanja na testosteronu i 17-beta estradiolu (GOPINATH i sur., 2009., HITOSHI i sur., 2014., HOLST i DREMAINS, 2015., HOLLINSHEAD i sur., 2016., HORNAKOVA i sur., 2017., WALTER, 2020., SONG i sur., 2021., EFENDIĆ, 2023., EFENDIĆ i sur., 2024.).

Važno istraživanje HORNAKOVA i sur. (2017) uključivalo je mjerenje serumske koncentracije testosterona, 17-beta estradiola i AMH u krvi gdje je zaključak istraživanja, među ostalim, bio da kod kriptorhida AMH može biti specifičan biomarker za SCT kao i funkcionalan marker za dokazivanje funkcionalnog kriptorhidnog testisa. Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost distinkcije između kriptorhizma i tumora testisa u pasa. Zaključak istraživanja su očekivane vrijednosti za kriptorhide: značajno niža koncentracija testosterona, značajno viša koncentracija AMH i 17-beta estradiola usporedno sa zdravom skupinom. Još jedan od zaključaka njihovog istraživanja vezan je uz tvrdnju da bi AMH mogao biti potencijalni biomarker u distinkciji kastriranih i kriptorhidnih pasa.

Utvrđeno je postojanje negativne korelacije između testosterona i AMH u muškaraca time što testosteron suprimira produkciju AMH iz Sertolijevih stanica (THEMMEN i sur., 2016.)

#### 2.4.1. Biljeg anti-Müllerov hormon

Anti-Müllerov hormon je multifunkcionalni citokin, odnosno glikoprotein koji luče Sertolijeve stanice u muških pasa, u kuja granuloza stanice, a inhibira aktivnost aromataze i transformaciju androgena u estrogene (HITOSHI i sur., 2014., WALTER, 2020.). U literaturi se još naziva i *Müller inhibirajuća supstanca* ili *inhibirajući faktor*, a pripada skupini transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- $\beta$ ) koji regulira mnoge aspekte fiziološke embriogeneze i homeostaze tkiva i uključen je u patofiziološke mehanizme mnogih bolesti (TZAVLAKI i MOUSTAKAS, 2021.).

U muških jedinki AMH sudjeluje u spolnoj diferencijaciji na način da ima ulogu u indukciji regresije Müllerovih kanala tijekom embriogeneze (BANCO i sur., 2012., HITOSHI i sur., 2014.) te time sprječava razvoj ženskih spolnih organa (THEMMEN i sur., 2016.).

U odraslih muškaraca lučenje AMH ne prestaje, ali se završetkom puberteta smanjuje kao u goveda i konja. U muških pasa ekspresija AMH započinje tijekom fetalne spolne diferencijacije te se nastavlja kroz pubertet (HITOSHI i sur., 2014.). U postpubertalnom periodu muških sisavaca, AMH ima ulogu u regulaciji testosterona iz Leydigovih stanica (THEMMEN i sur., 2016.).

U žena AMH se ne luči iz fetalnog jajnika osiguravajući tako intaktne Müllerove kanale koji se potom razvijaju u vanjski epitel jajnika, jajovod, maternicu s cerviksom i kranijalni dio vagine (HITOSHI i sur., 2014., THEMMEN i sur., 2016.). Tijekom folikulogeneze, nakon rasta primordijalnog folikula, granuloza stanice folikula počinju proizvoditi AMH i nastavljaju s lučenjem do faze selekcije folikula kada FSH preuzima daljnju ulogu. Anti-Müllerov hormon ima dvojaku funkciju u fiziologiji jajnika. Prva funkcija je negativna povratna sprema na primordijalne folikule jajnika čime vrši signalizaciju o postojanju dovoljnog broja odnosno zalihe primordijalnih folikula, a druga funkcija vezana je uz supresiju osjetljivosti folikula na FSH sudjelujući tako u selekciji folikula. Anti-Müllerov hormon je dobar biomarker u ljudi kao pokazatelj reproduktivnog statusa, odnosno koristi se u dokazivanju prisutnosti testikularnog tkiva u pacijenata s poremećajem u seksualnom razvoju, a kod žena kao dobar pokazatelj starenja jajnika i rezerve jajnih stanica. Serumaska koncentracija najčešće se određuje u postupcima medicinski potpomognute oplodnje te se time AMH smatra najranijim serumskim biljegom biološke starosti jajnika (THEMMEN i sur., 2016.).

HOLST i DREMAINS (2015) navode da psi s SCT-om imaju 10 do 1000 puta veću serumsku koncentraciju AMH u odnosu na zdrave pse s drugim testikularnim patologijama. Ovim istraživanjem postavilo se dobro uporište za AMH kao koristan biomarker kod pasa s SCT-om.

GHARAGOZLOU i sur. (2014) objavljuju značajnost više koncentracije serumskog AMH u bilateralnih kriptorhidnih pasa i pasa s normalnim testisima u odnosu na kastrirane pse.

Sličnu hipotezu postavili su u svom istraživanju na psima THEMEN i sur. (2016) gdje su mjerili vrijednost AMH iz seruma i plazme kod kastriranih i intaktnih mužjaka te su također određivali vrijednosti kod kastriranih i intaktnih ženki. Rezultat istraživanja bio je da AMH ima visoku specifičnost (100 %) i osjetljivost (90 %) u kuja te dobru specifičnost (100 %) i osjetljivost (76 %) kod mužjaka u svrhu procjene reproduktivnog statusa. Nadalje, autori su odredili graničnu vrijednost koncentracije AMH koja za kuje iznosi 1,1 ng/ml, dok za mužjake iznosi 5,5 ng/ml.

BANCO i sur. (2012) smatraju da je razlog višoj serumskoj koncentraciji AMH u kriptorhida zbog povećane količine nezrelih Sertolijevih stanica u tim gonadama, a upravo je AMH rani specifični protein koji se luči iz Sertolijevih stanica tijekom sazrijevanja testisa. Ovu pretpostavku potvrdili su HITOSHI i sur. (2014) u prikazu slučaja psa s SCT-om kod kojeg je zabilježena viša serumska koncentracija AMH u odnosu na dva kastrirana i dva nekastrirana psa. Također su mjerili i serumsku koncentraciju estradiola koje je bila značajno visoka kod psa s SCT-om, a 4 mjeseca nakon kastracije koncentracija estradiola bila je niža.

HOLST i DREMAINS (2015) postavili su granicu serumske koncentracije AMH usporedbom kontrolne skupine (zdravi psi, N = 27) u odnosu na pse s tumorom testisa (N = 20) (palpatorno određivanje). U kontrolnoj skupini serumska koncentracija AMH iznosila je  $\leq 10$  ng/mL, a psi s SCT-om imali su koncentraciju AMH  $> 22$  ng/mL, što je dalo je jasne smjernice u određivanju koncentracije serumskog AMH u svrhu dijagnostike SCT-a. Zaključak istraživanja bio je da je najniža koncentracija bila kod zdravih pasa, dok je u pasa s SCT-om koncentracija bila iznimno visoka. Daljnja opsežnija istraživanja su potrebna radi uspostavljanja referentne vrijednosti AMH.

HOLLINSHEAD i sur. (2016) proveli su istraživanje u svrhu postavljanja referentnih vrijednosti serumskog AMH u uzgojnih kuja u svrhu postavljanja prediktornog faktora veličine legla. Budući da je istraživanje provedeno na velikom broju uzgojnih i kastriranih kuja (N = 155) po prvi put su se odredile jasne referentne serumske vrijednosti AMH za uzgojne kuje koje su iznošile 2.9 - 21.1 ng/ml.



Zaključak je da u kastriranih kuja serumska koncentracija AMH nije prelazila vrijednost od 0.2 ng/ml. Kuje s višim vrijednostima AMH u serumu su imale veći broj štenaca u leglu u odnosu na one s nižom koncentracijom AMH u serumu.

Nadalje, KHAN i sur. (2018) postavljaju tezu da je serumski AMH dobar marker za diferencijalnu dijagnostiku kriptorhizma pasa, ali su potrebna daljnja istraživanja na većem broju pasa. WALTER (2020) navodi da određivanjem serumske koncentracije AMH možemo diferencirati kastrirane pse i mačke u odnosu na intaktne. Navodi da je značajno manja serumska koncentracija AMH u kastriranih jedinki. Također se opisuje značajno viša serumska koncentracija AMH u unilateralnih ingvinalnih kriptorhida u usporedbi s kastriranim i intaktnim psima.

GHARAGOZLOU i sur. (2014) objavljuju značajnost više koncentracije serumskog AMH u bilateralnih kriptorhidnih pasa i pasa s normalnim testisima u odnosu na kastrirane pse, međutim treba uzeti u obzir da je istraživanje rađeno na relativno malom broju uzoraka te je potrebno daljnje istraživanje provesti na većem broju uzoraka i različitim tipovima kriptorhida u cilju determinacije AMH-a kao korisnog biomarkera za diferencijalnu dijagnozu kriptorhizma u pasa.

Isto tako, biomarker AMH koristi se kao *fertility marker* u kuja, za detekciju tumora Sertolijevih stanica kod muških pasa i tumora granuloza stanica u kuja. (BANCO i sur., 2012., GHARAGOZLOU i sur., 2014., HITOSHI i sur., 2014., THEMME i sur., 2016., YAGCI i sur., 2016., KHAN i sur., 2018., WALTER, 2020.).

Po pitanju odabira vrste ELISA kita, za određivanje serumske vrijednosti AMH govori više istraživanja. Zaključak istraživanja YAGCI i sur. (2016) bio je da se humanim ELISA kitom upješno detektirao pad AMH-a poslijeoperacijski u odnosu na vrsno specifični pseći koji nije detektirao značajnu razliku u vrijednostima prije i nakon ovarijehisterekтомije (OHE).

PLACE i sur. (2011) istraživao je koncentraciju AMH u serumu pasa i mačaka na temelju humanog ELISA kita. Na koncentraciju AMH u serumu utječe nekoliko faktora kao što su starost životinje, faza spolnog ciklusa, veličina psa i pasmina kao i odabir tipa analize određivanja vrijednosti AMH (HOLLINSHEAD i sur., 2016., WALTER, 2020.).

Isto tako, na serumsku koncentraciju AMH može utjecati tjelesna masa jedinke, a vrijednost AMH iz heparinske plazme je viša u usporedbi s vrijednostima dobivenim iz uzorka seruma.

Autori zaključuju da mjerenje serumske koncentracije AMH putem ELISA analize ima puno višu specifičnost i osjetljivost kod ELISA analize specifičnog za pse (*canine-specific ELISA*) u odnosu na humano specifičnu ELISA analize (*human-based ELISA*) (PLACE i sur., 2011., HOLLINSHEAD, 2016.). HOLLINSHEAD (2016) ističe da serumska AMH koncentracija u gigantskih pasmina pasa je niža u usporedbi s manjim pasminama.

#### 2.4.2. Biljeg faktor 3 sličan inzulinu

Biljeg faktor 3 sličan inzulinu ekspresija više je vezana uz kriptorhizam, ali u tim istraživanjima nisu rađene eventualne histopatološke detekcije tumora testisa kod istraživanih kriptorhidnih jedinki. HANNAN i sur. (2015) navode veću ekspresiju INSL-3 i INSL-3 peptida u tkivu abdominalnih kriptorhidnih testisa u odnosu na normalne i kriptorhide s testisima u skrotumu. Pretpostavka je da INSL-3 ima veliku ulogu u prvoj fazi spuštanja testisa tijekom fetalnog razvoja (IVELL i sur., 2013.). PATHIRANA i sur. (2012) navode značajno manju vrijednost plazmatske koncentracije testosterona i INSL-3 u bilateralnih kriptorhidnih pasa u odnosu na unilateralne kriptorhide i pasa s normalnim testisima, a između pasa s normalnim testisima i unilateralnim kriptorhidima nema razlike u koncentraciji navedenih markera.

#### 2.4.3. Biljeg testosteron

Testosteron je najvažniji prirodni androgen uz androsteron i dihidroandrosteron, a primarno je muški spolni hormon. U testisima i nadbubrežnim žlijezdama androgeni se mogu sintetizirati iz kolesterola ili izravno iz acetil-koenzima A (GUYTON i HALL, 2017., SAMARDŽIJA i sur., 2018.).

Autori MATTEEUWS i COMHAIRE (1989) napravili su istraživanje na psima (unilateralni ingvinalni kriptorhidi N = 13, unilateralni abdominalni kriptorhidi N = 9, intaktni mužjaci N = 36) gdje su mjerili testosteron i estradiol iz plazme periferne krvi i spermatične venske krvi. Dobiveni rezultati su ukazali da nema velike promjene u koncentracijama navedenih hormona između skupina.

Istraživanje vezano uz koncentracija 17-beta estradiola i testosterona iz krvne plazme rađeno je u svrhu postavljanja referentnih vrijednosti s obzirom na prisutnu patologiju testisa.

Istraživane skupine bili su psi s LCT-om (N = 20), SCT-om (N = 6), SEM (N = 9), unilateralni ingvinalni kriptorhidi (N = 7), abdominalni kriptorhidi (N=9), degeneracijom testisa (N = 6) i zdravi intaktni mužjaci (N = 20). Stoga su rezultati istraživanja ukazali na povišenu vrijednost estradiola kod SCT-a (14,4 – 48,3 pg/mL), dok je kod pasa sa seminom koncentracija bila niža te je postavljena vrijednost od 3,4 – 17,6 pg/mL u usporedbi sa zdravim psima gdje je postavljena referentna vrijednost za estradiol iz plazme 8,6 – 31,5 pg/mL. Kod pasa s SCT-om, koncentracija testosterona bila je smanjena te se kretala od 0,03 – 0,77 ng/mL u odnosu na kontrolnu zdravu skupinu gdje je koncentracija iznosila od 0,05 – 3,70 ng/mL. Omjer estradiola i testosterona samo je bio promijenjen u skupini pasa s SCT-om, a vrijednosti su iznosile od 0,06 – 2,80, dok je u kontrolnoj skupini vrijednost bila od 0,58 – 35,8. Zaključak istraživanja bio je među ostalim da se kod pasa sindrom feminizacije povezuje s padom omjera estradiola i testosterona ispod referentne vrijednosti koja je postavljena u kontrolnoj skupini, a ne direktno s povišenjem 17-beta estradiola (MISCHKE i sur., 2002.).

#### 2.4.4. Biljeg 17-beta estradiol

PETERS i sur. (2000) dokazali su povišenu vrijednost 17-beta estradiola u perifernoj krvi kod pasa s SCT-om, a još veća koncentracija hormona bila je zastupljena u pasa sa sindromom feminizacije. Postavljena je teorija da se feminizacija ne pojavljuje zbog apsolutno povišene vrijednosti 17-beta estradiola već da je klinička manifestacija povezana s padom omjera testosterona i estradiola (GOPINATH i sur., 2009.).

GOPINATH i sur. (2009) dokazali su postojanje estrogenizacije kod 7 godina starog labrador retrievera koji je imao kliničke znakove feminizacije uslijed SCT-a s plućnim metastazama. Autori su mjerili koncentraciju 17-beta estradiola koja je u serumu bila povišena te su istu uspoređivali s koncentracijom hormona iz tekućine dobivene punkcijom plućne lezije u trenutku lobektomije gdje je vrijednost također bila povišena, čime su dokazali da i iz metastatskih lezija postoji znatna produkcija 17-beta estradiola.

Drugi prikaz slučaja (WITHERS i sur., 2016.) također na labrador retrieveru, 9 godina starom unilateralnom ingvinalnom kriptorhidu, govori o Sertolijevom tumoru koji je lučio velike količine estrogena (serumska koncentracija estradiola prijeoperacijski iznosila je 145 pg/mL, a

autori uzimaju referentnu vrijednost za intaktnog muškaka od 10 do 30 pg/mL) te je time uzročno-posljedično nastala hipoplazija koštane srži dokazana citološkim nalazom aspirata koštane srži. U trenutku orhiektomije i dijagnostičke laparotomije uočene su metastaze intraabdominalnih limfnih čvorova. Koncentracija estradiola 12 dana poslijeoperacijski znatno je pala te je bila u referentnim vrijednostima, no 75. dan poslijeoperacijski koncentracija je ponovno narasla na 56 pg/mL uz potvrđene dodatne metastaze na abdominalnim limfnim čvorovima, slezeni, kaudalnom polu bubrega, aorti i kaudalnoj šupljoj veni. Životinja je eutanazirana zbog klinički lošeg stanja nakon 166 dana od operacije.

## 2.5. IMUNOHISTOKEMIJSKI BILJEZI TUMORA TESTISA

Na testisima pasa, za razliku od testisa muškaraca, provedeno je relativno malo istraživanja imunohistokemijskih biljega, a ona koja su i provedena, temeljila su se na relativno malom broju uzoraka. Određeni imunohistokemijski markeri (biomarkeri) koriste se za diferencijaciju humanih tumora testisa, a neki od njih su istraživani i na psima, kao što su AMH, Ki-67, E-kadherin, GATA-4, cytokeratin, inhibin- $\alpha$ , OCT3/4, PGP 9.5, dezmin i vimentin (HOHŠTETER, 2012., BANCO i sur., 2012., HOHŠTETER i sur., 2014.).

PAPAIOANNOU i sur. (2009) proveli su istraživanje na imunohistokemijskoj ekspresiji biomarkera TERT, PCNA, ki67 I p53 u pasa s tumorom testisa, a POSASTIUC i sur. (2022) istraživali su i INSL-3, alfa-fetoprotein, laktat dehidrogenaza, c-KIT i CD-30.

### 2.5.1. Biljeg anti-Müllerov hormon

U humanoj medicini imunohistokemijska ekspresija AMH u muškaraca se koristiti u svrhu dijagnostike atrofije testisa što može rezultirati s tumorima testisa i koristi se kao imunohistokemijski biomarker za Sertolijev tumor testisa (WALTER, 2020.).

U veterinarskoj medicini nema puno istraživanja na imunohistokemijskoj ekspresiji AMH u pasa s tumorima testisa. BANCO i sur. (2012) procjenjivali su imunohistokemijsku ekspresiju AMH od strane Sertolijevih stanica tijekom dvije faze: testikularnog sazrijevanja i transformacije u tumor.

Zaključak istraživanja je bio da su fetusi, neonatalni štenci i štenci do 45 dana starosti pokazivali imunohistokemijsku ekspresiju AMH, dok kod starijih štenaca i odraslih jedinki nije bilo ekspresije AMH. Svi psi s tumorom Sertolijevih stanica imali su imunohistokemijsku ekspresiju AMH, što ukazuje da je AMH koristan marker nezrelih i tumorskih Sertolijevih stanica u pasa.

### 2.5.2. Biljeg Ki-67

Monoklonsko protutijelo Ki-67 jest protein stanične jezgre koji je dobar pokazatelj proliferacije tumorskih stanica imunohistokemijskom metodom, stoga se često naziva i proliferacijskim biljekom. Prvi je put otkriven 1983. godine u stanicama Hodgkinova limfoma u ljudi. Funkcija ovog proteina nije do kraja razjašnjena, ali smatra se da funkcionira kao surfaktant, stabilizirajući kromosome tijekom mitoze i time osiguravajući jednostavno odvajanje kromosoma i uspješnu interakciju s mitotskim diobenim vretenom (ESTALLER i sur., 2022.). Tijekom interfaze nalazi se isključivo u jezgri, dok se tijekom mitoze većina proteina prenese na površinu kromosoma. Biljeg Ki-67 prisutan je za vrijeme svih aktivnih faza staničnih ciklusa osim u G<sub>0</sub>-fazi odnosno u fazi mirovanja (ESTALLER i sur., 2022.). Često se primjenjuje u medicini za dokazivanje ekspresije kod karcinoma dojke u žena u svrhu procjene gradusa tumora uz histopatološku analizu (PLAVETIĆ i sur., 2013.). Proliferacijski indeks najčešće je definiran kao postotak pozitivnih jezgri na 1000 tumorskih stanica (DOWSETT i sur., 2011.). U medicini se smatra da postotak pozitivnih tumorskih stanica na Ki-67 korelira s terapijskim učinkom i prognozom kod pacijenata s tumorskim procesom, a ponajviše se dokazivanje ekspresije koristi u pacijenata s karcinomima prostate i dojke, tumorima mozga te kod neuroblastoma i neuroendokrinih tumora (ESTALLER i sur., 2022.).

U veterinarskoj medicini HOHŠTETER (2012) je dokazao da stanice SEM-a u više od 50 % eksprimiraju kalretinin i Ki-67 protutijela.

Postoji i znatno manje istraživanja na serumskoj ekspresiji tumorskog markera Ki-67 u medicini te je dokazano da pacijenti s malignim karcinomom dojke imaju više serumske vrijednosti Ki-67 uspoređujući ih s kontrolnom skupinom koja je bez malignih oboljenja (REN i sur., 2020.).

ESTALLER i sur. (2022) dokazivali su prisutnost serumskog Ki-67 kao prediktornog biljega za malignost u pasa s tumorima (karcinomi N = 35, sarkomi N = 26, limfomi N = 21), koristeći se ELISA kitom, a rezultat istraživanja doveo je do zaključka da je postojala značajna razlika u serumskoj koncentraciji Ki-67 između skupina tumora u odnosu na kontrolnu zdravu skupinu pasa, čime su autori potvrdili svoju hipotezu da serumski biomarker Ki-67 ima dobar potencijal kao tumorski biljeg dajući informacije o postojanju malignosti u pasa. S druge strane, nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji KI-67 između različitih skupina tumora.

### 2.5.3. Ostali imunohistokemijski biljezi tumora testisa

Sertolijeve stanice su jedine stanice testisa čija je citoplazma imunohistokemijski izrazito pozitivna na neuron specifičnu enolazu, a isto tako se difuzno boji vimentinom. U većini slučajeva tumorske stanice su pozitivne na E-kadherin, GATA-4, citokeratin i inhibin- $\alpha$ , dok su OCT3/4, PGP 9.5 i dezmin imunohistokemijski negativni, dok su kalretinin, Ki-67, KIT i melan A u nekim istraživanjima bili pozitivni iako su u većini slučajeva negativni (BANCO i sur., 2012., HOHŠTETER, 2012.). Provedena su istraživanja uz primjenjivost imunohistokemijskih biomarkera (c-KIT, PLAP, citokeratin i CD30) kod pasa s tumorima testisa (HOHŠTETER, 2012., HOHŠTETER i sur., 2014.). Istraživanja na citokeratinu u veterinarskoj medicini govore o izostanku imunoreaktivnosti na citokeratin u SEM, dok je dokazana ekspresija najčešće kod SCT i mješovitih SCT tumora, a rijetko u LCT. Citokeratin pokazao se kao dobar biomarker za diferencijaciju tumora strome testisa od tumora zametnih stanica testisa. Biomarker CD30 pokazao je nisku ekspresiju za razliku od istraživanja u humanoj medicini. Naime, pokazala se značajna ekspresija kod ljudi u mješovitim testikularnim embrionalnim karcinomima, a potom je potvrđena ekspresija navedenog biomarkera i kod pasa s embrionalnim karcinomom.

Kod tumora zametnih stanica, odnosno kod SEM-a, c-KIT pokazao je pozitivnu imunohistokemijsku ekspresiju, a biomarker PLAP je pokazao također pozitivnu imunohistokemijsku ekspresiju kod SEM-a u pasa (HOHŠTETER, 2012., HOHŠTETER i sur., 2014.).

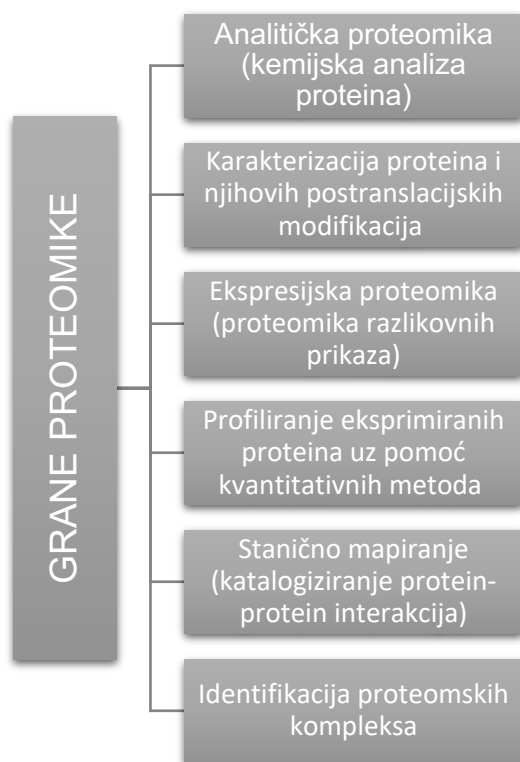
Malo je istraživanja o provedenoj imunohistokemijskoj analizi tumora intersticijskih stanica testisa, a njihovi rezultati su međusobno oprečni. HOHŠTETER (2012) navodi istraživanje u kojem su LCT-i pokazivali visoku imunoreaktivnost na vimentin i melan A, umjerenu na inhibin- $\alpha$  i kalretinin, a slabu na S100 protein i Ki-67, dok nisu pokazivali imunoreaktivnost OCT 3/4, citokeratine, dezmin, KIT i neka druga protutijela. Za razliku od navedenog istraživanja, postoji i navod gdje su svi uzorci LCT-a bili pozitivni na c-KIT. Suprotno od SEM-a i SCT-a, LCT-i nikada nisu pozitivni na laminin, osim bazalnih membrana oko krvnih žila (HOHŠTETER, 2012.).

## 2.6. ISTRAŽIVANJE PROTEOMA I RAZVOJ PROTEOMIKE

Proteini su biološke molekule koje djeluju u svakom procesu unutar stanice. Sveukupni komplement proteina kojeg eksplicira stanica, tkivo ili organizam naziva se proteom (eng. proteome, protein complement of the genome). Za razliku od genoma koji ostaje konzerviran tijekom cijelog života, proteom je dinamičan i složen sustav podložan kvalitativnim i kvantitativnim promjenama (GRAVES i HAYSTEAD, 2002.). Kako bismo potpuno razumjeli biološki sustav, osim genomskih i transkriptomskih analiza, važna je i proteomska analiza (VUČINIĆ, 2014.). Godine 1995. prvi puta se spominje izraz „proteomika“, a definiran je kao opsežna karakterizacija i analiza ekspresije gena i cijelog seta proteina koji se nalaze u stanicama, tkivu ili organizmu pod nazivom proteom (WASINGER i sur., 1995.). Proteomika je znanost koja se bavi proučavanjem proteina omogućujući njihovu identifikaciju i kvantifikaciju u stanicama, tkivima i biološkim tekućinama, analizu promjene proteinske ekspresije u zdravim i bolesnim stanicama, karakterizaciju poslije-translacijskih modifikacija i proučavanje protein-protein interakcija (AEBERSOLD i MANN, 2003.). Cilj proteomike nije isključivo identifikacija svih proteina u stanici, nego i prikaz njihove međusobne povezanosti (GRAVES i HAYSTEAD, 2002.).

Zbog složenosti i varijabilnosti proteomski pristup mora biti selektivan i osjetljiv, s obzirom na to da su proteini nositelji svih životnih funkcija unutar organizma te imaju važnu ulogu u orkestriranju bioloških procesa (AEBERSOLD i MANN, 2003., VUČINIĆ, 2014.).

Postoje četiri metodološka koraka tijekom proteomske analize a to su: izolacija proteina iz biološkog materijala, razdvajanje proteina iz proteinske smjese, identifikacija razdvojenih proteina uz pomoć različitih analitičkih metoda poput spektrometrije masa (engl. *mass spectrometry, MS*) te identifikacija i karakterizacija proteina uz paralelno pohranjivanje rezultata u baze podataka. Postoji više grana proteomike kao što je navedeno u slici 4 (VUČINIĆ, 2014.).



Slika 4. Grafički prikaz grana proteomike

Proteomika se razvila zahvaljujući bazama podataka sekvenci DNA i proteina, naprecima u metodama separacije proteina i području spektrometrije masa te razvitku računalnih algoritama za pretraživanje baza podataka. S obzirom na složenost istraživanja, u ovim analizama potrebna su znanja iz molekularne biologije, biokemije i bioinformatike.

Osnovna razlika između proteomike i klasičnih molekularnih metoda analize proteina je u tome što se proteomika temelji na globalnoj analizi svih proteina unutar sustava odjednom, a ne na analizi pojedinačnih proteina, te na mogućnosti proučavanja složenih međudjelovanja velikog broja proteina (GRAVES i HAYSTEAD, 2002.).

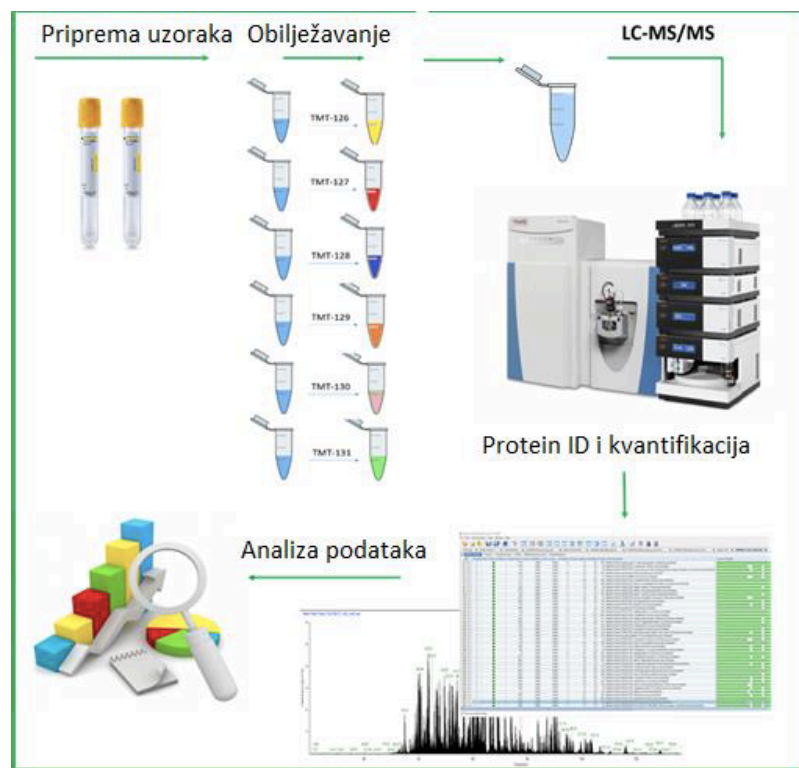


Upravo su nove metode spektrometrije masa zaslužne za brzu identifikaciju proteina u analiziranom uzorku. Spektrometrija masa je analitička metoda koja pruža informacije o masi peptida ili fragmentima istih na temelju omjera mase i naboja, a time se, uz pomoć proteinskih i nukleotidnih baza podataka, može identificirati protein (GRAVES i HAYSTEAD, 2002., APWEILER i sur., 2004.).

Tijekom proteklog desetljeća proteomika temeljena na spektrometriji masa sazrela je od polja istraživanja u glavni analitički alat za znanost primarno u humanoj medicini. Snažne tehnologije temeljene na spektrometriji mase sada pružaju neviđene uvide u sastav, strukturu, funkciju i kontrolu proteoma, bacajući svjetlo na složene biološke procese i fenotipove. Osim fokusa na signalizaciju i strukturne primjene, važni ciljevi proteomike bit će izgradnja sveobuhvatnih i kvantitativnih panela, što se smatra izvrsnim temeljem za modeliranje stanice (AEBERSOLD i MANN, 2016.).

Na temelju svega navedenog, analiza proteomskog profila stanica ili tkiva stoga može služiti kao dijagnostički biljeg, biljeg za točno utvrđivanje razvoja odnosno faze bolesti ili za predviđanje ishoda terapije (VUČINIĆ, 2014., MILARDI i sur., 2019.). U medicini, proteomske analize se sve više koriste u svrhu analize tkiva koja su zahvaćena malignim oboljenjem, a sve u svrhu postavljanja konačne dijagnoze i pronalaska adekvatnog oblika liječenja (VUJAČIĆ, 2018.). Poveznice proteomike i medicine upravo su istraživanja odnosa proteina na primjeru interakcije domaćin-uzročnik bolesti postavila temelje za razumijevanje nekih bolesti, odnosno obrambenih sposobnosti organizma (BATRA i sur., 2018., SHAH i sur., 2018.).

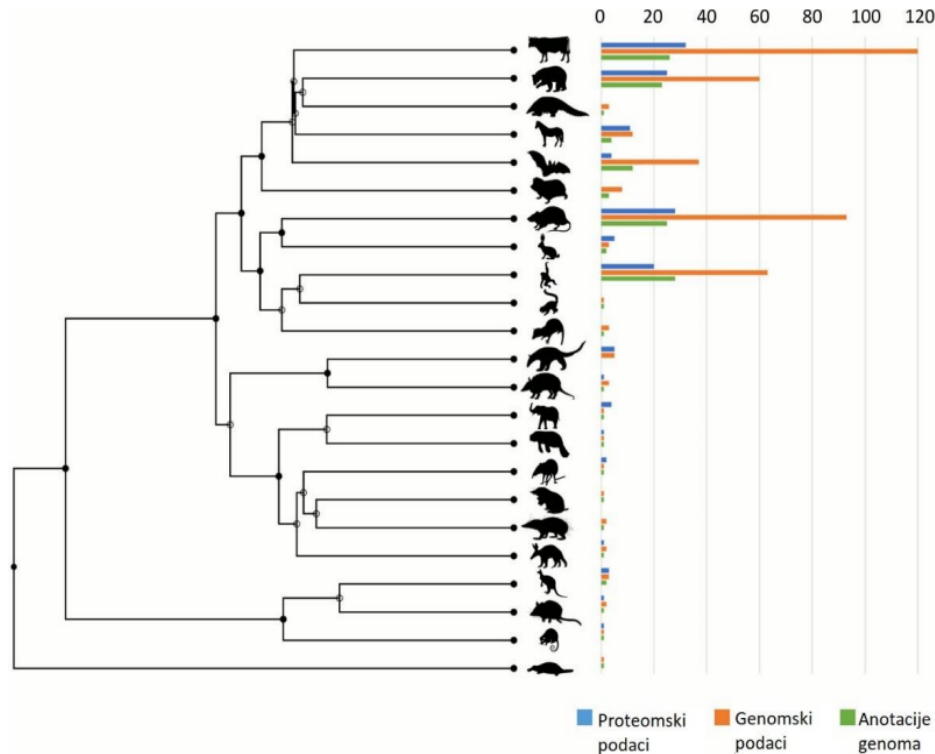
Kvalitativnom analizom proteina određuje se primarni slijed aminokiselina nekog proteina na temelju kojeg je moguće odrediti gen koji kodira informaciju za sintezu tog proteina, a postupkom kvantitativne analize određuje se zastupljenost pojedinog proteina. Osnovni metodološki pristup tijekom proteomske analize čini niz postupaka: izolacija proteina iz biološkog materijala, kvalitativna i/ili kvantitativna analiza proteomskog profila spektrometrijom masa te bioinformatička analiza podataka (BODZON-KULAKOWSKA i sur., 2007., YATES i sur., 2009.) (slika 5).



Slika 5. Primjer hodograma proteomskog istraživanja (slika: J. Kuleš)

Proteomska istraživanja u veterinarskoj medicini još uvijek zaostaju za proteomikom u humanoj medicini, međutim sve je više istraživanja kod domaćih životinja i kućnih ljubimaca (BILIĆ i sur., 2018., KULEŠ i sur., 2021., ŠIMONJI, 2023.). Stanice sisavaca sadržavaju stotine i tisuće različitih proteina s predviđenim dinamičkim rasponom do deset redova veličine, što zahtijeva ciljane analitičke strategije za detaljnu analizu proteoma. Razvojem modernih tehnologija poput genomike i proteomike, otvoren je put za primjenu složenih istraživanja uz minimalno korištenje modelnih organizama (HECK i NEELY, 2020). Proteomika u životinja sve više postaje znanstveni interes, a u svrhu istraživanja zoonotskih bolesti i kao dio svjetske inicijative „Jedno zdravlje“ (KULEŠ i sur., 2021.).

Postoji već puno dostupnih setova proteomskih i genomskih podataka u sisavaca u javno dostupnim bazama (slika 6) (HECK i NEELY, 2020).

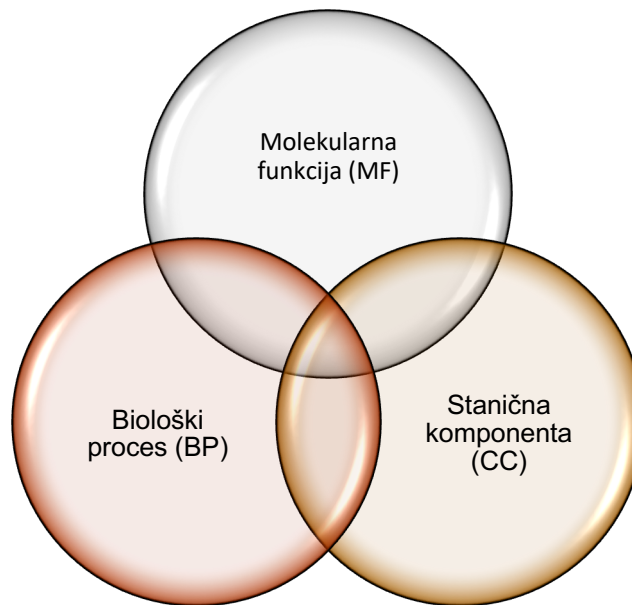


Slika 6. Distribucija sisavaca s dostupnim setovima proteomskih i genomskih podataka prema javno dostupnim bazama (PRIDE, GenBank i RefSeq iz 2020. godine). Odozgo prema dolje prikazani su: papkari (parnoprstasi), mesožderi, ljuskavci, kopitari (neparnoprstaši), šišmiši, kukcojedi, štakori, kunići, primati, leteći lemuri, rovke, mravojedi i ljenjivci, pasanci, slonovi, morske krave i dugoni, slonove rovke, zlatne krtice, četinsti ježevi, afrički mravojedi, tobolčari biljojedi, tobolčari mesojedi, oposumi i sisavci koji polažu jaja (izvor: HECK i NEELY, 2020).

Iz tog razloga dobiveni podatci mogu biti više ili manje iskoristivi. Kako bi se premostio postojeći problem, jedna od mogućnosti je i konvertiranje rezultata prema vrsti koja je već korištena kao model za što se obično primjenjuje program BLAST. No u takvim slučajevima sam program obično nije dostatan, već je potrebno detaljno analizirati dobivene rezultate s obzirom na potencijalne sličnosti među različitim proteinima. Ovakve konverzije omogućuju provedbu daljnjih bioinformatičkih analiza ili analize signalnih putova, a samim time i donošenje objektivnijih zaključaka (ŠIMONJI, 2023.).

Analizom proteomskih podataka dobivamo listu gena koje možemo povezati s molekularnim i biološkim putevima te funkcionalnim kategorijama kao što je genska ontologija (engl. *gene ontology*, GO) (GE i sur., 2019).

Genska ontologija zapravo je katalogizacija određenoga gena, a pojmovi se dijele u tri ontologije koje označuju različite biološke aspekte: molekularna funkcija (engl. *molecular function*, MF), biološki proces (engl. *biological proces*, BP) i stanična komponenta (engl. *cellular component*, CC) (slika 7).



Slika 7. Biološki aspekti genske ontologije

Analiza bioloških puteva proteoma sustavno povezuje proteine s molekularnim funkcijama te je prvi izbor za dobivanje uvida u temeljne međuodnose identificiranih proteina. Baze poput Reactome-a i KEGG-a služe kao arhiva opisa bioloških procesa, ali i alati za otkrivanje novih funkcionalnih odnosa u istraživanim proteomskim podacima (GILLESPIE i sur., 2022.).

Proteomika može vrlo dobro poslužiti u razumijevanju fenotipa, kao i proteoma bioloških tekućina. U njima, primjerice, glasnička RNA nije nužno povezana s proteomom biološke tekućine, već je prije u svezi s pripadajućim organima i potencijalnim patološkim stanjima. Također, bitna je stavka i činjenica kako dinamika proteina tijekom života nije jednaka, kao niti njihov obrtaj, interakcije, lokalizacija i slično (KELMER SACRAMENTO i sur., 2020.).

Nadalje, proteomika pruža uvid u količine funkcionalno važnih endogenih proteina i njihovih oblika (ZHENG i sur., 2012., ZHENG i sur., 2013., BOSCHIERO i sur., 2020.).

Zaključno treba napomenuti da će proteomika u budućnosti imati još veću i važniju primjenu, kako u medicini, tako i u veterini. Time će biti i više potrebe za napretkom u bioinformatici i računalnoj proteomici, što bi značilo da će put od analize jednog proteina do pravog razumijevanja i važnosti proteoma biti dug, izazovan i uzbudljiv. No, ne treba zaboraviti da je od posebnog značaja potrebna i suradnja između stručnjaka iz područja proteomike i stručnjaka iz područja biomedicinskih, biotehničkih i prirodnih znanosti.

#### 2.6.1. Proteomska istraživanja u pasa

U dosadašnjim istraživanjima proveden je relativno mali broj proteomskih studija na serumu i tkivu pasa. Tako se u jednom istraživanju uspostavio model oštećenja testisa izazvanog toplinom kod pasa koristeći kirurški kriptorhizam. Sekvencirana je RNA kako bi se istražilo izražavaju li se određeni transkripti većim stopama u testisima oštećenim toplinom u odnosu na normalno spuštene testise. Klaudini, proteini stanične adhezije, su bili relativno visoko izraženi u kriptorhidnim testisima, a smanjeni orhipeksijom. Istraživanjem je dokazano da hipertermija testisa uzrokovana kriptorhizmom utječe na ekspresiju klaudina, regulira smrt zametnih stanica testisa i proliferaciju Sertolijevih stanica (JHUN i sur., 2022.).

Treba istaknuti kako u dostupnoj literaturi trenutno nema podataka o proteomskim istraživanjima na tumorima testisa u pasa.

#### 2.6.2. Proteomska istraživanja u ljudi s tumorima testisa

Proteomska analiza se već uvelike koristi u medicinskoj onkologiji u cilju unapređenja i izbora citostatskih lijekova i protokola u liječenju različitih onkoloških stanja. Tako određena istraživanja govore o proteomskom profiliranju cisplatin-rezistentnih i cisplatin-osjetljivih testikulanih tumora zametnih stanica u ljudi. Cilj istraživanja bilo je otkrivanje ima li citostatski lijek cisplatin mogućnost pozitivnog kemoterapijskog učinka na pacijente s tumorom germinativnih stanica testisa (FITCHNER i sur., 2021.)

Naime, navedeno istraživanje koristilo je metodu kvantitativne proteomske spektrometrija masa u kombinaciji s označavanjem stabilnog izotopa aminokiselinama u staničnoj kulturi, a potom validaciju putem Western blota.

Autori navode da je kvantificirano 4375 proteina od kojih su 144 degranulirana proteina bila nađena u cisplatin-rezistentnim stanicama tumora zametnih stanica testisa što je otvorilo nove i znatne mogućnosti u razvoju novih opcija liječenja onkoloških pacijenata s malignim tumorom zametnih stanica testisa.

Drugo istraživanje koristilo je LC-MS/MS tehnologiju za diferencijaciju ekspresije proteina iz tkiva testisa kod muškaraca s normalnom i narušenom spermatogenezom. Analizom je nađeno 3 954 proteina u obje skupine, od čega je 116 proteina bilo sa značajnom različitom ekspresijom u skupini muškaraca s narušenom spermatogenezom što je dalo jasnu sliku o proteinima koji su uključeni u patologiju disfunkcije spermatogeneze koji mogu u budućim istraživanjima poslužiti kao koristan biomarker u liječenju neplodnosti muškaraca (LIANG i sur., 2020.).

Sljedeći literaturni navod govori o proteomici kao metodi za identifikaciju biomarkera raka testisa u muškaraca iz seruma i tkiva testisa. Autori u radu navode panel proteina identificiran proteomskim analizama koji se može koristiti nakon validacije u svrhu ranog otkrivanja tumora testisa kao i u prognostičke svrhe te kao temelj za daljnji razvoj novog pristupa liječenju tumora testisa u muškaraca (MILARDI i sur., 2019.).

Istraživanje DJURENOVIĆ i sur. (2014), govori o profiliranju specifičnih proteina testisa muškaraca kombiniranjem transkriptomike za analizu cijelog genoma s imunohistokemijskim profiliranjem proteina za karakterizaciju molekularnih komponenti testisa. Svrha istraživanja bila je pružanje popisa gena koji imaju promijenjenu ekspresiju u tkivu testisa kako bi se povećalo razumijevanje ljudske reproduktivne biologije i potencijalne neplodnosti na molekularnoj razini.

### 3. OBRAZLOŽENJE TEME

Stariji psi skloni su razvoju novotvorina testisa koje su najčešće dobroćudne prirode, no u nekim slučajevima dolazi do zloćudnog biološkog ponašanja. Dosadašnjim istraživanjima utvrđeni su serumski i imunohistokemijski biomarkeri za testikularne novotvorine pasa, ali ne i međusobna povezanost istih.

Prema našem saznanju, u dostupnoj literaturi do sada nije objavljena korelacija između ekspresije tumorskog markera AMH iz seruma u odnosu na ekspresiju AMH imunohistokemijskom analizom tkiva testisa u zdravih pasa i pasa s testikularnom novotvorinom. U biomedicini sve se više provode istraživanja na bazi proteomike u svrhu detekcije tumorskih markera različitih organskih sustava. Proteomska istraživanja u veterinarskoj medicini dobivaju sve više pozornosti zahvaljujući dostupnosti genoma različitih životinjskih vrsta, razvoju metoda separacije proteina i spektrometrije masa te razvitku računalnih algoritama za pretraživanje baza podataka.

U veterinarskoj medicini za sada nema objavljenih radova iz proteomike kod novotvorina testisa u pasa, a temeljem provedenih proteomskih istraživanja na ljudima, postoji čvrsta osnova da se i u veterinarskoj medicini temeljem proteomskih tehnika mogu diferencirati različiti tipovi novotvorina testisa, a u svrhu dijagnostičkog i prognostičkog značaja. Budući da će novotvorine testisa u pasa biti histopatološki diferencirane te će se učiniti analiza ekspresije Anti-Müllerovog hormona iz seruma i testikularnog tkiva pasa uz popratne proteomske tehnike, također iz seruma i tkiva testisa, ovaj rad bi trebao imati značaj u razvoju specifičnih tumorskih markera kod pasa sa suspektnom novotvorinom testisa.

Predloženo istraživanje doprinijeti će novim spoznajama u dokazivanju testikularnih novotvorina pasa na temelju analize Anti-Müllerovog hormona te proteomskim tehnikama u serumu i tkivu testisa u pasa.

## Hipoteza znanstvenog rada

Pretpostavka je da postoji povezanost porasta serumske i imunohistokemijske ekspresije anti-Müllerova hormona i detekcije proteoma kao tumorskih biljega u pasa s novotvorinama testisa u usporedbi sa zdravim psima.

Ciljevi istraživanja su:

1. utvrditi zastupljenost novotvorina testisa pasa kao i njihovu pojavnost u odnosu na životnu dob
2. istražiti ekspresiju tumorskih biljega u svrhu rane dijagnostike i diferencijacije novotvorina testisa u pasa
3. usporediti ekspresiju serumske koncentracije i imunohistokemijske ekspresije anti-Müllerova hormona kao tumorskog biljega u pasa s novotvorinama testisa u usporedbi sa zdravim psima
4. proteomskim tehnikama izdiferencirati dodatne biljege za različite tipove tumora testisa pasa
5. usporediti proteom seruma i proteom tkiva testisa pasa s novotvorinama testisa u usporedbi sa zdravim psima.



## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. PRIJEOPERACIJSKI PREGLED PASA I UZORKOVANJE KRVI

Zdravstveni status pasa uključenih u istraživanje procjenjivao se putem kliničkog pregleda koji se sastojao od uzimanja trijasa, inspekcije, palpacije grudnog koša i abdomena, auskultacije srca i pluća, putem hematološke analize krvi obavljene na veterinarskom analizatoru krvi (Horiba Scil Vet abc Plus, Viernheim, Njemačka), određivanjem biokemijskih pokazatelja krvi (Abbott Architect c4000 Plus, SAD), rendgena (Siemens Multix Fusion 1496, Njemačka) grudne šupljine u 3 projekcije i trbušne šupljine u 2 projekcije te ultrazvučnog pregleda prostate i testisa (Esaote S.p.A., Italija). Venska krv uzorkovana je iz *v. cephalica antebrachii* vacutainer sistemom. Biokemijski pokazatelji krvi određivani za potrebe ovog istraživanja uključivali su: ureu, kreatinin, ukupne proteine, albumine, natrij, kalij, alkalnu fosfatazu, alanin-aminotransferazu, C-reaktivni protein, glukozu i ukupni kalcij. Nakon kliničkog pregleda, jedinke koje su imale patofiziološke promjene nevezane uz reproduktivni sustav (febra, odstupanja od referentnih vrijednosti hematoloških i biokemijskih nalaza krvi i/ili patološke promjene dokazane RTG-om) bile su isključene iz daljnjeg istraživanja.

Unutar sedam dana od internističkog pregleda psi su bili podvrgnuti zahvatu orhiektomije na Klinici za kirurgiju, otopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Prilikom pripreme životinje za zahvat, pri postavljanju intravenskog katetera iz *v. cephalica antebrachii*, uzeti su uzorci krvi u biokemijsku epruvetu pomoću vacutainer sistema. Nakon zgrušavanja, krv je centrifugirana pomoću centrifuge (Universal 320R, Hettich, Njemačka) u Laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti te je serum alikvotiran u Eppendorf epruvete koje su označene internim brojevima i pohranjene na -80 °C (Sanyo, MDF-U33V, Japan) do daljnje analize. Daljnja analiza seruma uključivala je detekciju biomarkera anti-Müllerova hormona te proteomsku analizu seruma.

## 4.2. ORHIEKTOMIJA

Po završenom prijeoperacijskom pregledu (unutar sljedećih 7 dana), u općoj inhalacijskoj anesteziji po kliničkom protokolu na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu psima je učinjena orhiektomija. Nakon postavljanja intravenskog katetera u v. *cephalicha antebrachii*, za premedikaciju je apliciran deksmedetomidin 5 mcg/kg u mišić (i. m.) te metadon 0.3 mg/kg i. m. Indukcija u anesteziju učinjena je kombinacijom midazolama u dozi od 0.2 mg/kg intravenski (i. v.) i propofola 2-4 mg/kg i. v. (do učinka kojeg definiramo kao dovoljna opuštenost koja omogućava araumatsku intubaciju). Potom je postavljen endotrahealni tubus odgovarajućeg promjera putem kojeg je aplicirana inhalacijska anestezija sevofluranom (Baxter d.o.o., Ljubljana, Slovenija). U slučaju potrebe za dodatnom analgezijom psima je bio apliciran fentanil u dozi od 1 mcg/kg i. v. koji se prema potrebi nastavljao primjenom fentanila u kontinuiranoj infuziji u dozi od 0,2 mcg/kg/min do završetka kirurške stimulacije. Poslijeoperacijska analgezija bazirana je na primjeri karprofena u dozi od 2.2 mg/kg i. v., a koja se nastavlja u *per os* primjeni prilikom otpusta pacijenta svakih 12 h kroz prvih 3 – 5 dana poslijeoperacijskog perioda. Psi uključeni u istraživanje bili su podvrgnuti orhiektomiji iz različitih razloga: zbog pojave kliničke manifestacije bolesti prostate (benigna hiperplazija prostate), zbog palpacijski i/ili ultrazvučno promijenjenih testisa te u slučaju postojanja bihevioralnog problema. Istraživana skupina pasa (N = 72) tijekom operacijskog zahvata bila je u leđnom položaju te se nakon pripreme operacijskog polja učinio preskrotalni rez dužine 3-5 cm ovisno o veličini životinje i testisa. Testisi su disecirani, orhiektomija je učinjena pokrivenom *tunica vaginalis* i na svaki funikul postavile su se po dvije ligature, jedna transfiksacijska i jedna cirkumferentna ligatura primjenom monofilamentnog resorbirajućeg konca debljine USP 3-0 (Byosin 3-0, Covidien, SAD). Mišićje, potkožje i koža rekonstruirani su po standardnom protokolu. Tkivo testisa upućeno je na Zavod za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu u svrhu histopatološke obrade te se ostali dio tkiva arhivirao u obliku parafinskih blokova. U istraživanje su uključeni psi koji su podvrgnuti orhiektomiji u periodu od 14.10.2019. do 12.4.2023. godine na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.

U navedenom periodu psi su uključeni u istraživanje ako se za vrijeme prijeoperacijskog pregleda dokazalo da nemaju drugu bolest osim patoloških promjena na testisima i/ili prostati te su nasumično izabrani zdravi psi kao kontrolna skupina koji su bili podvrgnuti orhiektomiji na osobnu inicijativu vlasnika bez dodatne indikacije za operacijski zahvat.

#### 4.3. DOKAZIVANJE SERUMSKE EKSPRESIJE ANTI-MÜLLEROVA HORMONA

Ekspresija AMH iz arhiviranih uzoraka seruma pasa određivana je putem sendvič ELISA testa (Canine Anti-Müllerian Hormone (AMH) Sandwich, ELISA kit ABIN3073421, detection range 0.28 – 18 ng/mL, antibodies-online.com, SAD). Serumi su uzorkovani i pohranjeni na dan orhiektomije. Provedeno je kvantitativno mjerenje serumske koncentracije AMH kod 72 psa prema protokolu proizvođača ELISA kit-a.

Imunokemijske metode temelje se na specifičnoj reakciji antigen-antitijelo (Ag-At) i stvaranju kompleksa Ag-At. Zbog izuzetne specifičnosti ove reakcije, imunokemijske tehnike se odlikuju osjetljivošću, reproducibilnošću i jednostavnošću.

Mikrotitarska pločica presvučena je psećim antitijelima specifičnim za AMH. U ELISA-i s dvostrukim antitijelima (*sandwich* tehnika), nakon dodatka standarda i uzoraka u jažice i inkubacije na 37 °C, dolazi do vezanja antigena (odnosno ciljnog analita) iz uzorka na antitijelo. Slijedi ispiranje nevezanih antigena, dodaje se poliklonalno biotinom obilježeno sekundarno antitijelo koje se veže za antigen u jažici. Nakon inkubacije i ispiranja dodaje se biotinom obilježeno sekundarno protutijelo i ponovno inkubira na 37 °C. Tako nastaje enzimom obilježen kompleks antitijelo-antigen-sekundarno antitijelo. Nakon ispiranja koje uklanja nevezani biotin dodaje se kromogeni supstrat tetrametilbenzidin (TMB) koji djelovanjem enzima streptavidina daje plavo obojenje u onim jažicama koje sadržavaju kompleks antitijelo-antigen-sekundarno antitijelo. Reakcija enzima i supstrata prekida se dodatkom sulfatne kiseline što dovodi do promjene plave u žutu boju. Promjena boje mjeri se spektrofotometrijski na čitaču mikrotitarskih pločica (Clariostar plus, BMG LABTECH, Ortenberg, Njemačka) na 450 nm. Koncentracija antigena (AMH) u uzorcima se potom određuje pomoću kalibracijske krivulje izrađene pomoću programa CurveExpert 1.4.

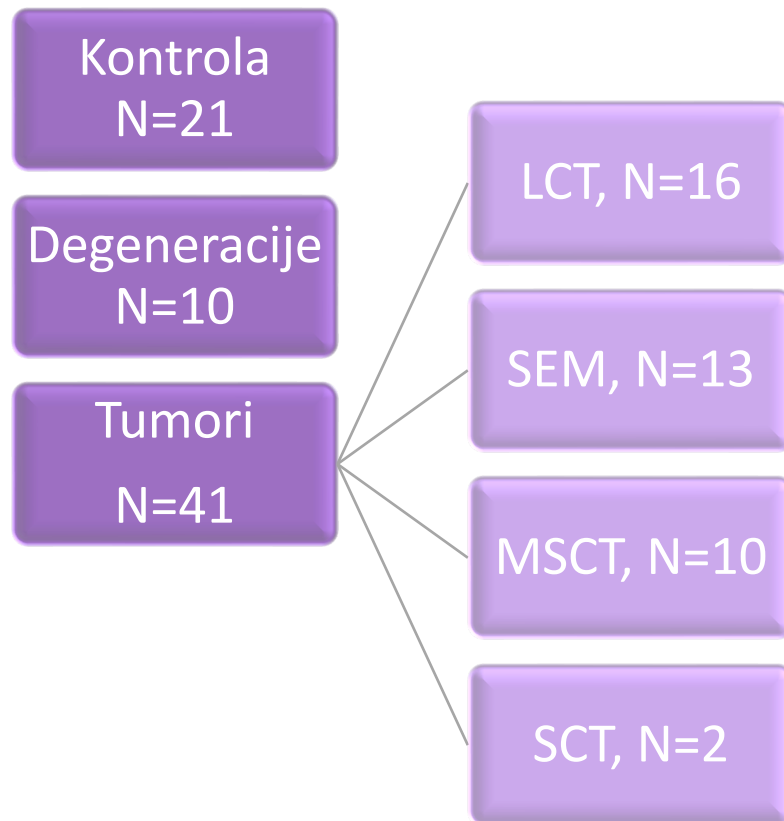
Za procjenu dijagnostičke točnosti ELISA testa za serumsku koncentraciju AMH, odnosno imunohistokemijske analize biljega Ki-67, za razlikovanje zdravih pasa (kontrola) od pasa s tumorima, korištena je ROC analiza (eng. Receiver Operating Characteristic analysis) u programu GraphPadPrism verzija 5 software (San Diego, SAD).

#### 4.4. HISTOPATOLOŠKA ANALIZA TKIVA TESTISA

Histopatološka pretraga tkiva testisa podrazumijevala je mikroskopski pregled arhiviranih uzoraka tkiva testisa pasa (N = 72 pasa) sa Zavoda za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, u svrhu utvrđivanja patoloških promjena.

Histopatološki preparati su bili izrađeni standardnim postupkom pripreme koji je uključivao fiksaciju uzorka u 4 % puferiranom formalinu  $\leq$  24 sata i pripremu uzoraka za uklapanje. Potom je uslijedila dehidracija tkiva u histokinetu, uklapanje u parafin s rezanjem parafinskih blokova te stavljanje rezova na predmetna stakalaca. Makroskopski uzorci testisa pasa su histološki pretraživani na prisutnost tumorskih i degenerativnih promjena. Svi uzorci tumora testisa, degenerativnih testisa i nepromijenjenih testisa pasa, bojani su metodom hemalaun-eozin (HE) te je potom nastupilo poklapanje pokrovnim stakalcem. Histopatološka klasifikacija tumora provedena je prema modificiranoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene klasifikacije iz 1998. godine kao i prema FOSTER i LADDS (2007). Pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus, CX 21) svi su uzorci u potpunosti pregledani pod povećanjem od 4x i 10x, a zatim uočene promjene pregledane su pod povećanjem od 20x i 40x. Na temelju rezultata histopatološke pretrage istraživani su psi svrstani u 3 skupine (slika 8). Psi s histopatološki nepromijenjenim testisima, što je ujedno bila i kontrolna skupina pasa (K skupina = 21 pas), psi s histopatološki degenerativnim promjenama u testisima (D skupina = 10 pasa) i psi s histopatološki prisutnim tumorom testisa (T skupina = 41 pas). Analizirana je ukupna pojavnost i vrsta tumora testisa pasa dijagnosticiranih u prikupljenim uzorcima u navedenom vremenskom periodu. Psi koji su imali jedan histopatološki tumorski promijenjen testis, a drugi zdrav ili degenerirani testis, svrstani su u skupinu s tumorskim testisima (T skupina). Ako je pas imao jedan zdrav, a drugi degenerirani testis, jedinka se isključila iz istraživanja budući da nismo jasno mogli definirati u koju skupinu bi bila svrstana.

Stoga je skupina sa zdravim i degeneriranim testisima trebala je zadovoljiti uvjete da su oba testisa jednakog histopatološkog nalaza kako bi jedinke bile uključene u istraživanje.



Slika 8. Grafički prikaz podjele skupina istraživanih pasa prema histopatološkom nalazu; (LCT – tumor Leydigovih stanica, SEM – seminom, MSCT – mješoviti tumor, SCT – tumor Sertolijevih stanica)

## 4.5. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA TKIVA TESTISA

### 4.5.1. Primijenjeni imunohistokemijski biljezi

Imunohistokemijskom pretragom parafinskih rezova omogućava se vizualizacija vezanja ciljnih protutijela na antigene u tkivu testisa. Imunohistokemijski su analizirani uzorci tkiva 72 psa, od čega je kod skupine nepromijenjenih testisa (kontrolna skupina) i skupine pasa s histopatološki dokazanim degenerativnim promjenama na testisima pretraživan samo jedan testis na nazočnost tumorskih biljega imunohistokemijskom metodom. Kod pasa s dokazanim tumorom testisa oba testisa (ukoliko su oba bila prisutna) su analizirana imunohistokemijskom pretragom na reprezentativnim uzorcima testisa, ukoliko su oba testisa bila tumorski promijenjena ili je ustanovljena degeneracija testisa. Ukoliko kod pasa s tumorom jednog testisa drugi testis nije pokazivao histopatološke promjene, kod takvog testisa nije se analizirala daljnja imunohistokemijska ekspresija. U imunohistokemijsku analizu nisu bili uključeni uzorci testisa pasa kod kojih su pretragom utvrđene izrazito uznapredovale autolitičke promjene te su takve životinje isključene iz daljnjeg istraživanja. Prilikom imunohistokemijske analize tkiva testisa korištena su protutijela:

1. monoklonsko protutijelo Ki-67 (Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, Dako, Danska, (M724029-2))
2. monoklonsko protutijelo anti-Müllerov hormon (canine anti-Anti-Müllerian Hormone (AMH) antibody, (AA 468-517)).

Imunohistokemijska analiza je bila izvedena na deparafiniziranim histološkim rezovima (debljine 4  $\mu\text{m}$ ). S pomoću topline proveo se postupak razotkrivanja antigena te je potom uslijedila inkubacija primarnog, te kasnije sekundarnog, protutijela što je omogućilo pojačavanje signala s pomoću protutijela.

## Biljeg Ki-67

U ovom istraživanju korišteno je monoklonsko protutijelo Ki-67 (Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, Dako). Korištene su reagencije za imunohistokemijsku analizu Ki-67:

- Xylene Substitute
- etilni alkohol (100 %, 96 %, 75 %)
- destilirana voda
- Dako REAL Target Retrieval Solution, S2367, pH 9.0
- Dako EnVision Peroxidase-Blocking Reagent Dako EnVision FLEX (Dako REAL<sup>TM</sup> En Vision<sup>TM</sup>/HRP, Rabbit/Mouse)
- Dako REAL DAB + Chromogen ,K5007
- Dako EnVision FLEX Wash Buffer, K800/K8002

U svrhu vizualizacije reakcije korišten je kromogen DAB (3, 3'-diaminobenzidin) koji imunoreakciju prikazuje kao tamno smeđe obojenje. Samom postupku imunohistokemijske analize prethodila je izrada tkivnih rezova iz parafinskog bloka uz pomoć mikrotoma. Blokovi su rezani na debljinu od 4 µm te su preneseni na stakalca. Nakon toga uslijedio je postupak deparafinizacije i rehidracije tkiva. Deparafinizacija se obavila uranjanjem preparata posloženih na nosač u Xylene Substitute (3x5 min) na sobnoj temperaturi. Nakon deparafinizacije tkiva slijedilo je rehidriranje tkiva uranjanjem preparata u reagens: 100 % alkohol 2x3 min, 96 % alkohol 2x3 min, 75 % alkohol 2x3 min, destilirana voda 2x3 min.

Slijedio je postupak razotkrivanja antigena s pomoću tzv. HIER metode (engl. *heat-induced epitope retrieval*) koja razotkriva antigen uz pomoć topline. Predmetna stakalca postavljena su u kivetice koje su ispunjene otopinom pufera pH 9.0 (Dako REAL<sup>TM</sup> Target Retrieval Solution, S2367). Nakon toga se poklopljena kiveta stavljala u plastičnu posudu s običnom vodom te u mikrovalnu pećnicu (20 min). Nakon vađenja iz mikrovalne pećnice slijedilo je hlađenje (20 min).

Imunohistokemijska reakcija u užem smislu je obavljena automatiziranim postupkom imunohistokemijskog bojenja tkiva s pomoću uređaja DAKO Autostainer Plus.

Potrebni reagensi i radne otopine za rad uređaja su: destilirana voda, EnVision Wash Buffer (Dako), EnVision Peroxidase-Blocking Reagent (Dako), EnVision FLEX sekundarno protutijelo (Dako REAL<sup>TM</sup> En Vision<sup>TM</sup>/HRP, Rabbit/Mouse - vrijeme inkubacije 30 min), supstrat Dako REAL<sup>TM</sup> DAB + Chromogen (vrijeme inkubacije 10 min) i primarna protutijela razrijeđena u koncentracijama (Ki67- 1:100; vrijeme inkubacije 30 min). Izvađeni preparati su se ispirali u destiliranoj vodi (2 min), a zatim su se preparati uranjali u hematoksilin (1 min). Pokrivanje uzoraka pokrovnim stakalcima je izvršeno manualno. Pozitivna kontrola za Ki67 je bio adenom cirkumanalnih žlijezda psa.

Način procjenjivanja imunohistokemijske reakcije analiziran je uz pomoć svjetlosnog mikroskopa Digicyte DX50 s pomoću objektivna 4x, 10x, 20x i 40x. Za biljeg Ki67 imunohistokemijska se reakcija procjenjivala nakon fotografiranja uzoraka. Korištena je kamera Digicyte BigEye i računalni softver Digicyte Capture. Za kvantifikaciju reakcije Ki67 biljega procjenjivao se broj pozitivnih jezgri na 1000 tumorskih stanica u ukupno 4 vidna polja VPM u svim uzorcima.

#### Biljeg anti-Müllerov hormon

U ovom istraživanju korišteno je monoklonsko protutijelo AMH (Canine Anti-Anti-Müllerian Hormone (AMH) (AA 468-517) antibody). Za imunohistokemijsku analizu AMH korištene su reagensije:

1. Xylene Substitute (Tissue-tek Tissue-Clear XyleneSubstitute, Sakura, Poljska)
2. etilni alkohol (100 %, 96 %, 75 %)
3. destilirana voda
4. Dako REAL Target Retrieval Solution, S2367, citratni puffer, pH 6.0
5. Protein Block ab64226
6. Dako EnVision Peroxidase-Blocking ReagentDako EnVision FLEX (Dako REAL<sup>TM</sup> En Vision<sup>TM</sup>/HRP, Rabbit/Mouse)
7. Dako REAL DAB + Chromogen, K5007
8. Dako EnVision FLEX Wash Buffer, K800/K8002



U svrhu vizualizacije reakcije korišten je kromogen DAB (3, 3'-diaminobenzidin) koji imunoreakciju prikazuje kao tamno smeđe obojenje.

Samom postupku imunohistokemijske analize prethodila je izrada tkivnih rezova iz parafinskog bloka s pomoću mikrotoma. Blokovi su rezani na debljinu od 4  $\mu$ m te su preneseni na stakalca. Nakon toga slijedio je postupak deparafinizacije i rehidracije tkiva. Deparafinizacija se obavila uranjanjem preparata posloženih na nosač u Xylene Substitute (3x5 min) na sobnoj temperaturi. Nakon deparafinizacije tkiva slijedilo je rehidriranje tkiva uranjanjem preparata u reagens: 100 % alkohol 2x3 min; 96 % alkohol 2x3 min; 75 % alkohol 2x3 min; destilirana voda 2x3 min.

Slijedio je postupak razotkrivanja antigena s pomoću tzv. HIER metode (engl. *heat-induced epitope retrieval*) koja razotkriva antigen uz pomoć topline. Predmetna stakalca postavljena su u kivetice koje su ispunjene otopinom citratnog pufera pH 6.0 (Dako REALTM Target Retrieval Solution, S2367). Nakon toga se poklopljena kiveta stavljala u plastičnu posudu s običnom vodom te u mikrovalnu pećnicu (20 min). Nakon vađenja iz mikrovalne pećnice slijedilo je hlađenje (20 min), a nakon hlađenja korišten je reagens za blokiranje proteina (Protein Block ab64226) (tijekom noći).

Imunohistokemijska reakcija u užem smislu obavljena je automatiziranim postupkom imunohistokemijskog bojenja tkiva s pomoću uređaja DAKO Autostainer Plus. Potrebni reagensi i radne otopine za rad uređaja su: destilirana voda, EnVision Wash Buffer (Dako), EnVision Peroxidase-Blocking Reagent (Dako), EnVision FLEX sekundarno protutijelo (Dako REALTM En VisionTM/HRP, Rabbit/Mouse-vrijeme inkubacije 30 min), supstrat Dako REALTM DAB + Chromogen (vrijeme inkubacije 10 min) i primarna protutijela razrijeđena u koncentracijama (AMH - 1:200; vrijeme inkubacije 30 min). Izvađeni preparati su se ispirali u destiliranoj vodi (2 min), a zatim su se preparati uranjali u hematoksilin (1 min). Pokrivanje uzoraka pokrovnim stakalcima je izvršeno manualno. Pozitivna kontrola za AMH je bio testis mladog psa.

Način procjenjivanja imunohistokemijske reakcije analiziran je putem svjetlosnog mikroskopa Digicyte DX50 uz pomoć objektivna 4x, 10x, 20x i 40x. Za biljeg AMH imunohistokemijska se reakcija procjenjivala semikvantitativno u reprezentativnim vidnim poljima VMP bez prisutne nekroze, upale i krvarenja.

Za kvantifikaciju reakcije AMH biljega procjenjivao se postotak obojenih stanica. Zatim se koristio sustav bodovanja (tablica 1) na način: < 5 % pozitivnih stanica dodjeljuje se ocjena 1; 6 – 30 % ocjena 2; 31 – 70 % ocjena 3; 71 – 100 % ocjena 4. Reprezentativni uzorci tumora i tkiva testisa fotografirani su pomoću kamere Digicyte BigEye i računalnog softvera Digicyte Capture.

Tablica 1. Sustav bodovanja za kvantifikaciju imunohistokemijskog AMH biljega

OCJENA	0	1	2	3	4
% POZITIVNIH STANICA NA AMH	0 %	< 5 %	6 – 30 %	31 – 70 %	71 – 100 %

#### 4.6. PROTEOMSKE ANALIZE SERUMA I TESTIKULARNOG TKIVA

##### 4.6.1. Priprema uzoraka za proteomsku analizu

Putem semi-kvantitativnog proteomskog pristupa pomoću izobarnih privjesaka koji omogućavaju multiplexiranje (istovremenu analizu šest uzoraka), provedena je proteomska analiza seruma i tkiva (KULEŠ i sur., 2021.) na uzorcima od 72 životinje.

##### Uzorci seruma pasa

Za određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorcima seruma korišten je test bicinoninske kiseline (engl. *BCA assay*) (Thermo Scientific, Rockford, SAD). Iz svakog uzorka uzet je volumen koji odgovara 35 µg proteina i dopunjen do 50 µl s 0.1 M trietilamonijevim bikarbonatom (TEAB, Thermo Scientific, Rockford, SAD). Uzorci su potom reducirani dodatkom 2,5 µl 200 mM ditiotreitola (60 min, 55 °C) (DTT, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD), alkilirani dodatkom 2,5 µl 375 mM jodoacetamida (30 min, na sobnoj temperaturi u mraku) (IAA, Sigma Aldrich, St. Lois, MO, SAD) te taloženi acetonom preko noći (300 µl, na 4 °C).

Nakon centrifugiranja (9000 x g, 4 °C), proteini u talogu se otapaju u 50 µl TEAB-a, te razgrađuju dodatkom 1 µl tripsina (1 mg/mL, Promega, Madison, SAD; inkubacija na 37 °C preko noći). Reagensi s izobarnim privjescima (engl. Tandem Mass Tag 6plex, TMT, Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD) pripremljeni su prema uputama proizvođača. U svaki uzorak dodano je 19 µl specifičnog privjeska (60 min, na sobnoj temperaturi), a reakcija obilježavanja je zaustavljena dodatkom 8 µl 5 % hidroksilamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Pet nasumično odabranih obilježenih uzoraka spojeno je s unutarnjim standardom (pool svih uzoraka koji služi za normalizaciju) u jedan uzorak, osušen s pomoću vakuum centrifuge te analiziran uz pomoć vezanog sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (engl. *liquid chromatography with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS*).

#### Uzorci tkiva testisa pasa

Uzorci testisa arhivirani su u obliku parafinskih blokova stoga je prethodila deparafinizacija i rehidracija tkiva. Iz parafinskih blokova pomoću mikrotona izradili su se tkivni rezovi na debljini od 10 µm te su preneseni u epruvete. Zatim je slijedio postupak deparafinizacije pomoću ispiranja s Xylene Substitute (Tissue-tek Tissue-Clear XyleneSubstitute, Sakura, Poljska) (3x5 min) na sobnoj temperaturi. Nakon deparafinizacije tkiva slijedilo je rehidriranje tkiva uranjanjem preparata u sljedeće reagense: 100 % etilni alkohol 2x3 min, 96 % etilni alkohol 2x3 min, 75 % etilni alkohol 2x3 min, destilirana voda 2x3 min. U deparafinizirane i rehidrirane uzorke tkiva testisa dodano je 200 µl pufera za lizu (0,1 % Rapigest u 0.1 M TEAB-u, 0,1 M DTT) (Rapigest, Waters Corporations, Milford, SAD). Uzorci su zatim inkubirani na 95 °C 2 sata uz konstantno miješanje (650 rpm), sonicirani na ledu (5 ciklusa maksimalne amplitude, 10 s; Qsonica, Newtown, SAD), te centrifugirani (16 000 x g, 18 °C, 10 min). Supernatant je odvojen i premješten u nove tubice i u njemu je određena koncentracija ukupnih proteina pomoću BCA testa. Iz svakog uzorka volumen koji odgovara 50 µg proteina dopunjen je do 50 µl TEAB-om. Uzorci su potom alkilirani dodatkom 2.5 µl 375 mM jodoacetamida (30 min, na sobnoj temperaturi u mraku). Nakon dodatka 1 µl tripsina (1 mg/mL, Promega, Madison, SAD) slijedila je inkubacija na 37 °C preko noći.

Reagensi s izobarnim privjescima (engl. Tandem Mass Tag 6plex, TMT, Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD) pripremljeni su prema uputama proizvođača. U svaki uzorak dodano je 19 µl specifičnog privjeska (60 min, na sobnoj temperaturi), a reakcija obilježavanja je zaustavljena dodatkom 8 µl 5 % hidroksilamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Pet nasumično odabranih obilježenih uzoraka spojeno je s unutarnjim standardom (pool svih uzoraka koji služi za normalizaciju) u jedan uzorak za uklanjanje Rapigesta, u svaki uzorak je dodana 0,5 % mravlja kiselina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka). Nakon inkubacije 45 min na 37 °C i centrifugiranja (15 min 13000 x g, 18 °C), supernatant je prebačen u nove eppice. Alikvot za analizu osušen je pomoću vakuum centrifuge te analiziran uz pomoć LC-MS/MS pristupa.

#### 4.6.2. Analiza uzoraka LC-MS/MS pristupom

Uzorci obilježeni TMT-om analizirani su korištenjem Dionex UltiMate 3000 RSLCnano sustava (Thermo Fisher Scientific, Gemering, Njemačka) spregnutog sa spektrometrom masa Q Exactive Plus s hibridnim analizatorom masa kvadrupola i Orbitrapa (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka) postupkom podatkovno ovisne akvizicije (engl. *Data Dependent Acquisition, DDA*), kao što je prethodno opisano u dostupnoj literaturi (HORVATIĆ i sur., 2019.).

Pokretna faza A sastojala se od 0,1 % mravlje kiseline u vodi, a pokretna faza B bila je 0,1 % mravlja kiselina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) u 80 % acetonitrilu (Honeywell, Charlotte, NC, SAD). Peptidi su otopljeni u puferu (2 % acetonitril, 0,1 % mravlja kiselina) i nanoseni na predkolumnu (C18 PepMap100, 5 µm, 100A, 300 µm×5 mm), prije odjeljivanja na analitičkoj koloni (PepMap™ RSLC C18, 50 cm×75 µm). Kromatografski uvjeti gradijentnog eluiranja prikazani su u tablici 2. Protok pokretne faze bio je 0,3 µL/min, a ukupno vrijeme analize 155 minuta.

Tablica 2. Kromatografski uvjeti gradijentnog eluiranja korištenog za razdvajanje peptida LC-MS/MS pristupom; A – pokretna faza A (0,1 % mravlja kiselina u vodi); B – pokretna faza B (0,1 % mravlja kiselina u 80 % acetonitrilu)

Vrijeme zadržavanja / min	A ( $\varphi$ / %)	B ( $\varphi$ / %)
0	95,0	5,0
12	95,0	5,0
132	45,0	55
133	5,0	95
135	5,0	95
136	95,0	5,0
155	95,0	5,0

Ionizacija elektroraspršenjem je postignuta korištenjem nanoraspršenja Flex izvora iona (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka), koji sadržava emiter SilicaTip (New Objective) unutarnjeg promjera 10  $\mu\text{m}$ . Spektrometrija masa je provedena u pozitivnom načinu rada spektrometra masa koristeći metodu podatkovno ovisne akvizicije DDA Top8. Napon ionskog izvora za MS je bio + 2.00 kV, a temperatura kapilare za prijenos iona 275 °C. Spektar masa snimljen je u rasponu od 350,0 m/z do 1800,0 m/z pri razlučivosti od 70 000, vremenu injektiranja od 120 ms, AGC vrijednošću  $1 \times 10^6$ , izolacijskom prozoru od  $\pm 2,0$  Da i dinamičkom isključenju od 30 s. Fragmentacija HCD provedena je pri normaliziranoj energiji sudara (NCE) (29 % i 35 %) s razlučivanjem od 17 500 i ciljnom vrijednošću AGC-a od  $2 \times 10^5$ . Ioni prekursori neodređenog naboja, kao i oni s nabojem +1 i više od +7, bili su isključeni iz daljnjeg odabira fragmentacije.

Za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju proteina korišten je SEQUEST algoritam unutar računalnog programa Proteome Discoverer (verzija 2.3., Thermo Fisher Scientific).

Provedena je pretraga baze podataka *Canis lupus* preuzete s UniprotKB 24. studenoga 2023. godine (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.), koja je sadržavala 104 591 unosa, prema sljedećim parametrima: dozvoljena dva promašena mjesta cijepanja tripsinom, tolerancija pogreške izmjerene mase prekursora i fragmenata od 10 ppm i 0,05 Da, karbomidometil (C) kao fiksna modifikacija peptida, oksidacija (M) i TMT 6-pleks (K, peptidni N-kraj) kao dinamičke modifikacije peptida. Postotak krivih očitavanja (engl. *false discovery rate*, *FDR*) prilikom identifikacije peptida izračunat je putem Percolator algoritma unutar računalnog programa Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific). Proteini s najmanje dva jedinstvena peptida i 1 % FDR smatrani su pouzdano identificiranima te su korišteni u daljnjim analizama.

#### 4.6.3. Statističke i bioinformatičke analize

Statističke analize za serumski biljeg AMH i imunohistokemijski biljeg Ki-67 napravljene su korištenjem programa GraphPadPrism verzija 5 software (San Diego, SAD). Razlike između skupina određene su Kruskal-Wallisovim testom s odgovarajućim *post-hoc* testom, pri čemu se vrijednost  $p < 0,05$  smatrala statistički značajnom. Rezultati koncentracija serumskog AMH i ekspresije protutijela Ki-67 prikazane su kao medijan i intrakvartilni raspon.

Za statističku analizu podataka za imunohistokemijski biljeg AMH korišten je program SAS 9.4 (Statistical Analysis Software 2002–2012 by SAS Institute Inc., Cary, SAD). Procjena snage testa ( $1 - \textit{beta error probability}$ ) određena je pomoću programa G-Power Test 3.1.9.4. U procjeni je primijenjen F-test za analizu varijancija fiksnih efekata s *post-hoc* testom gdje je alfa (engl. *error probability*) postavljen na 0,05. Uzeta je viša razina veličine efekta ( $f = 0,40$ ). U istraživanju su analizirane tri grupe uz ukupan broj životinja 72. Procijenjena snaga testa ( $1 - \textit{beta error probability}$ ) iznosila je 0,91. Deskriptivna statistika (srednja vrijednost, standardna devijacija, srednja pogreška srednje vrijednosti, minimum, maksimum, koeficijent varijabilnosti) odradila se pomoću SAS modula PROC MEANS, PROC UNIVARIATE i PROC FREQ. Analiza podataka ordinalne skale učinjena je logističkom regresijom pomoću procedure GENMOD, primjenom multinomijalne distribucije i kumulativne logit link funkcije.

Za statističku obradu proteomskih profila seruma i tkiva testisa korišten je MetaboAnalyst 6.0 (CHONG i XIA, 2018). Proteini koji su bili prisutni u najmanje 50 % uzoraka uključeni su u daljnju statističku analizu. Razlike između skupina u proteomu seruma određene su neparametrijskim testom (Wilcoxon rank-sum test), dok su u tkivu testisa razlike određene neparametrijskom ANOVA-om. Razlike u ekspresiji između dvije skupine izračunate su prema formuli medijan (skupina 1)/medijan (skupina 2) i izražena u log<sub>2</sub> bazi.

Za bioinformatičku analizu, jedinstvena oznaka proteina prvo je pretvorena u službeni simbol gena pomoću alata za mapiranje UniProtKB ID (THE UNIPROT CONSORTIUM 2020). Proteini za koje nije bila dostupna oznaka gena za *Canis lupus* ili su bili navedeni kao *nekarakterizirani protein* zamijenjeni su, gdje je bilo primjenjivo, pomoću alata UniProt BLAST s najbližim podudarnim ortologom iz baze *Canis lupus* (najmanje 70 % podudarnosti) (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.).

Funkcionalna analiza genske ontologije (za biološki process, staničnu lokalizaciju i molekularnu funkciju) provedena je pomoću alata PANTHER (THOMAS i sur., 2022).

Analiza bioloških puteva znatno različitih proteina između skupina u proteomu tkiva testisa pasa provedena je pomoću alata Reactome koristeći humani genom kao pozadinu i putevi s FDR < 0,05 izdvojeni su kao značajni (GILLESPIE i sur., 2022.).

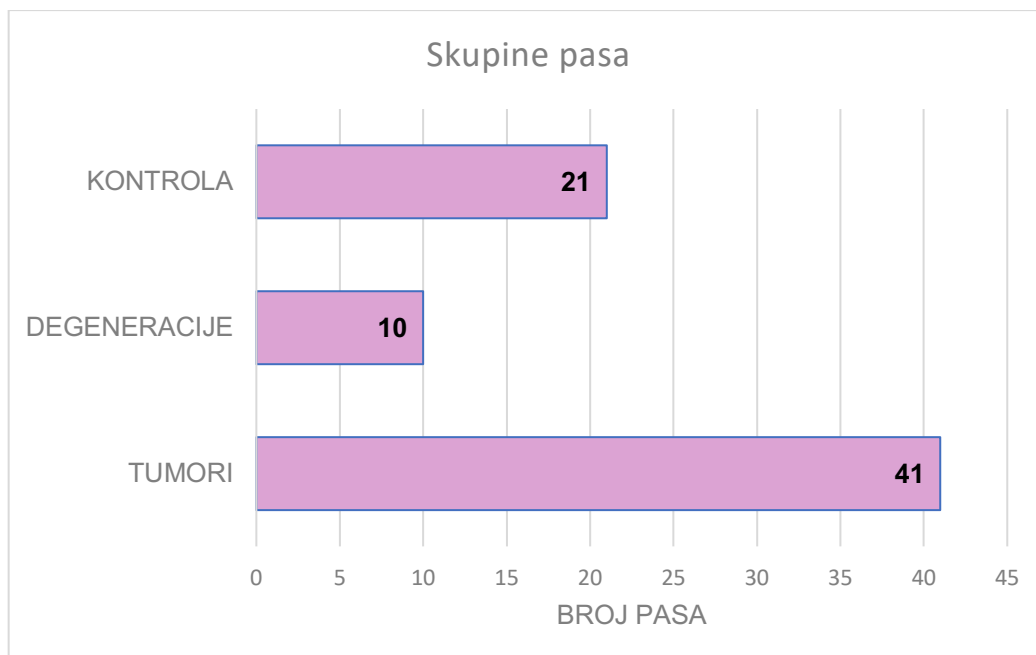
Mrežni prikaz različito eksprimiranih proteina između skupina (tumori, degeneracije i kontrole) tkiva testisa pasa izrađen je u STRING-u (SZKLARCZYK i sur., 2023.).

## 5. REZULTATI

### 5.1. UČESTALOST I HISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA TUMORA TESTISA PASA

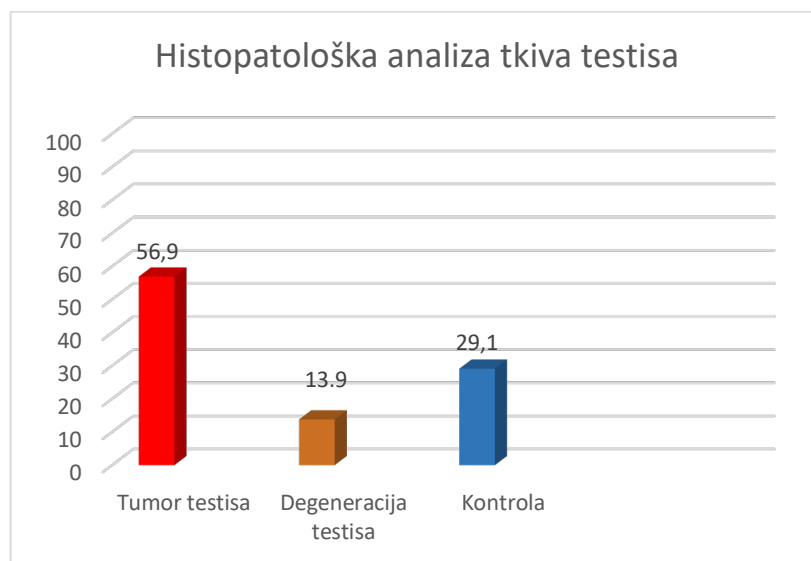
Od ukupno 72 psa uključena u istraživanje, na temelju histopatološke analize tkiva testisa, kod 41 psa (56,9 %) je utvrđen tumor testisa. Od 41 psa s tumorom testisa kod 23 psa (56,1 %) u oba testisa su utvrđeni tumori. Ako su psi imali jedan tumorski promijenjen testis, a drugi degenerativan ili histopatološki testis bez patologije, svrstani su u skupinu pasa s tumorom testisa.

U 10 pasa (13,9 %) utvrđene su degenerativne promjene na oba testisa. Degenerativne promjene samo na jednom testisu utvrđene su kod 6 pasa, atrofija testisa kod 3 psa, a fibroza testisa kod 1 psa, dok je drugi testis u svim slučajevima bio tumorski promijenjen. U slučaju da je pas imao jedan zdravi testis, a drugi degenerativan, svrstan je u skupinu degeneracija. Kod 21 (29,2 %) psa tumori nisu utvrđeni niti u jednom testisu (slika 9 i 10).



Slika 9. Prikaz skupina pasa na temelju histopatološkog nalaza testisa

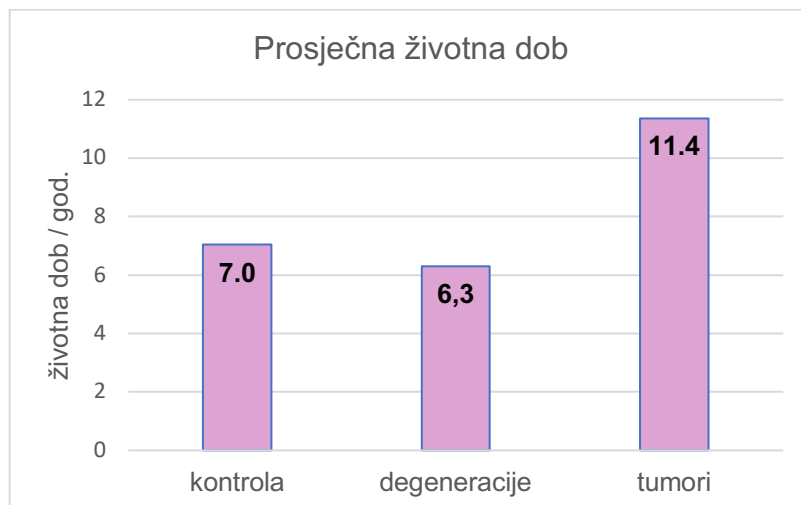




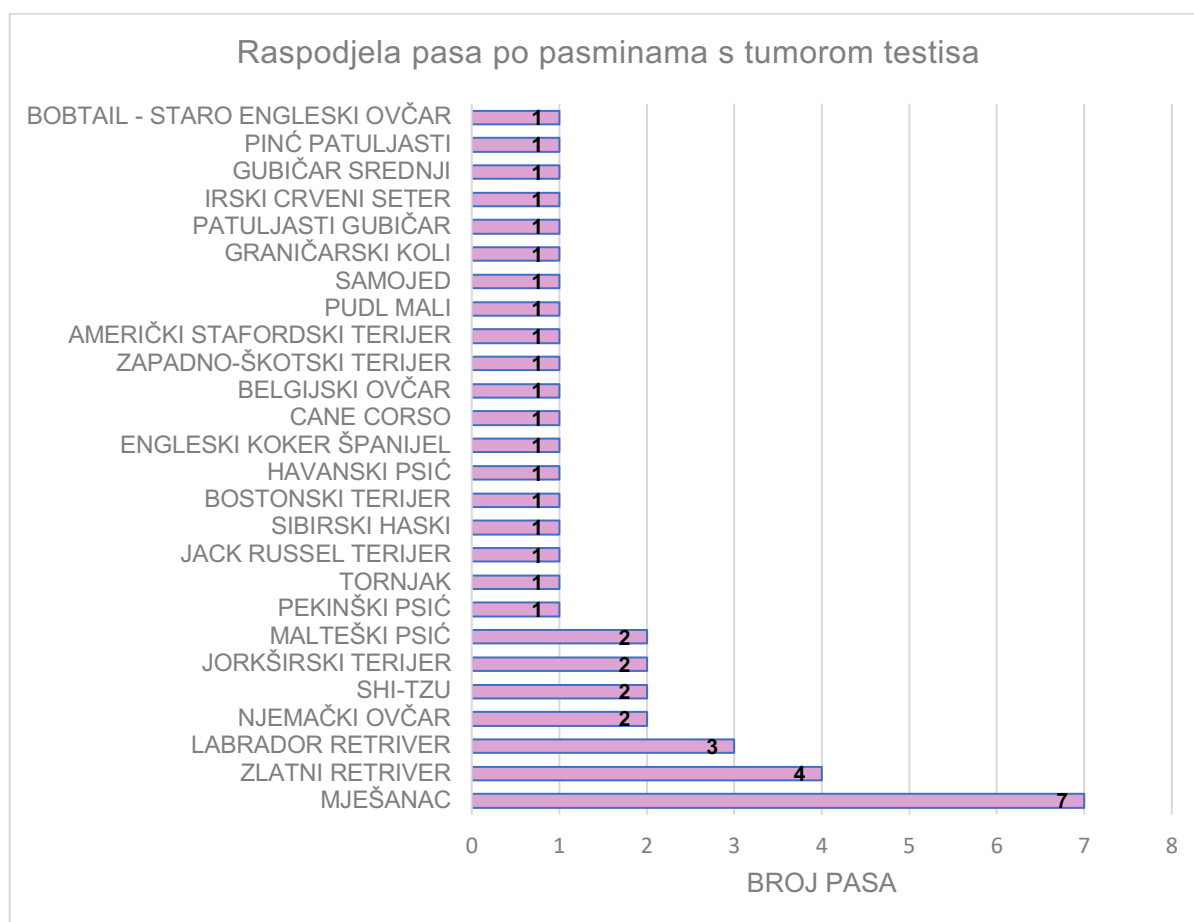
Slika 10. Grafički prikaz raspodjele pasa po skupinama na temelju histopatološkog nalaza izražen u postocima

S obzirom na dob pasa koji su bili uvršteni u istraživanje, ona je bila u rasponu od 1 do 18 godina, a prosječna dob svih pasa uvrštenih u istraživanje bila je 9,4 godine. Gledajući po skupinama, u skupini tumora testisa prosječna dob iznosila je 11,4 godina, u skupini degeneracija 6,3 godina, dok je u kontrolnoj skupini iznosila 7,0 godine (slika 11).

Najčešće su se tumori testisa pojavljivali kod mješanaca pa je tako od ukupno 41 psa s tumorom testisa mješanaca bilo 7 (17,0 %). Sljedeći su po učestalosti bili zlatnih retriveri kojih je ukupno bilo 4 (9,7 %), zatim 3 labrador retrievera (7,3 %), a po 2 psa su bila pasmine njemački ovčar, shi-tzu, jorkširski terijer i malteški psić, dok je od ostalih pasmina bila zastupljena po jedna životinja (slika 12).



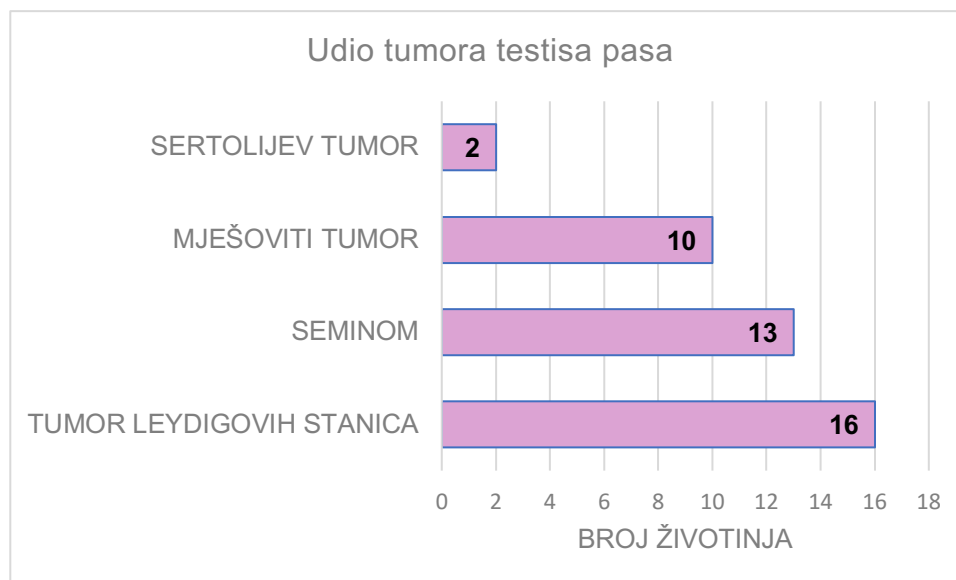
Slika 11. Prosječna životna dob pasa razvrstana po skupinama



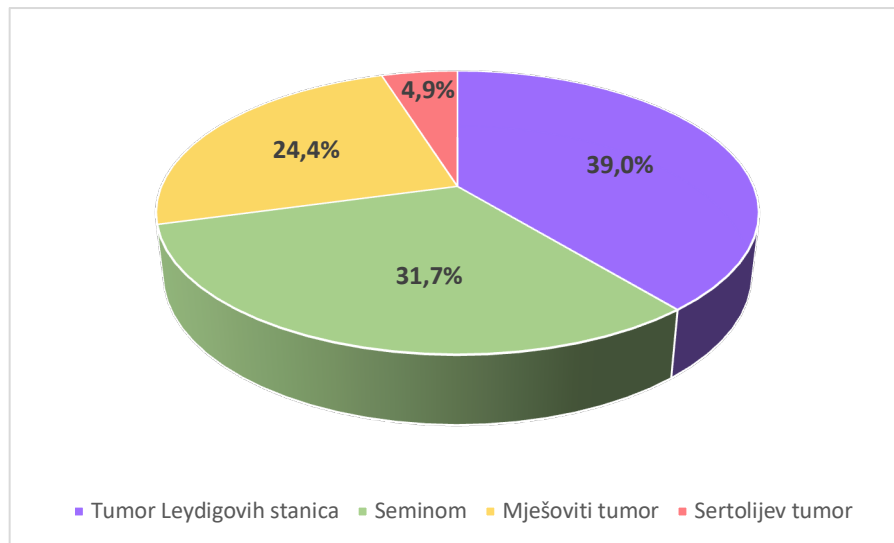
Slika 12. Udio pojedinih pasmina pasa kod kojih su dijagnosticirani tumori testisa

Od svih pasa koji su ušli u istraživanje, 6 pasa (8,3 %) bili su kriptorhidi, od čega su 4 psa (66,6 %) bili unilateralni kriptorhidi, dok su 2 psa (33,3 %) bili bilateralni kriptorhidi. Kod unilateralnih kriptorhida, histopatološki nalaz kod jednog psa (2 godine, šarpej) bili su funkcionalni testisi bez patoloških promjena, kod drugog psa (2 godine, njemački ovčar) nalaz oba testisa odgovarao je degenerativnim promjenama sjemenih kanalića, kod trećeg psa (8 godina, irski crveni seter) degenerativne promjene nađene su kod kriptorhidnog testisa, dok je kod drugog spušenog testisa nalaz odgovarao mješovitom tumoru (SCT + SEM). Četvrti pas (2 godine, lagotto romagnolo) nalaz kriptorhidnog testisa odgovarao je testikularnoj atrofiji, dok je drugi testis imao izražene degenerativne promjene. Kod bilateralnih kriptorhida, jedan je pas (7 godina, zapadnoškotski terijer) u jednom testisu imao dijagnosticiran intratubularni seminom, dok je drugi testis imao atrofiju i fibrozu intersticija. Drugi bilateralni kriptorhid (1 godina, velški korgi) imao je oba degenerativna testisa. Zaključno, u 6 kriptorhidnih pasa, odnosno u ukupno 8 kriptorhidnih testisa, tumorska promjena testisa nađena je samo na jednom testisu (12,5 %).

Od broja pasa s dijagnosticiranim tumorom testisa (N = 41), najčešće zastupljeni su bili tumori Leydigovih stanica gdje je isti dijagnosticiran kod 16 pasa (39,0 %), a udio pasa s ostalim tipovima tumora bio je: seminomi 13 (31,7 %), mješoviti tumori 10 (24,4 %) te Sertolijevi tumori 2 (4,9 %) (slika 13 i 14).



Slika 13. Udio pojedinih histoloških tipova tumora testisa istraživanih pasa



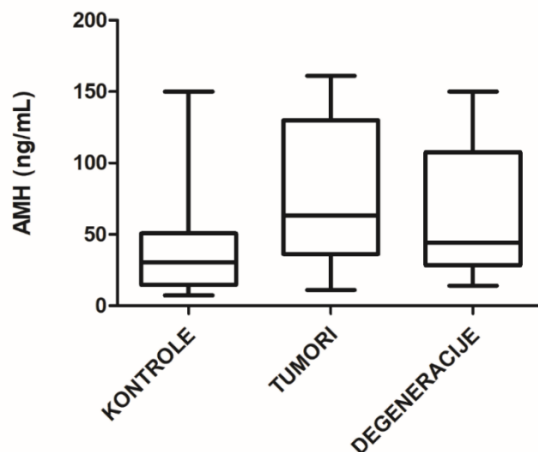
Slika 14. Grafički prikaz raspodjele tipova tumora testisa na temelju histopatološkog nalaza izražena u postocima

## 5.2. EKSPRESIJA ANTI-MÜLLEROVA HORMONA IZ SERUMA

Na temelju histopatološkog nalaza psi su svrstani u određene skupine radi određivanja koncentracije serumskog AMH. Psi koji su imali isti tip tumora na oba testisa ili su imali samo jedan testis zahvaćen jednim tipom tumora, svrstani su u adekvatnu skupinu tumora prema histopatološkom nalazu. Ukoliko je pas imao jedan degeneracijski ili zdravi testis, a drugi tumorozno promijenjen, također je svrstan u skupinu tumora. Ukoliko je pas imao različiti nalaz tumora u oba testisa ili je u jednom testisu imao dva tipa tumora, stavljen je u skupinu mješovitih tumora.

Razlike u koncentracijama AMH u serumu između skupina dobivene su Kruskal-Wallisovim testom s odgovarajućim *post-hoc* testom, pri čemu se vrijednost  $p < 0,05$  smatrala statistički značajnom, korištenjem programa GraphPadPrism verzija 5 software (San Diego, SAD).

Uspoređujući međusobno skupine (kontrola N = 21, tumori N = 40 i degeneracije n = 10), otkrivena je statistička značajnost ( $p < 0,001$ ). *Post-hoc* testom otkriveno je da postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,01$ ) između kontrolne skupine i skupine tumora vezana uz ekspresiju AMH u serumu. Uspoređujući kontrolnu skupinu i skupinu degeneracije te skupine tumora i degeneracije ne dobivamo statističku značajnost (graf 1).



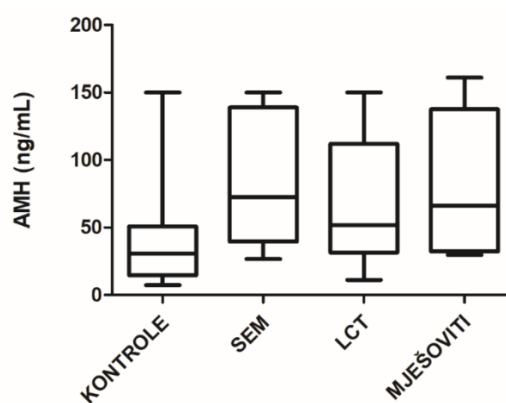
Graf 1. Prikaz koncentracije AMH dobiven ELISA metodom između kontrolne skupine, degeneracija i tumora; kutijasti dijagram prikazuje odnos minimuma i maksimuma, donjega i gornjega kvartila, a horizontalna crta predstavlja medijan

Najviša vrijednost AMH u serumu utvrđena je u skupini tumora (median (Mdn) = 63,2 ng/mL), dok je u skupini degeneracija koncentracija bila niža (Mdn = 44,3 ng/mL) kao i kod kontrolne skupine (Mdn = 30,5 ng/mL) (tablica 3).

Tablica 3. Koncentracija AMH u serumu zdravih pasa (K), pasa s tumorom (T) i pasa s degeneracijom testisa (D) s prikazanim medijanom i intrakvartilnim rasponom po skupinama; *p*-vrijednost dobivena je Kruskal-Wallisovim testom.

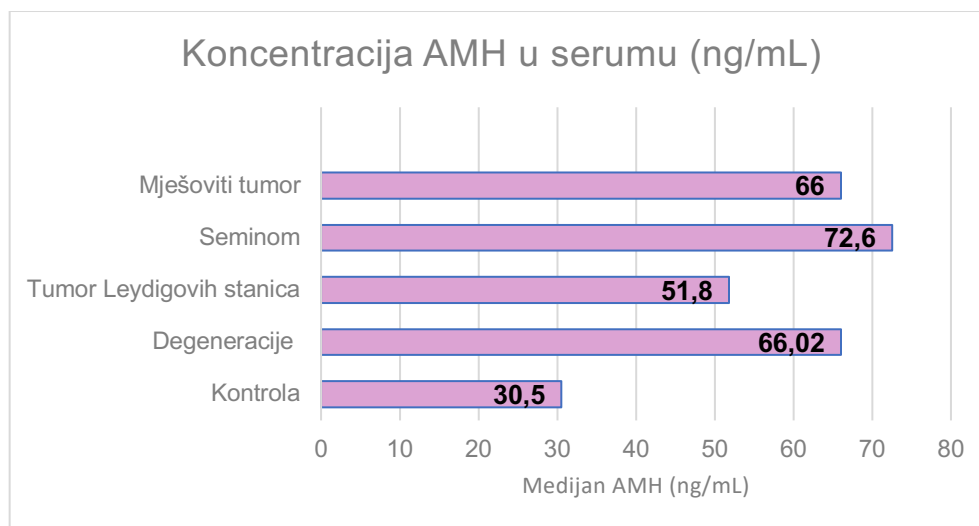
	N	medijan (ng/mL)	Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> (ng/mL)	p
<b>K</b>	21	30,5	14,6 – 50,8	<0,0067
<b>D</b>	10	44,3	28,4 – 107,6	
<b>T</b>	40	63,2	36,2- 129,9	

Uspoređujući dobivenu koncentraciju AMH između kontrolne skupine i podskupina tumora (SEM, LCT i mješoviti) *post-hoc* testom dobiva se statistički značajna razlika ( $p < 0,016$ ). Analizirajući međusobno podskupine tumora i kontrolnu skupinu sa svakom podskupinom tumora, jedina statistička značajnost postoji između kontrolne skupine i seminoma ( $p < 0,05$ ). Skupina pasa sa Sertolijevim tumorom nije statistički analizirana zato što su ukupno samo 2 psa imala isključivo Sertolijev tumor, dok su ostali psi obično uz Sertolijev tumor imali i drugi tip tumora čime su svrstani u kategoriju mješovitih tumora (graf 2).



Graf 2. Prikaz koncentracije AMH dobiven ELISA metodom između skupina tumora i kontrolne skupine; kutijasti dijagram prikazuje odnos minimuma i maksimuma, donjeg i gornjeg kvartila, a horizontalna crta predstavlja medijan

Najviša koncentracija AMH utvrđena je u skupini seminoma (Mdn = 72,6 ng/mL), zatim u mješovitim tumorima (Mdn = 66,0 ng/mL), tumorima Leydigovih stanica (Mdn = 51,8 ng/mL), dok je u kontrolnoj skupini utvrđena značajno niža koncentracija AMH (Mdn = 30,5 ng/mL). U skupini pasa s degenerativnim testisima koncentracija AMH bila je MDN = 66,02 ng/mL. Ukoliko uzmemo u obzir skupinu pasa s SCT-om (N = 2), koncentracija AMH u serumu imala bi visoku vrijednost (Mdn = 137,7 ng/mL) (slika 15 i tablica 4).



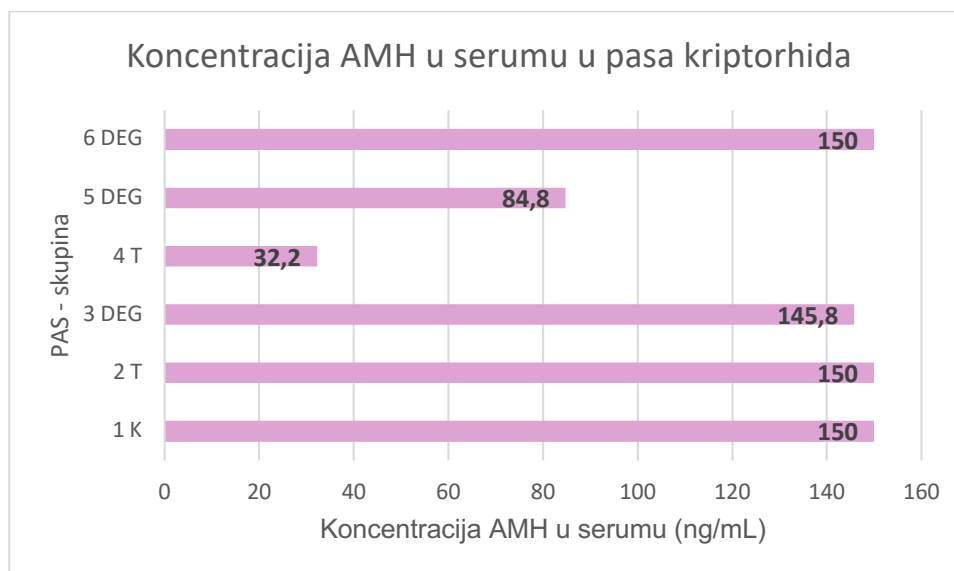
Slika 15. Prikaz koncentracije AMH u serumu (ng/mL) po određenim skupinama

Tablica 4. Koncentracija AMH s prikazanim medijanom i intrakvartilnim rasponom po podskupinama tumora (SEM – seminomi, LCT – tumor Leydigovih stanica, MJE – mješoviti tumor) u odnosu na kontrolnu skupinu (K); p vrijednost dobivena je Kruskal-Wallisovim testom.

	N	medijan (ng/mL)	Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> (ng/mL)	p
<b>K</b>	21	30,5	14,5-50,8	<0,016
<b>SEM</b>	12	72,6	39,6-138,9	
<b>LCT</b>	15	51,8	31,4-111,9	
<b>MJE</b>	11	66,0	32,2-137,5	

U određenom broju slučajeva koncentracija AMH u serumu bila je nemjerljivo visoka, stoga je u tim slučajevima uzeta vrijednost 150 ng/mL. Naime kod skupine s SCT-om jedan pas imao je nemjerljivo visoku vrijednost, dok su kod SEM-a zabilježena 3 psa, kod LCT-a po 2 psa, kod skupine sa mješovitim tumorima zabilježen je 1 pas u skupini degeneracija, a u kontrolnoj skupini 3 psa.

Od ukupno 6 pasa kriptorhida, medijan vrijednosti AMH u serumu iznosio je 147,9 ng/mL. Psi s navedenom vrijednosti od 150 ng/mL imali su nemjerljivo visoku koncentraciju AMH. Od 6 pasa kriptorhida, jedan je pripadao kontrolnoj skupini s vrijednosti AMH 150 ng/mL, dva su pripadala skupini tumora gdje su koncentracije AMH iznosile 150 ng/mL i 32,2 ng/mL, gdje je pas s visokom vrijednosti imao tumorski promijenjen nekriptorhidni testis, dok se kod psa s vrijednosti AMH 32,2 ng/mL radilo o seminomu. Ostala tri psa kriptorhida pripadala su skupini pasa s degeneracijom testisa, a vrijednosti AMH su im iznosile 150 ng/mL, 84,8 ng/mL i 145,8 ng/mL (slika 16).



Slika 16. Vrijednosti AMH u pasa kriptorhida u ng/mL (DEG – degeneracije, T – tumori, K – kontrola)



ROC analiza ELISA testa za serumsku koncentraciju AMH za razlikovanje zdravih pasa (kontrola) od pasa s tumorima pokazala je dobru dijagnostičku točnost (AUC, area under curve = 0,748). Izračunata je i optimalna granična vrijednost (cut-off) uz koju se postiže najučinkovitija diskriminacija zdravih i bolesnih pasa. Rezultati ROC analize prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. ROC analiza (eng. Receiver Operating Characteristic analysis) za procjenu dijagnostičke točnosti ELISA testa za serumsku koncentraciju AMH; Se- standard error (standardna pogreška. 95% CI (confidence interval) – 95% interval pouzdanosti. AUC (area under curve) - površina ispod ROC krivulje

	AUC ± SE (95% CI)	Granična vrijednost	Osjetljivost (%) 95% CI	Specifičnost (%) 95% CI	P vrijednost
AMH (ng/mL)	0,748 ± 0,07 (0,61-0,89)	> 41,90	75 (58,8-87,31)	71,43 (47,82-88,72)	0,002

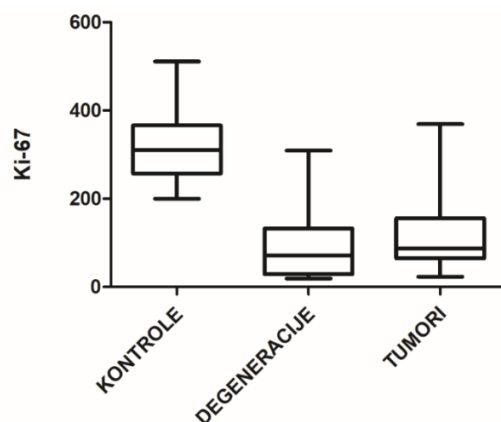
### 5.3.PRISUTNOST IMUNOHISTOKEMIJSKIH BILJEGA

#### 5.3.1. Biljeg Ki-67

Rezultati ekspresije biljega Ki-67 u tkivu testisa (slika 17) uspoređeni su Kruskal-Wallisovim testom uz razinu značajnosti  $p < 0,05$ . Uspoređujući međusobno skupine (kontrola, degeneracije i tumori), između sve 3 skupine postoji statistička značajnost ( $p < 0,0001$ ). *Post-hoc* testom otkriveno je da postoji statistički značajna razlika između kontrolne skupine i degeneracija ( $p < 0,0001$ ). Statistički značajna razlika također postoji između kontrolne skupine i tumora ( $p < 0,0001$ ). Uspoređujući skupine degeneracije i tumora ne dobivamo statističku značajnost (tablica 6, graf 3).

Tablica 6. Ekspresija biljega Ki-67 s prikazanim medijanom i intrakvartilnim rasponom u zdravim pasa (K), pasa s tumorom (T) i pasa s degeneracijom testisa (D), p vrijednost dobivena je Kruskal-Wallisovim testom

	N	medijan (N poz.jezgri/1000 tumorskih stan,)	Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> (N poz.jezgri/1000 tumorskih stan,)	p
<b>K</b>	21	310,0	257,0-366,0	<0,0001
<b>D</b>	10	71,0	28,5-132,8	
<b>T</b>	62	87,0	64,7-155,5	



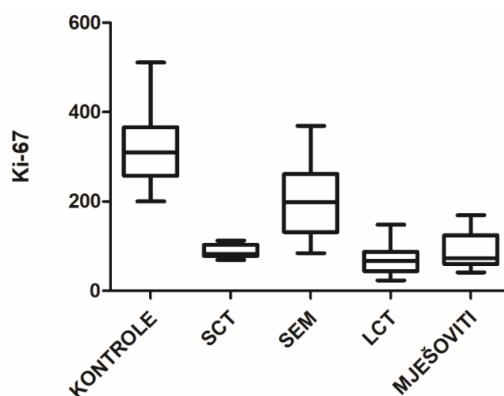
Graf 3. Prikaz ekspresije Ki-67 u obliku broja pozitivnih jezgri na 1000 tumorskih stanica između kontrolne skupine, degeneracija i tumora; kutijasti dijagram prikazuje odnos minimuma i maksimuma, donjeg i gornjeg kvartila, a horizontalna crta predstavlja medijan

Kruskal-Wallisovim testom uspoređivane su kontrolna skupina i podtipovi tumora (SCT, SEM, LCT i mješoviti tumori) gdje je dobivena statistički značajna razlika između skupina ( $p < 0,0001$ ). U ovoj statističkoj obradi uvršteni su i Sertolijevi tumori budući da je ekspresija Ki-67 određivana za svaki tumor posebno u odnosu na koncentraciju AMH gdje je vrijednost određivana za svaku životinju u odnosu na koncentraciju AMH u serumu. *Post-hoc* testom dobiva se statistički značajna razlika između kontrolne skupine i SCT-a ( $p < 0,01$ ), kontrolne skupine i LCT-a ( $p < 0,0001$ ), kontrolne skupine i mješovitih tumora ( $p < 0,0001$ ) te između SEM-a i LCT-a ( $p < 0,0001$ ).

Između kontrolne skupine i SEM-a, SCT-a i SEM-a, SCT-a i LCT-a, SCT-a i mješovitih tumora, SEM-a i mješovitih tumora te LCT-a i mješovitih tumora nije bilo statistički značajne razlike (tablica 7, graf 4).

Tablica 7. Ekspresija biljega Ki-67 s prikazanim medijanom i intrakvartilnim rasponom po podskupinama tumora (SCT – tumor Sertolijevih stanica, SEM – seminomi, LCT – tumor Leydigovih stanica, MJE – mješoviti tumor) u odnosu na kontrolnu skupinu (K), p vrijednost dobivena je Kruskal-Wallisovim testom

	N	medijan (ng/mL)	Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> (ng/mL)	p
<b>K</b>	21	310,0	257,0-366,0	<0,0001
<b>SCT</b>	6	82,0	78,0-102,0	
<b>SEM</b>	21	198,0	131,0-261,5	
<b>LCT</b>	28	66,5	44,0-87,0	
<b>MJE</b>	7	73,0	60,0-124,0	

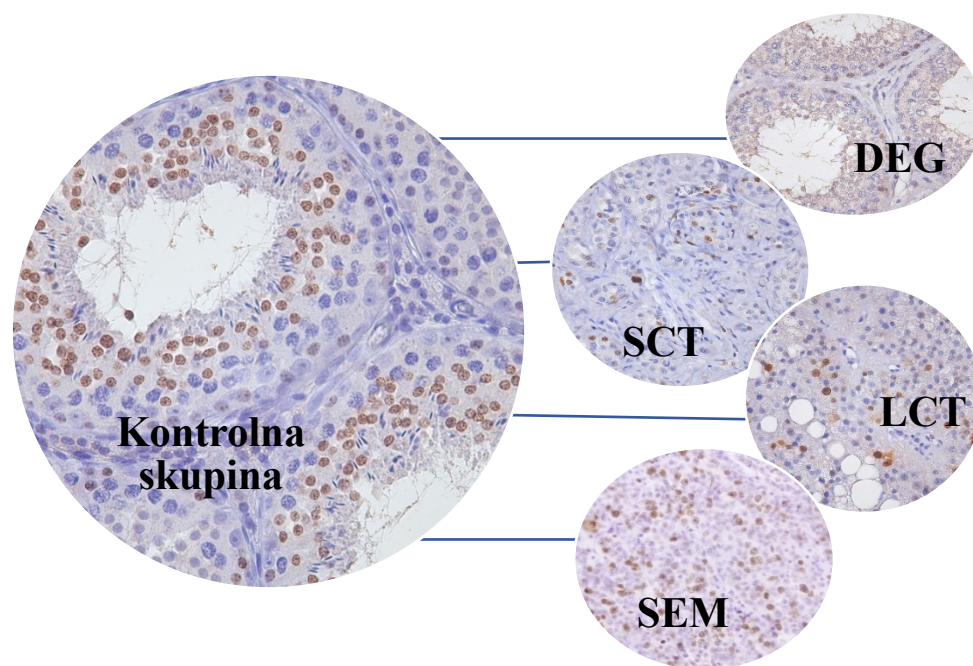


Graf 4. Prikaz ekspresije Ki-67 u obliku broja pozitivnih jezgri na 1000 tumorskih stanica između kontrolne skupine i podskupina tumora (SCT – tumor Sertolijevih stanica, SEM – seminomi, LCT – tumor Leydigovih stanica i mješoviti), kutijasti dijagram prikazuje odnos minimuma i maksimuma, donjeg i gornjeg kvartila, a horizontalna crta predstavlja medijan

ROC analiza za imunohistokemijsku analiza biljega Ki-67 pokazala je vrlo dobru dijagnostičku točnost (AUC = 0,955), te je izračunata optimalna granična vrijednost (< 207,00 broja pozitivnih jezgri/1000 tumorskih stanica), uz koju se postiže 87,10% osjetljivosti i 95,24% specifičnosti. Rezultati ROC analize prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. ROC analiza (eng. Receiver Operating Characteristic analysis) za procjenu dijagnostičke točnosti za imunohistokemijsku analizu biljega Ki-67; Se- standard error (standardna pogreška. 95% CI (confidence interval) – 95% interval pouzdanosti. AUC (area under curve) - površina ispod ROC krivulje.

	AUC ± SE (95% CI)	Granična vrijednost	Osjetljivost (%) 95% CI	Specifičnost (%) 95% CI	P vrijednost
Ki-67 (N poz. jezgri/1000 tumorskih stanica)	0,955 ± 0,02 (0,92-0,99)	< 207,00	87,10 (76,15-94,26)	95,24 (76,18-99,88)	< 0,0001

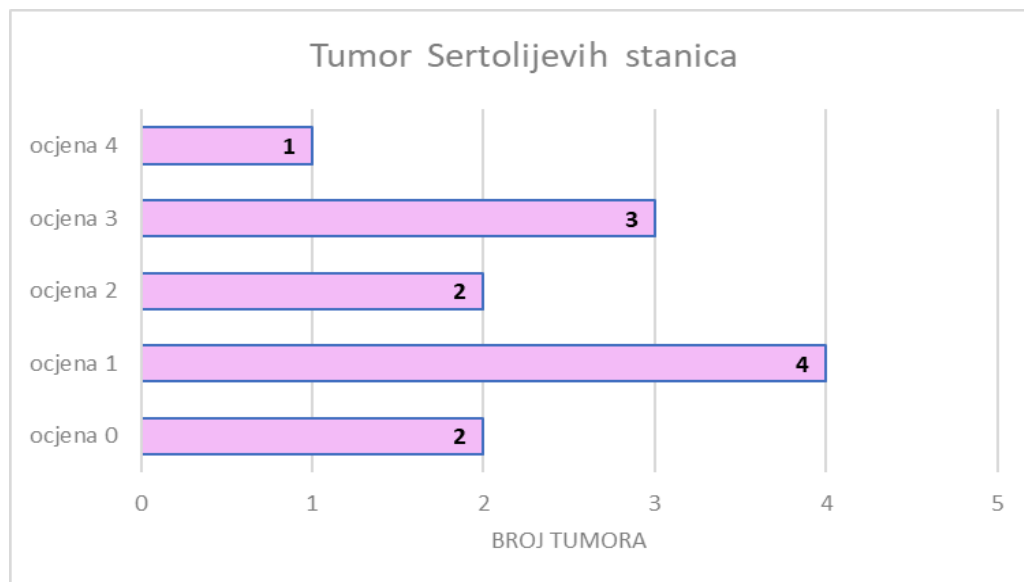


Slika 17. Histopatološki prikaz imunohistokemijske ekspresije Ki-67 na svim istraživanim skupinama pasa, povećanje 40x (Autor: M. Hohšteter)

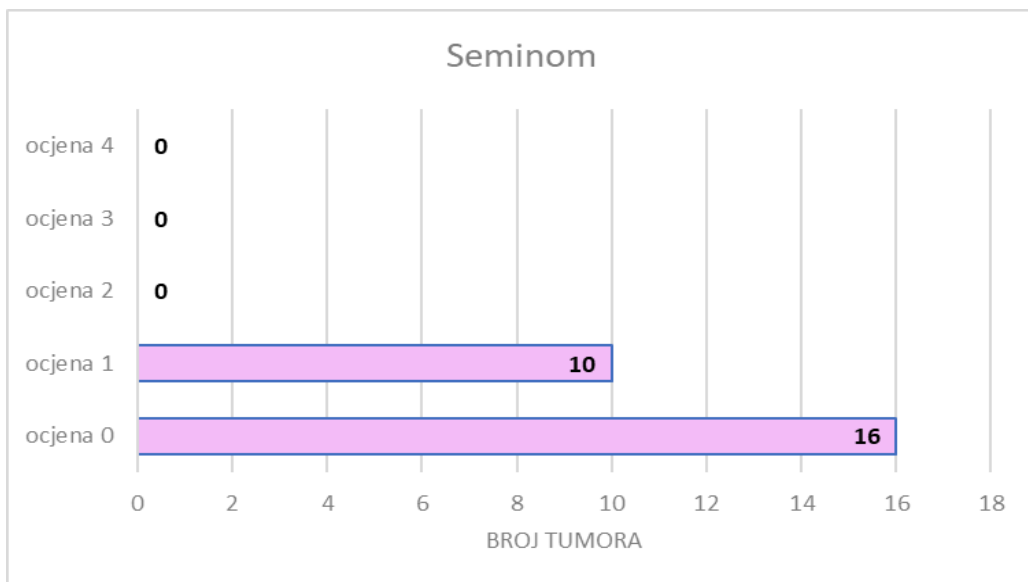
### 5.3.2. Biljeg anti-Müllerov hormon

Svaki testis je bio posebno podvrgnut imunohistokemijskoj analizi, pri čemu ako je postojao testis s mješovitim tumorom (2 tipa tumora unutar jednog testisa) svaki tumor se posebno procjenjivao na ekspresiju biljega AMH. Iz tog razloga u ovoj analizi imamo ukupno 12 tumora Sertolijevih stanica, 26 seminoma, 33 tumora Leydigovih stanica. Kod pasa s degenerativnim testisima (N = 10) i zdravim testisima (kontrolna skupina) (N = 21) procjenjivao se samo po jedan testis vezan uz imunohistokemijsku ekspresiju biljega AMH. Za kvantifikaciju reakcije AMH biljega procjenjivao se postotak obojenih stanica.

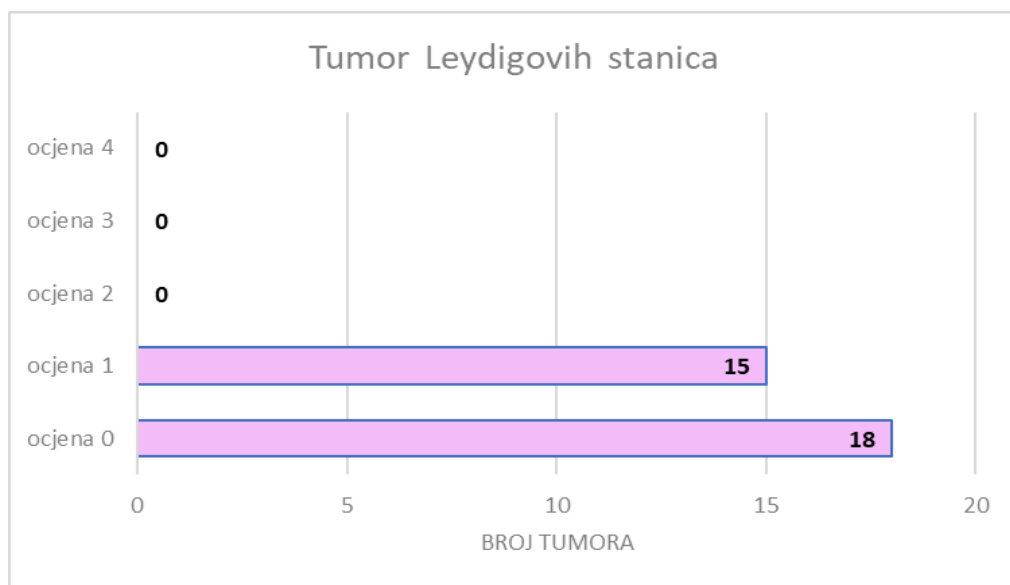
Zatim se koristio sustav bodovanja na način: 0 % pozitivnih stanica dodijeljena je ocjena 0, <5 % pozitivnih stanica dodijeljena je ocjena 1; 6-30 % ocjena 2, 31-70 % ocjena 3, 71-100 % ocjena 4. Na slikama 18, 19, 20, 21 i 22 vidljiva je raspodjela broja određenog tipa tumora prema ocjenama.



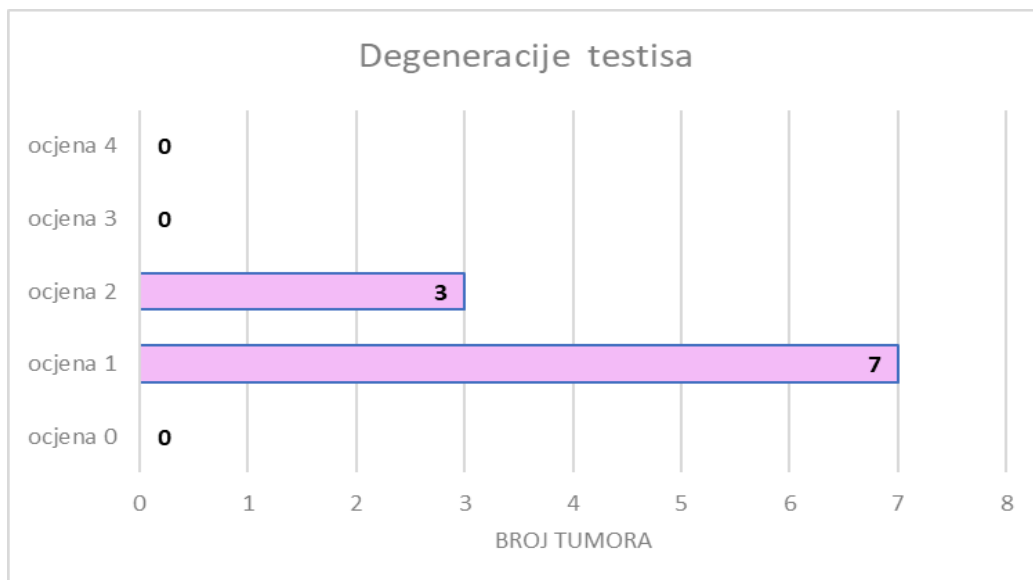
Slika 18. Prikaz imunohistokemijske ekspresije AMH na temelju postotka obojenih stanica (pozitivne stanice na ekspresiju AMH biljega) u pasa s tumorom Sertolijevih stanica (N = 12)



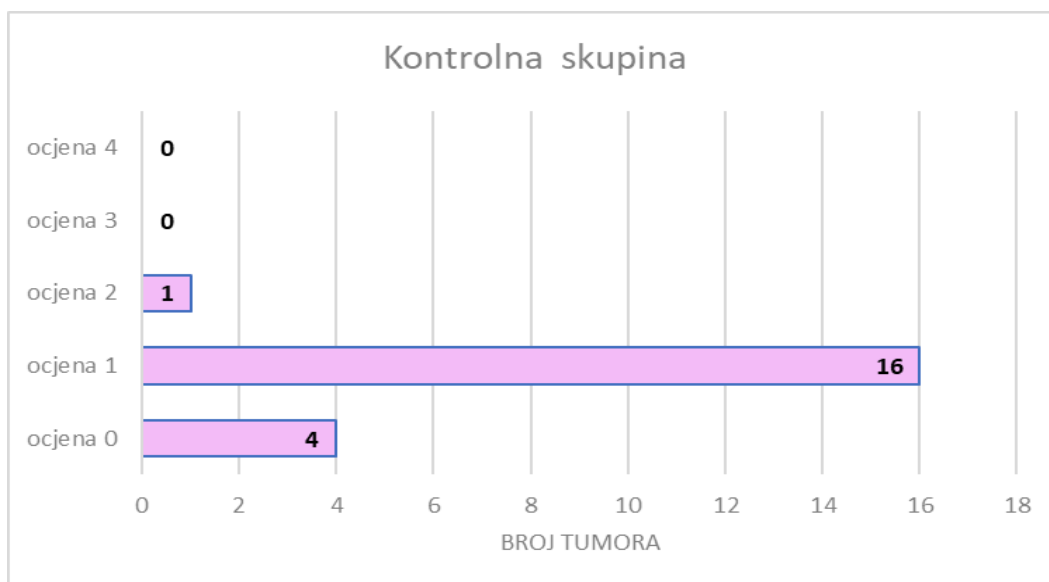
Slika 19. Prikaz imunohistokemijske ekspresije AMH na temelju postotka obojenih stanica (pozitivne stanice na ekspresiju AMH biljega) u pasa sa seminomom (N = 26)



Slika 20. Prikaz imunohistokemijske ekspresije AMH na temelju postotka obojenih stanica (pozitivne stanice na ekspresiju AMH biljega) u pasa s tumorom Leydigovih stanica (N = 33)



Slika 21. Prikaz imunohistokemijske ekspresije AMH na temelju postotka obojenih stanica (pozitivne stanice na ekspresiju AMH biljega) u pasa s degeneracijom testisa (N = 10)



Slika 22. Prikaz imunohistokemijske ekspresije AMH na temelju postotka obojenih stanica (pozitivne stanice na ekspresiju AMH biljega) u kontrolnoj skupini pasa (N = 21)

Rezultati ekspresije biljega AMH u tkivu testisa (slika 23, 24, 25 i 26) uspoređeni su GENMODE PROCEDURE analizom uz razinu značajnosti  $p < 0,05$ . Uspoređujući međusobno kontrolnu skupinu, skupinu pasa s degeneracijom testisa te skupinu pasa s tumorskim testisima, a uzimajući u obzir i tipove tumora (Sertolijev tumor, seminom i tumor Leydigovih stanica), između svih skupima postoji statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) osim između skupina Sertolijevih tumora i degeneracija ( $p = 0,38$ ) te kontrolne skupine i tumora Leydigovih stanica ( $p = 0,59$ ) što je vidljivo u tablici 9.

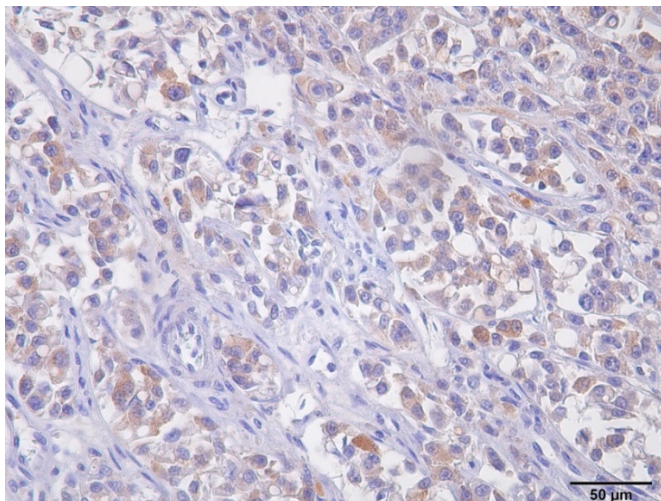
Tablica 9. Rezultati ekspresije imunohistokemijskog biljega AMH uspoređujući međusobno skupine i podskupine tipova tumora testisa u pasa dobiveni GENMODE PROCEDURE analizom (OR – omjer izgleda; \*\*IPOR – 95 % interval povjerenja omjera izgleda)

Skupine	OR*	IPOR**	p vrijednost
<b>Seminom : Sertolijev tumor</b>	5,8	1,0 – 31,9	0,04
<b>Tumor Leydigovih stanica : Sertolijev tumor</b>	26,9	4,8 – 152,3	0,00
<b>Sertolijev tumor : Degeneracije</b>	2,2	0,4 – 12,2	0,38
<b>Kontrola : Sertolijev tumor</b>	35,6	6,0 – 211,8	0,00
<b>Tumor Leydigovih stanica : Seminom</b>	4,7	1,4 – 15,2	0,01
<b>Seminom : Degeneracije</b>	12,5	2,1 – 74,5	0,00
<b>Kontrola : Seminom</b>	6,1	1,8 – 21,5	0,00
<b>Tumor Leydigovih stanica : Degeneracije</b>	58,3	9,5 – 359,5	0,00
<b>Kontrola : Tumor Leydigovih stanica</b>	1,3	0,5 – 3,7	0,59
<b>Kontrola : Degeneracije</b>	77,0	11,9 – 498,8	0,00

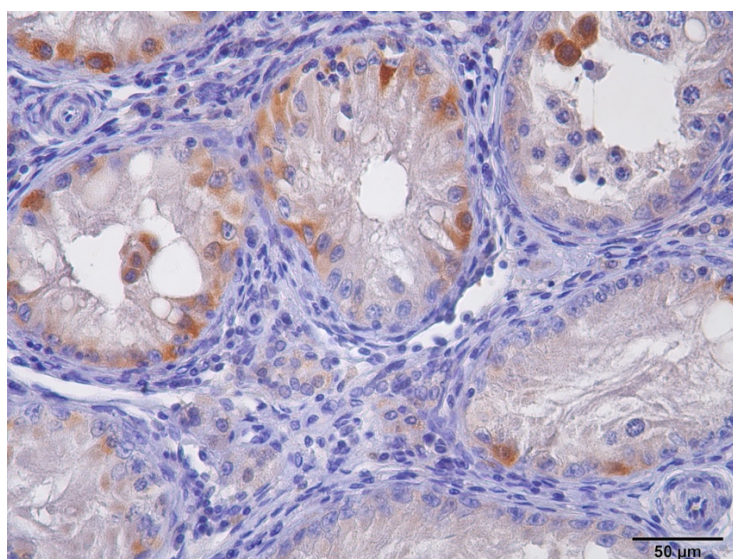
Skupina SEM ima 5,7 puta manji izgled za ekspresiju AMH u odnosu na skupinu SCT ( $p = 0,04$ ). Skupina LCT ima 26,9 puta manju mogućnost ekspresije AMH u odnosu na SCT skupinu ( $p = 0,00$ ). Kontrolna skupina pasa ima 35,6 puta manji izgled za pozitivnu ekspresiju AMH u odnosu na SCT skupinu ( $p = 0,00$ ). Skupina LCT ima 4,7 puta manji izgled ekspresije AMH u odnosu na skupinu SEM ( $p = 0,01$ ). Skupina SEM ima 12,5 puta manji izgled pozitivne ekspresije AMH biljega u odnosu na pse s degenerativnim testisima ( $p = 0,00$ ).



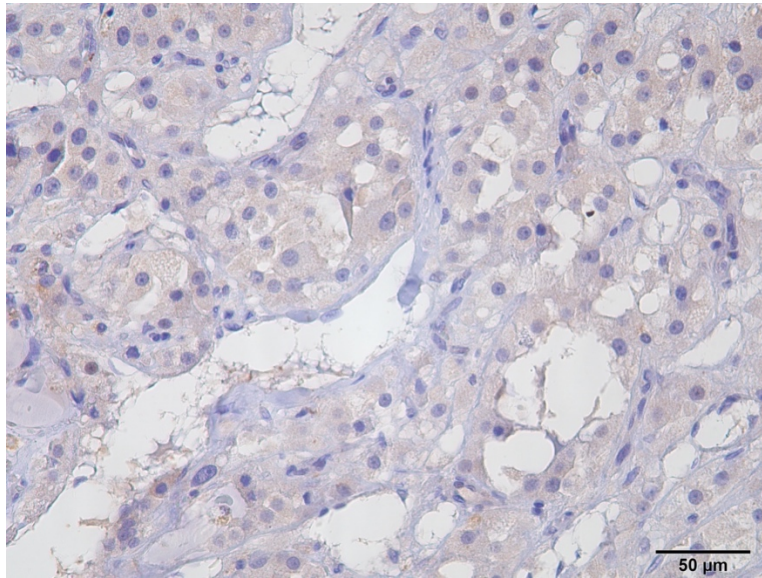
Kontrolna skupina pasa ima 6,2 puta manji izgled za pozitivnu ekspresiju AMH biljega u odnosu na skupinu SEM ( $p = 0,00$ ). Skupina LCT ima 58,3 puta manju mogućnost ekspresije AMH u odnosu na pse s degeneracijom testisa ( $p = 0,00$ ). Kontrolna skupina pasa ima 77,0 puta manji izgled za ekspresijom AMH u odnosu na skupinu pasa s degeneracijom testisa ( $p = 0,00$ ).



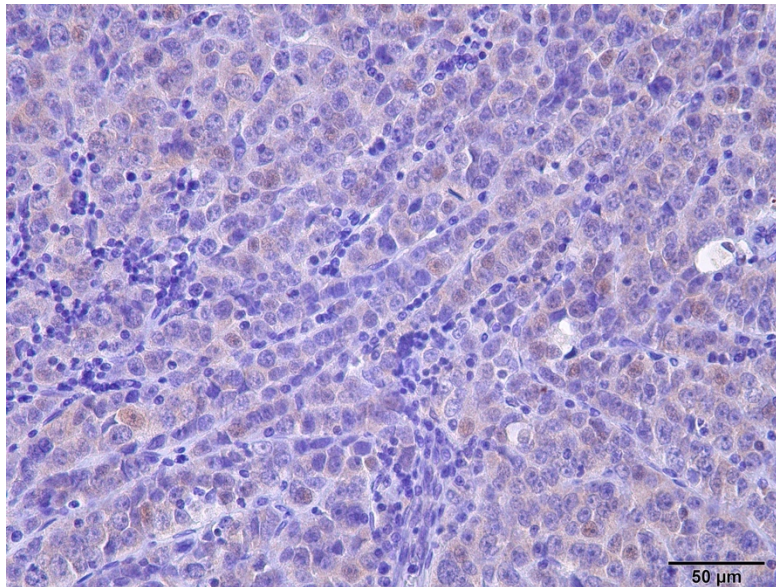
Slika 23. Histopatološki prikaz pozitivne imunohistokemijske ekspresije AMH u tumoru Sertolijevih stanica, povećanje 40x (autor: M. Hohšteter)



Slika 24. Histopatološki prikaz pozitivne imunohistokemijske ekspresije AMH u skupini pasa s degeneracijom testisa, povećanje 40x (autor: M. Hohšteter)



Slika 25. Histopatološki prikaz tumora Leydigovih stanica testisa pasa koji ne pokazuje pozitivnu imunohistokemijsku ekspresiju AMH biljega, povećanje 40x (autor: M. Hohšteter)



Slika 26. Histopatološki prikaz seminoma koji ne pokazuje pozitivnu imunohistokemijsku ekspresiju AMH biljega, povećanje 40x (autor: M. Hohšteter)

#### 5.4. REZULTATI PROTEOMSKJE ANALIZE SERUMA PRIMJENOM TEHNIKA LC-MS/MS

Proteomskom analizom temeljenom na obilježavanju TMT-om, analizirana su 72 uzorka seruma istraživanih pasa. Analiza prikupljenih podataka u Proteome Discovereru pokazala je da je ukupno identificirano 128 proteina s pomoću najmanje dva jedinstvena peptida i uz 1 % FDR. U daljnju statističku i bioinformatičku obradu uključeni su samo proteini koji su bili prisutni u najmanje 50 % uzoraka. U tablici 10 prikazani su različito eksprimirani proteini između skupine tumora i kontrola, zatim između degeneracija i kontrola (tablica 10) i između skupina tumora i degeneracija (tablica 11) s identifikacijskim brojem proteina, odnosno jedinstvenom oznakom proteina (engl. *accession ID*) iz baze UniProt (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.), oznakom gena, nazivom proteina, p vrijednosti i promjenom ekspresije između skupina,  $\log_2FC$  za proteine seruma istraživanih pasa. Pozitivne vrijednosti  $\log_2FC$  označavaju proteine s većom ekspresijom u skupini tumora u odnosu na kontrolnu skupinu, dok negativne vrijednosti označavaju manju ekspresiju kod pasa s tumorima u odnosu na kontrolnu skupinu.

Tablica 10. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u serumu pasa između skupina tumora i kontrole, identificiranih i kvantificiranih LC-MS/MS pristupom; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina, p vrijednost i promjena ekspresije između dvije skupine (log2FC) (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.)

<b>TUMORI : KONTROLE</b>				
<b>Jedinstvena oznaka proteina</b>	<b>Oznaka gena</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>p vrijednost</b>	<b>log2FC</b>
A0A8I3QH15	A2M	Alfa-2-makroglobulin	0,001	0,263
A0A8C0M9Q8	IGHA2	Protein koji sadržava Ig sličnu domenu	0,001	0,393
A0A8P0SIZ4	SERPINC1	Antitrombin III	0,005	-0,285
A0A8C0RLM6	GPLD1	Fosfatidilinozitol-glikan-specifična fosfolipaza D	0,007	0,203
A0A8C0NZN2	PROS1	Protein S	0,007	0,126
A0A8P0NZY6	ECM1	Ekstracelularni (izvanstanični) matriks protein 1	0,008	-0,263
A0A8C0TCZ2	SERPIND1	Član obitelji Serpin D	0,012	-0,107
A0A8C0P2W6	TFRC	Transferin receptor protein 1	0,024	-0,125
A0A8I3RV60	AMBP	Protein AMBP	0,024	-0,084
A0A8I3PDJ5	FETUB	Fetuin B	0,027	0,113
A0A8I3PRY0	IGHV3-74	Protein koji sadržava Ig sličnu domenu	0,028	0,612

Pozitivne vrijednosti log<sub>2</sub>FC označavaju proteine s većom ekspresijom u skupini degeneracija u odnosu na kontrolnu skupinu, dok negativne vrijednosti označavaju manju ekspresiju kod pasa s degeneracijama u odnosu na kontrolnu skupinu (tablica 11).

Tablica 11. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u serumu pasa između skupina degeneracija i kontrole, identificiranih i kvantificiranih LC-MS/MS pristupom; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina, p vrijednost i promjena ekspresije između dvije skupine (log<sub>2</sub>FC) (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.)

<b>DEGENERACIJE : KONTROLE</b>				
<b>Jedinstvena oznaka proteina</b>	<b>Oznaka gena</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>p vrijednost</b>	<b>log<sub>2</sub>FC</b>
A0A8C0SJE5	C7	Komplement C7	0,018	0,157
A0A8C0N8D3	GSN	Gelsolin	0,036	0,139
A0A8C0MCA4	IGKV2-30	Protein koji sadržava Ig sličnu domenu	0,049	0,311

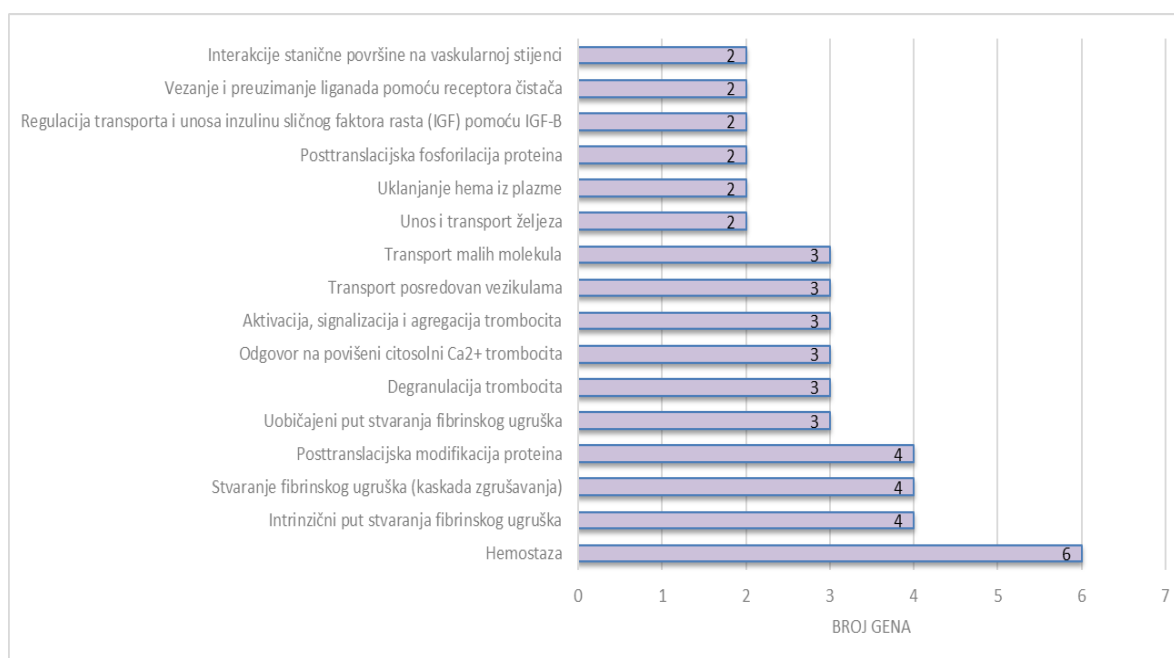
Pozitivne vrijednosti log<sub>2</sub>FC označavaju proteine s većom ekspresijom u skupini tumora u odnosu na skupinu degeneracija, dok negativne vrijednosti označavaju manju ekspresiju kod pasa s tumorima u odnosu na skupinu degeneracija (tablica 12).

Tablica 12. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u serumu pasa između skupina tumora i degeneracija, identificiranih i kvantificiranih LC-MS/MS pristupom; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina, p vrijednost i promjena ekspresije između dva uzorka (log2FC) (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.)

<b>TUMORI : DEGENERACIJE</b>				
<b>Jedinstvena oznaka proteina</b>	<b>Oznaka gena</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>p vrijednost</b>	<b>log2FC</b>
A0A8I3P3Z6	SERPINF2	Član obitelji Serpin F	0,000	-0,257
A0A8C0P2W6	TFRC	Transferinski receptorski protein 1	0,000	-0,229
A0A8I3PLX4	SHBG	Globulin koji veže spolne hormone	0,011	-0,251
A0A8I3QH15	A2M	Alfa-2-makroglobulin	0,014	0,291
A0A8C0NV01	ALB	Albumin	0,022	-0,631
A0A8C0NP43	KLKB1	Kallikrein B1	0,023	0,175

#### 5.4.1. Analiza bioloških puteva proteina seruma

Analiza je napravljena na proteinima koji su se pokazali kao značajno različiti između skupina tumora i kontrolne skupine (N = 16). Analiza bioloških puteva proteina seruma napravljena je pomoću bioinformatičkog alata Reactome te se 29 bioloških puteva pokazalo statistički značajnima (FDR < 0,05). Postavljen je dodatni kriterij da je u svakom biološkom putu prisutno najmanje 2 gena te se time reducirao broj puteva na 16 (slika 27). Većina proteina identificiranih i kvantificiranih u proteomu seruma pasa uključena je u hemostazu (N = 6). Ostali zastupljeni biološki putevi vezani su za stvaranje fibrinskog ugruška (N = 4), degranulaciju, aktivaciju, agregaciju i signalizaciju trombocita (N = 3) i drugi.



Slika 27. Prikaz značajnih bioloških puteva s najmanje 2 gena/puta proteoma seruma pasa napravljen pomoću alata Reactome

## 5.5.REZULTATI PROTEOMSKE ANALIZE TKIVA TESTISA PRIMJENOM TEHNIKA LC-MS/MS

Proteomskim pristupom temeljenim na obilježavanju TMT-om, analizirana su 92 uzorka tkiva testisa pasa od čega je od skupine tumora bio 61 uzorak, degeneracija 10 uzoraka, a kontrola 21 uzorak. Analiza prikupljenih podataka u Proteome Discovereru pokazala je da je ukupno identificirano 772 proteina s pomoću najmanje dva jedinstvena peptida i uz 1 % FDR. U daljnju statističku i bioinformatičku obradu uključeni su samo proteini koji su bili prisutni u najmanje 50 % uzoraka. Statističkom analizom dobiveno je da je 71 protein bio značajno različit između sve tri skupine (kontrola, degeneracije, tumori). U tablici 13 prikazan je identifikacijski broj proteina, odnosno jedinstvena oznaka proteina (engl. *accession ID*) iz baze UniProt (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.), oznaka gena, naziv proteina, p vrijednost uz FDR korekciju, broj jedinstvenih peptida i razlika u ekspresiji između pojedinih skupina izražena u log<sub>2</sub> bazi (log<sub>2</sub>FC).

Tablica 13. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u tkivu testisa pasa identificiranih i kvantificiranih LC-MS/MS pristupom.; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina, p vrijednost uz FDR korekciju, broj jedinstvenih peptida i razlika u ekspresiji između pojedinih skupina izražena u log<sub>2</sub> bazi (T – tumori, D – degeneracije, K – kontrole) (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.)



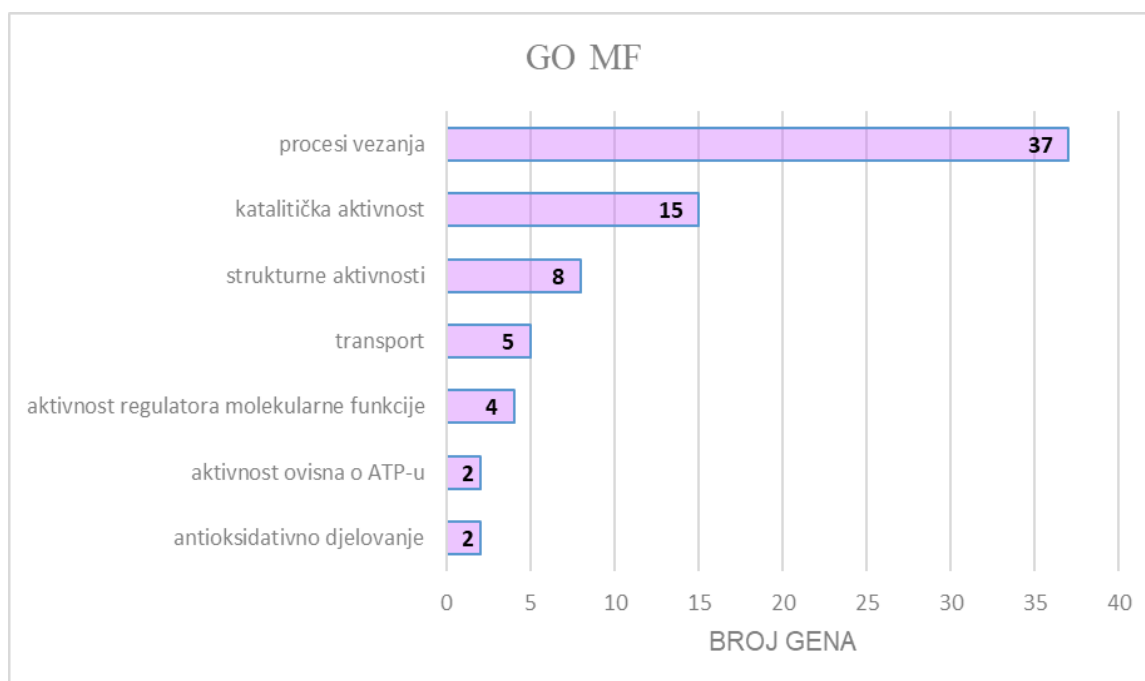
Jedinstvena oznaka proteina	Oznaka gena ( <i>Canis lupus</i> )	Naziv proteina	p vrijednost uz FDR korekciju	log2FC (T/D)	log2FC (T/K)	log2FC (D/K)
A0A8P0SCP9	HSP90B1	Protein toplinskog šoka 90 beta član obitelji 1	0.00032751	-0,166	-0,233	-0,067
A0A8I3NCJ5	HSPA5	78 kDa protein reguliran glukozom	0.00032751	-0,048	-0,161	-0,113
A0A8I3S9B9	YBX3	Y-box vezni protein 3	0.00032751	-0,128	-0,193	-0,065
A0A8C0P9Q2	HSPA2	Član 2 obitelji proteina toplinskog šoka A (Hsp70)	0.00032751	-0,265	-0,311	-0,046
A0A8C0P3P6	TUBB4A	Tubulinski beta lanac	0.00032856	-0,149	-0,244	-0,094
A0A8C0TT11	PRDX4	Peroksiredoksin 4	0.00032856	-0,120	-0,282	-0,162
A0A8I3NM03	CALR	Calreticulin	0.00048319	0,028	-0,205	-0,233
A0A8C0MXY5	HSPA4L	Član 4 obitelji proteina toplinskog šoka A (Hsp70)	0.00067671	-0,149	-0,235	-0,086
A0A8C0LRX7	FTL	Feritin	0.00067671	0,335	0,365	0,030
A0A8C0Q965	PPA1	Anorganska difosfataza	0.00071126	-0,117	-0,263	-0,146
A0A8I3N6K0	TLN1	Talin 1	0.00071126	0,074	0,126	0,052
A0A8C0N8E3	VIM	Vimentin	0.0014809	0,120	0,257	0,138
A0A8C0K4U7	YBX2	Y-box vezni protein 2	0.0016492	-0,239	-0,310	-0,070
A0A8P0ST52	CALM1	Protein koji sadržava domenu EF	0.002014	-0,067	-0,405	-0,338
A0A8C0SJV6	PRDX3	Protein koji sadržava domenu tioredoksina	0.0023085	0,274	0,353	0,079
A0A8I3MJB3	LOC479911	Glutation S-transferaza	0.0027591	-0,235	-0,176	0,059
A0A8C0KY60	PRDX6	Peroksiredoksin-6	0.0028259	-0,106	-0,176	-0,070
A0A8I3MGJ0	HYOU1	Pojačano regulirana hipoksija 1	0.0028259	-0,058	-0,153	-0,094
A0A8C0Q883	IGHG1	Protein koji sadržava Ig-sličnu domenu	0.0033952	0,231	0,242	0,011
A0A8I3MWS0	A1BG	Alfa-1-B glikoprotein	0.0039558	0,229	0,196	-0,034
A0A8I3NCH2	ATP5F1B	Podjedinica ATP sintaze beta	0.0039558	-0,025	0,104	0,128
A0A8C0QYY6	MATR3	Matrin 3	0.0048525	-0,026	-0,153	-0,127
A0A8I3RSG3	LGALS7B	Actinin alfa	0.0048525	0,083	0,147	0,063
A0A8I3Q0F7	PDIA6	Protein disulfid-izomeraza A6	0.0051015	0,001	-0,164	-0,165
I7KJS3	JPT1	HN1	0.0051985	-0,160	-0,248	-0,087
A0A8P0PKF8	FABP5	Protein koji sadržava domenu proteina koji vežu citosolne masne kiseline	0.0060128	0,041	-0,153	-0,194
A0A8I3MXC5	HNRNPK	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein K	0.006309	-0,004	-0,117	-0,113
A0A8C0PIB7	LOC608051	Lanac tubulina alfa	0.0067783	-0,153	-0,279	-0,127
A0A8P0SI11	LOC119881680	Heterozni nuklearni ribonukleoprotein A3	0.0091446	-0,042	-0,139	-0,097

Jedinstvena oznaka proteina	Oznaka gena ( <i>Canis lupus</i> )	Naziv proteina	p vrijednost uz FDR korekciju	log2FC (T/D)	log2FC (T/K)	log2FC (D/K)
Q6TEQ7	ANXA2	Aneksin A2	0.0091567	-0,072	0,129	0,201
A0A8C0QSS8	PDIA3	Protein disulfid-izomeraza	0.0098203	-0,028	-0,140	-0,113
A0A8C0PED3	ATP2A2	Sarkoplazmatski/endoplazmatski retikulum kalcij ATPaza 2	0.011642	-0,186	-0,181	0,005
A0A8C0T783	FN1	Fibronektin	0.013213	0,141	0,142	0,002
A0A8I3PYN8	PTPA	Aktivator serin/treonin-protein fosfataze 2A	0.013213	-0,121	-0,141	-0,020
A0A8I3P5D6	PCBP2	Protein koji sadržava K homolognu domenu	0.013956	-0,120	-0,231	-0,111
A0A8C0LQ69	Histone H3.3	Histon H3	0.013996	-0,253	-0,186	0,067
A0A8C0TU91	DNPEP	Aspartil aminopeptidaza	0.013996	-0,020	-0,153	-0,133
A0A8C0Q3U2	PGK2	Fosfoglicerat kinaza	0.013996	0,141	-0,174	-0,315
A0A8C0M9Q4	HNRNPA2B1	Heterogeni nuklearni ribonukleoproteini A2/B1	0.01521	0,015	-0,132	-0,147
A0A8I3PQU8	YWHAQ	14-3-3 protein theta	0.015244	-0,142	-0,081	0,061
A0A8C0P5R9	COL6A3	Kolagen tip VI alfa 3 lanac	0.015594	-0,017	0,111	0,127
A0A8C0KQB8	VCP	ATPaza prijelaznog endoplazmatskog retikuluma	0.015594	-0,005	-0,062	-0,057
A0A8C0LTL0	TRIM28	Trodijelni motiv koji sadržava 28	0.015918	-0,001	-0,156	-0,155
A0A8I3NC22	CAP1	Protein povezan s adenilil ciklazom 1	0.016205	0,253	0,141	-0,112
A0A8C0P808	PPIA	Peptidil-proлил cis-trans izomeraza A	0.016724	0,080	-0,078	-0,158
A0A8C0JML3	Histone H4	Histon H4	0.017665	-0,299	-0,179	0,120
A0A8C0N277	CCNYL1	Ciklin Y kao 1	0.017708	-0,153	-0,248	-0,094
A0A8C0LB88	SPTAN1	Spectrin alfa, neeritocitni 1	0.017708	-0,024	0,058	0,082
A0A8I3NEW3	Histone H2A	Histon H2A	0.01801	-0,200	-0,138	0,062
A0A8C0TWT1	Histone H2B	Histon H2B	0.01864	-0,169	-0,142	0,027
A0A8C0TM59	LOC612605	L antigen član obitelji 3	0.020461	-0,135	-0,260	-0,125
A0A8I3P9E5	ACO1	Citoplazmatska akonitat hidrataza	0.021073	0,136	0,106	-0,029
A0A8C0REK5	VCL	Vinculin	0.021888	-0,083	-0,069	0,014
A0A8C0KKS9	PABPC1L	Tirozin 3-monooksigenaza/triptofan 5-monooksigenaza aktivacijski protein beta	0.021888	-0,052	-0,137	-0,085

Jedinstvena oznaka proteina	Oznaka gena ( <i>Canis lupus</i> )	Naziv proteina	p vrijednost uz FDR korekciju	log2FC (T/D)	log2FC (T/K)	log2FC (D/K)
A0A8I3NTN0	TOMM34	Translokaza vanjske mitohondrijske membrane 34	0.023368	-0,117	-0,135	-0,018
A0A8C0QKG4	ATP5F1A	Podjedinica ATP sintaze alfa	0.024006	0,033	0,072	0,039
A0A8I3S5D5	LOC119868531	Protein koji sadržava domenu vezanja DNA tipa HSF	0.02467	0,031	-0,203	-0,234
A0A8I3NY33	AHCY	Protein sličan S-adenozilhomocistein hidrolazi 1	0.026934	0,053	0,115	0,063
A0A8I3PX06	KCTD12	Domena tetramerizacije kalijevog kanala koja sadržava 12	0.03565	0,021	0,137	0,116
A0A8C0QI60	H2AC21	Histon H2A	0.040203	-0,243	-0,124	0,119 -0,029
A0A8C0TT24	KHSRP	Regulacijski protein za spajanje tipa KH	0.040203	-0,056	-0,085	-0,035
Q9XSB8	TPP1	Tripeptidil-peptidaza 1	0.040722	0,165	0,130	0,112
A0A8C0TC09	HSPD1	60 kDa protein toplinskog šoka, mitohondrijski	0.040722	0,027	0,139	-0,062
A0A8C0RG40	TUBB2B	Tubulinski beta lanac	0.040722	-0,046	-0,108	0,109
A0A8C0PDZ5	ANXA5	Annexin	0.040722	0,070	0,179	-0,068
A0A8C0TKY2	UBC	Polyubiquitin-C koji se cijepa na Ubiquitin	0.042812	-0,031	-0,098	-0,058
A0A8C0Z750	CCT4	T-kompleks protein 1 podjedinica delta	0.043417	-0,016	-0,075	-0,082
A0A8I3S2F3	SRSF7	Faktor spajanja 7 bogat serinom/argininom	0.045293	0,006	-0,076	-0,107
A0A8I3MZZ5	HNRNPM	Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein M	0.0457	-0,023	-0,131	-0,169
A0A8C0MXP1	SRSF1	Faktor spajanja bogat serinom/argininom 1	0.046814	0,078	-0,091	-0,067
A0A8I3PBU4	LOC119866377	Tubulinski alfa lanac	0.046941	-0,166	-0,233	-0,113

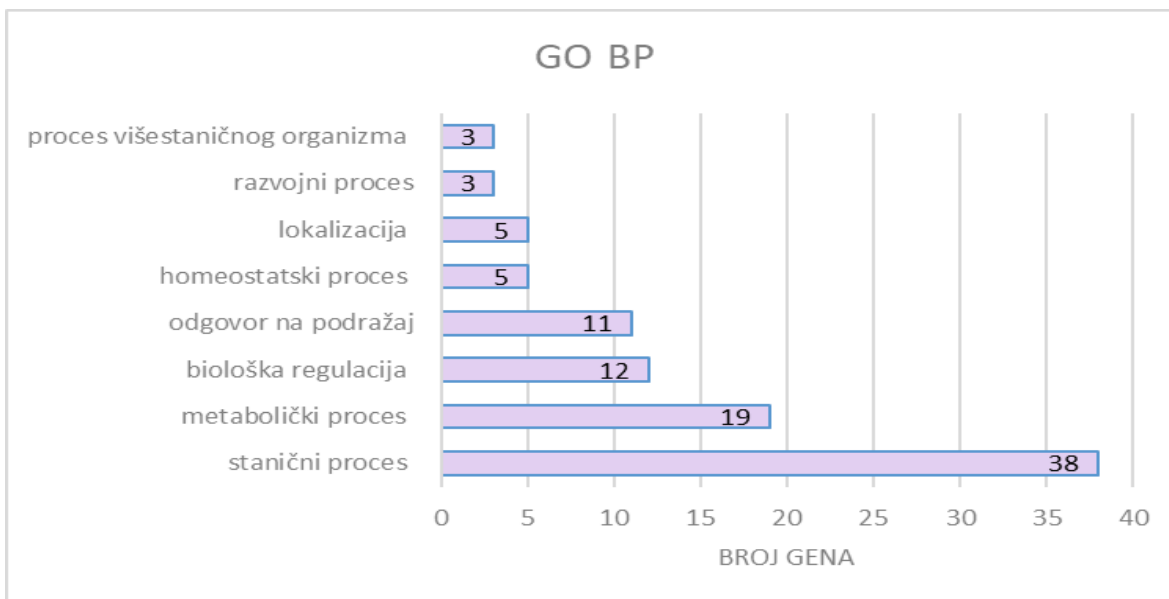
### 5.5.1. Funkcionalna analiza proteina tkiva testisa

Identifikacijski brojevi proteina tkiva testisa pasa upareni su s oznakom gena. Analiza genske ontologije napravljena je pomoću bioinformatičkog alata PANTHER GO (THOMAS i sur., 2022.). Genska ontologija za molekularni proces pokazala je da je najveći broj gena uključen u procese vezanja (N = 37), zatim katalitičke aktivnosti (N = 15), a ostali geni vezani su uz strukturne aktivnosti (N = 8), transport (N = 5) i ostalo (slika 28).



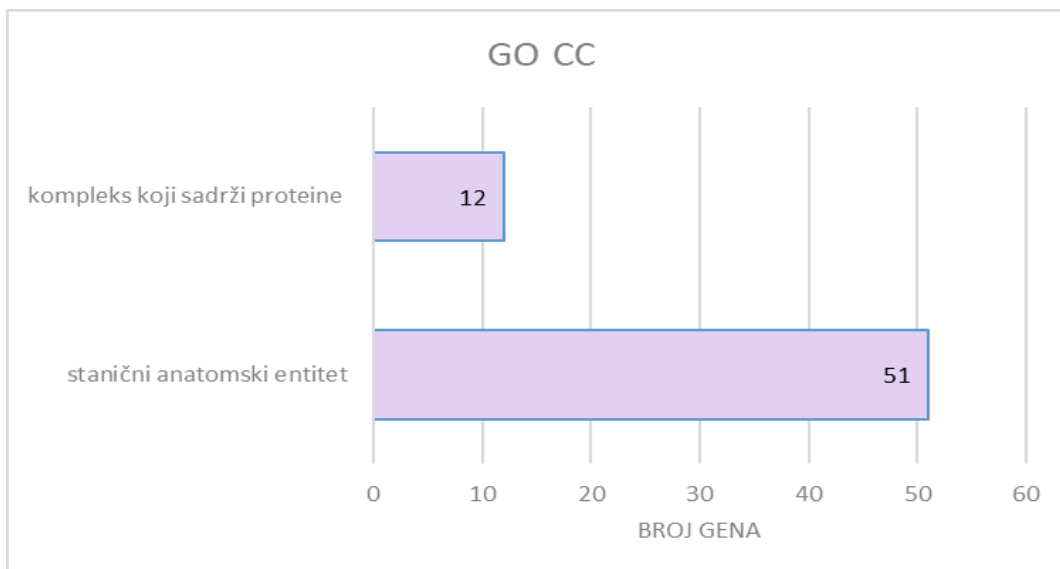
Slika 28. Prikaz genske ontologije za molekularnu funkciju u koji su uključeni različito eksprimirani proteini između skupina (tumori, degeneracije i kontrole) u tkiva testisa pasa napravljen pomoću alata PANTHER (THOMAS i sur., 2022)

Genska ontologija za biološki proces napravljena je također pomoću bioinformatičkog alata PANTHER GO (THOMAS i sur., 2022), a pokazala je da najveći broj gena sudjeluje u staničnim procesima (N = 38), a značajan broj gena sudjeluje u metaboličkim procesima (N = 19), dok su ostali geni vezani uz biološku regulaciju (N = 12), odgovor na podražaj (N = 11) i drugi (slika 29).

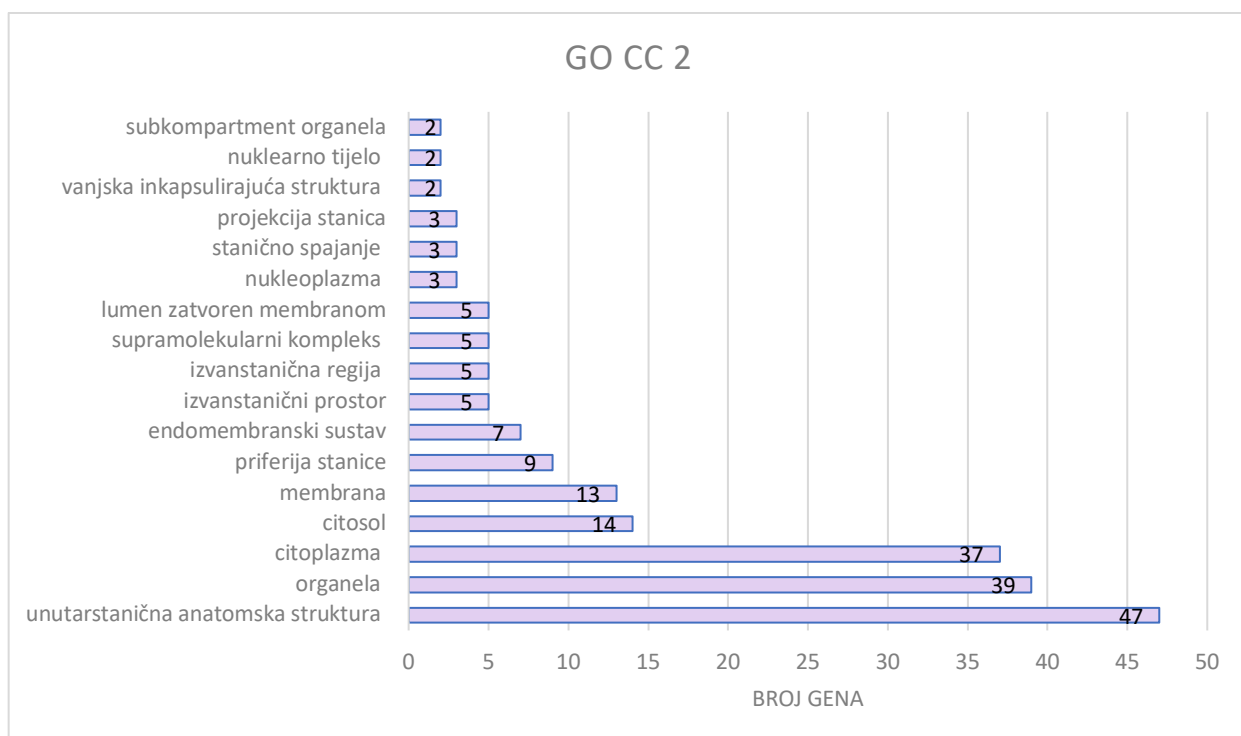


Slika 29. Prikaz genske ontologije za biološki proces u koji su uključeni različito eksprimirani proteini između skupina (tumori, degeneracije i kontrole) u tkivu testisa pasa napravljen pomoću alata PANTHER (THOMAS i sur., 2022)

Rezultati analize genske ontologije za staničnu lokalizaciju pokazali su da je najviše proteina vezano uz stanični entitet ( $N = 51$ ) te uz kompleks koji sadržava protein ( $N = 12$ ) (slika 30). Detaljan prikaz stanične lokalizacije i gena uključenih u pojedini stanični odjeljak prikazan je u slici x2, a analiza je pokazala da je najviše gena vezano za unutarstaničnu anatomsku strukturu ( $N = 47$ ), organele ( $N = 39$ ), citoplazmu ( $N = 37$ ) (slika 31).



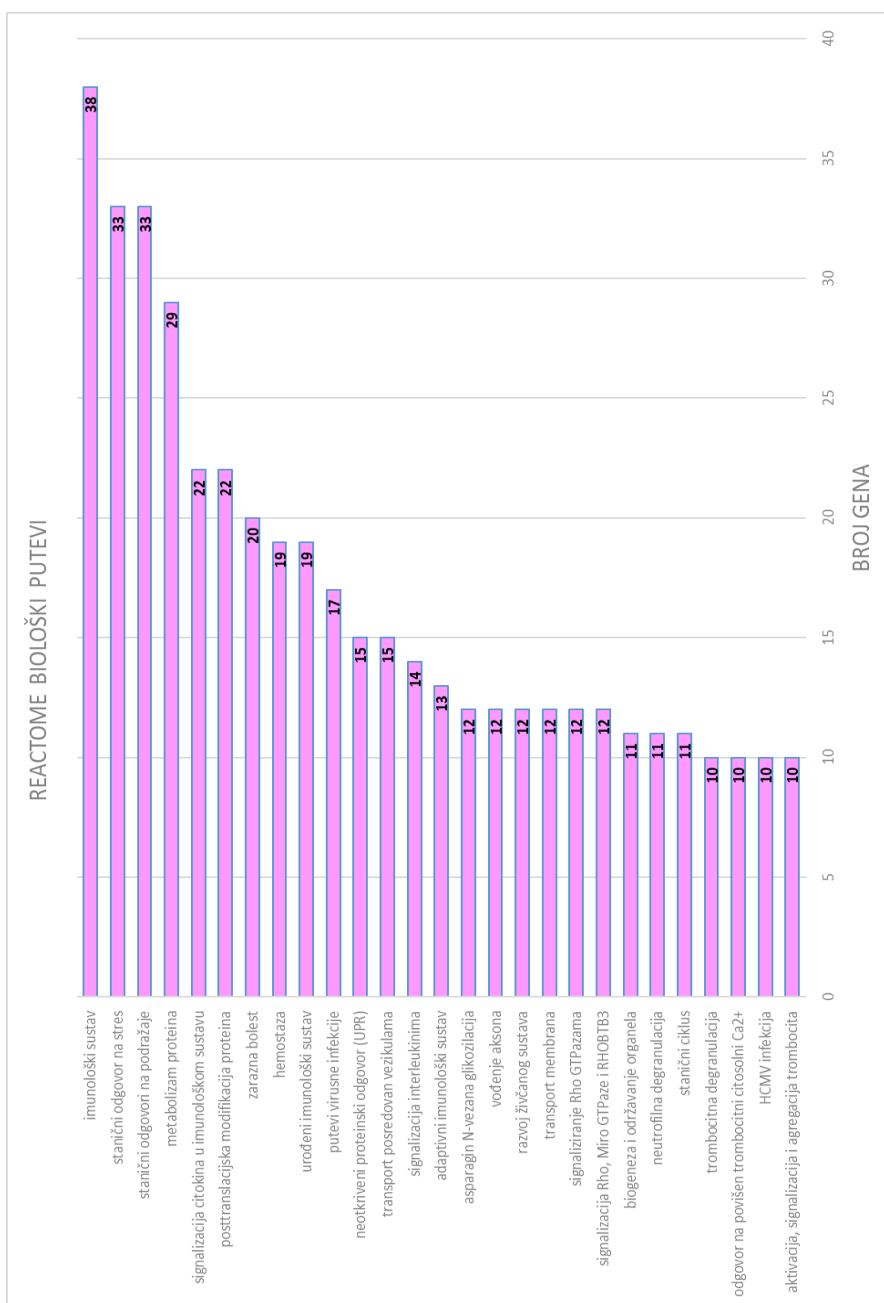
Slika 30. Prikaz genske ontologije za staničnu lokalizaciju u koji su uključeni različito eksprimirani proteini između skupina (tumori, degeneracije i kontrole) u testisa pasa napravljen pomoću alata Reactome



Slika 31. Analiza genske ontologije za staničnu lokalizaciju – stanični anatomski entitet, u koji su uključeni različito eksprimirani proteini između skupina (tumori, degeneracije i kontrole) u testisa pasa napravljen pomoću alata Reactome

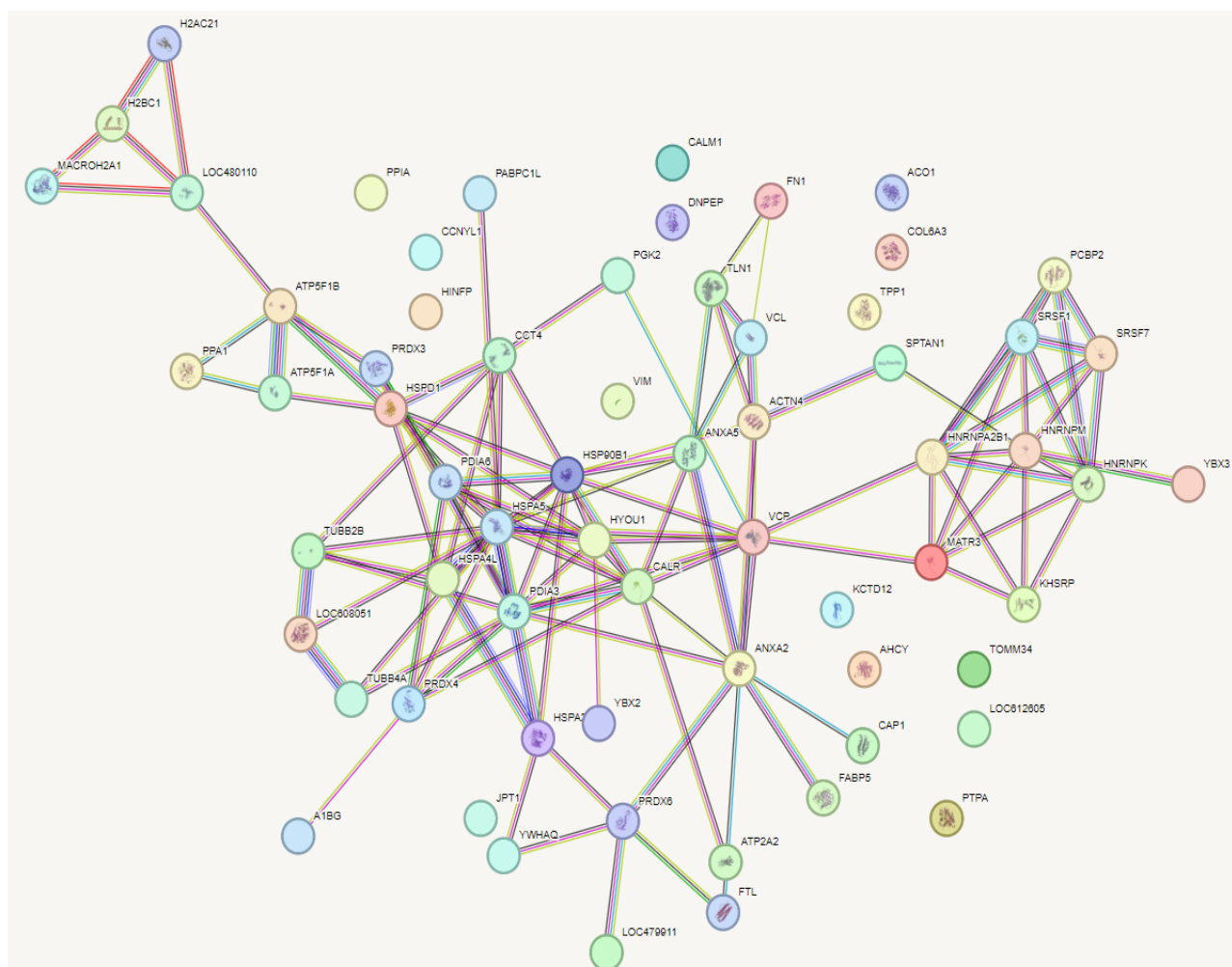
### 5.5.2. Analiza bioloških puteva proteina tkiva testisa

Analiza bioloških puteva proteina tkiva testisa napravljena je pomoću bioinformatičkog alata Reactome te su se 143 biološka puta pokazala statistički značajnima ( $FDR < 0,05$ ). Postavljen je dodatni kriterij da je u svakom biološkom putu prisutno najmanje 10 gena/puteva te smo time reducirali broj puteva na 27 (slika 32).



Slika 32. Prikaz značajnih bioloških puteva s najmanje 10 gena/puteva povezanih s proteomom tkiva testisa pasa, napravljen pomoću alata Reactome

Većina proteina identificiranih i kvantificiranih u proteomu tkiva testisa uključena je u imunosti sustav (N = 38), stanični odgovor na stres (N = 33), stanični odgovor na podražaje (N = 33), metabolizam proteina (N = 29), a ostali identificirani proteomi navedeni su na slici 31. Mrežni prikaz različito eksprimiranih proteina između skupina (tumori, degeneracije i kontrole) tkiva testisa pasa izrađen je u STRING-u (SZKLARCZYK i sur., 2023.) (slika 33).



Slika 33. Mrežni prikaz različito eksprimiranih proteina između skupina (tumori, degeneracije i kontrole) tkiva testisa pasa. Mrežni prikaz je izrađen u STRING-u (SZKLARCZYK i sur., 2023.)



## 6. RASPRAVA

### 6.1. UČESTALOST TUMORA TESTISA U PASA

U istraživanju je utvrđena veća pojavnost tumora testisa kod istraživanih pasa ( $M = 56,9$  %) u odnosu na istraživanje gdje je pojavnost iznosila 32,9 % (HOHŠTETER, 2012.). Dobiveni podaci se ne podudaraju u potpunosti s istraživanjem HOHŠTETER (2012), odnosno kod nas je veća incidencija tumora testisa u pasa. Pretpostavljamo da je razlog tomu posljedica porasta trenda incidencije tumora testisa koji je vidljiv i iz dosadašnjih istraživanja drugih autora (GRIECO i sur., 2018., HOHŠTETER, 2012.).

S obzirom na dosad poznate podatke o prosječnoj životnoj dobi i pojavnosti tumora testisa, u našem istraživanju psi s tumorima testisa pripadaju starijoj životnoj skupini, odnosno prosječna životna dob iznosi 11,4 godine, dok se u literaturi navodi prosječna životna dob od 10,1 godina (LIAO i sur., 2009) te 10,2 godina (HOHŠTETER, 2012.). Tijekom našeg istraživanja uvrštavali smo starije pse iznad 5 godina da vrijednost serumskog AMH ne bi korelirala s rezultatima mjerene koncentracije AMH u serumu, budući da mladi psi mogu fiziološki imati višu koncentraciju AMH. Zbog toga vjerojatno imamo blago odstupanje, odnosno skupinu sa starijom životnom dobi u odnosu na druga istraživanja.

U našem istraživanju najzastupljenije pasmine s pojavnosti tumora testisa bili su mješanci, zatim zlatni retriveri i labrador retriveri te pasmine njemački ovčar, shi-tzu, jorkširski terijer i malteški psić. Dobiveni podaci o incidenciji tumora testisa prema pasminama se djelomično podudaraju s istraživanjem koje je objavio HOHŠTETER (2012) gdje se istraživanjem zaključilo da su tumori testisa bili najzastupljeniji kod križanaca, zlatnih retrivera, njemačkih ovčara, pekinezera, jorkširskih terijera i labrador retrivera. U drugim istraživanjima bila je drugačija pasminska distribucija pasa s tumorom testisa, odnosno veću predispoziciju navode kod malteških pasa, pudla, shi-tzua, pomeranskih špica i jorkširskih terijera (LIAO i sur. 2009.). Ovakva razlika u incidenciji tumora testisa po pasminama najvjerojatnije je vezana uz različitu rasprostranjenost i popularnost određene pasmine pasa po geografskim područjima.

U literaturi se kriptorhizam navodi kao značajan čimbenik u nastanku tumora testisa pasa (LIAO i sur. 2009.), dok drugo istraživanje ne vidi povezanost kriptorhizma i tumora testisa budući da je samo kod jednog kriptorhidnog testisa uočen testikularni tumor (HOHŠTETER, 2012.).

U našoj analizi od ukupno 72 pasa koja su bila u istraživanju, 6 pasa su bili kriptorhidi od čega je samo kod 1 psa nađen tumor testisa (intratubularni SEM). Ostali kriptorhidni testisi su imali značajno izražene degenerativne promjene testisa čime se možemo složiti s istraživanjem HOHŠTETER (2012) da nije nužno da kriptorhidni testis ima veću mogućnost nastanka tumora. Treba uzeti u obzir da je navedeni pas kriptorhid s intratubularnim SEM-om bio star 7 godina što znači da je tumorska promjena testisa mogla nastati uslijed starije životne dobi budući da psi stariji od 6 godina imaju veću sklonost nastanka tumora testisa. Nadalje, dosadašnja istraživanja navode kako kod kriptorhidnih testisa dominantna je pojavnost SCT-a i/ili SEM-a (JOHNSTON i sur., 2001., GOPINATH i sur., 2009., LIAO i sur., 2009., HITOSHI i sur., 2014., HOLST i DREMAINS, 2015., SONG i sur., 2021.). U našem smo istraživanju imali samo jedan tumorski promijenjen kriptorhidni testis s intratubularnim SEM-om stoga nemamo statistički značajnu skupinu kako bismo mogli potvrditi ili opovrgnuti navod.

## 6.2. ANALIZA HISTOLOŠKE KLASIFIKACIJE TUMORA TESTISA U PASA

U našem istraživanju utvrđeno je da je najzastupljeniji tumor Leydigovih stanica što je u skladu s drugim istraživanjima (HITOSHI i sur., 2014, HOHŠTETER i sur., 2014., HOLST i DREMAINS, 2015., EFENDIĆ i sur., 2021., SONG i sur., 2021.), osim u istraživanju LIAO i sur. (2009) gdje je zabilježena najčešća pojavnost SEM-a. Uspoređujući naše rezultate s klasifikacijom Svjetske zdravstvene organizacije, najzastupljeniji je LCT u odnosu na njihovu statistiku gdje je to SCT. Razlika u pojavnosti tipa tumora može biti zbog toga što nije u svim istraživanjima opisana kategorija MSCT-a, stoga je nejasno u koju kategoriju su svrstani psi s dva različita tumora u jednom ili oba testisa što uvelike može dovesti do promjene u završnoj analizi rezultata. Kao i u ostalim istraživanjima, i u našem je potvrđeno da je teratom iznimno rijetko zastupljen, odnosno u našem istraživanju nije potvrđen niti u jednom uzorku testikularnog tkiva.

Autor HOHŠTETER (2012) je u svom istraživanju za rezultat dobio da oko 40 % pasa s tumorom testisa ima više od jedne vrste primarnog tumora testisa, dok je u našem istraživanju taj postotak manji, odnosno udio MSCT-a unutar jednog testisa utvrđen je kod 10 pasa (24,3 %).

Kao i u drugim istraživanjima (HOLST i sur., 2015.), tako i kod naše skupine pasa s tumorom testisa nije bilo izraženih kliničkih znakova vezanih uz patologiju testisa. Međutim kod nekih pasa bilo je promjene u konzistenciji testisa prilikom palpacije.

U literaturi su opisani različiti simptomi koji nisu česti, ali se mogu pojaviti zbog hormonskog poremećaja u pasa s tumorom testisa koji uključuju sindrom feminizacije s ginekomastijom, kožnu hiperpigmentaciju i bilateralnu alopeciju (GOPINATH i sur., 2009., PETERS i sur., 2000., HOHŠTETER, 2012., HITOSHI i sur., 2014., SONG i sur., 2021.). U našem istraživanju svi psi kod kojih je histopatološki potvrđen tumor testisa nisu imali navedene simptome. GOPINATH i sur. (2009) navode kako se u 25 – 50 % pasa s SCT-om jave navedeni simptomi.

Za razliku od ljudi, u pasa se navodi da tumori testisa rijetko imaju maligno biološko ponašanje (HOHŠTETER, 2012., HOHŠTETER i sur., 2014., EFENDIĆ i sur., 2024.), no u slučaju pojave metastaza najčešće zahvaćena regija su ilijačni limfni čvorovi i pluća, ali mogu zahvatiti i bubrege, jetru, slezenu, nadbubrege te gušteraču (GOPINATH i sur., 2009., HOLST i DREMAINS, 2015., MIHOKOVIĆ i sur., 2017.). U našem istraživanju nije utvrđena niti jedna metastaza prilikom prijeoperacijskog pregleda životinja gdje je bila uključena i RTG dijagnostika. No s druge strane opće je poznato da je puno preciznija slikovna dijagnostika za detekciju metastaza kompjutorizirana tomografija (CT), međutim ista se nije provodila prilikom sumnje na postojanje tumora testisa primarno zbog financijskog razloga, a potom i zbog vrlo rijetkog malignog biološkog ponašanja tumora testisa u pasa. Stoga ne možemo sa 100 %-tnom sigurnošću tvrditi da ni jedan pas nije imao metastaze, već tvrdimo da ni jedan pas nije imao vidljive metastaze na temelju rendgenske slikovne dijagnostike grudne i trbušne šupljine i ultrazvučne pretrage testisa, dosjemenika, prostate i mokraćnog mjehura.

Hipoplazija koštane srži s neregnerativnom anemijom također je opisana u literaturi kao jedna od mogućih komplikacija uslijed hiperestrogenizacije u 15 % pasa sa Sertolijevim tumorom testisa (SHERDING i sur., 1981., GOPINATH i sur., 2009., WITHERS i sur., 2016., MARSHALL, 2018., SONG i sur., 2021., HITOSHI i sur., 2014.). U našem istraživanju nije zamijećena prisutnost aplastične anemije i/ili pancitopenije na temelju kompletne krvne slike kod svih istraživanih pasa.

### 6.3. ANALIZA SERUMSKE EKSPRESIJE ANTI-MÜLLEROVA HORMONA

U našem istraživanju utvrdili smo da je najviša koncentracija AMH u serumu bila u skupini tumora (Mdn = 63,2 ng/mL), dok je nešto niža koncentracija bila u skupini degeneracija (Mdn = 44,3 ng/mL), a u kontrolnoj skupini pasa, koncentracija AMH biljega bila je najniža (Mdn = 30,5). Analizom smo utvrdili statističku značajnu razliku između skupine tumora i kontrolne skupine što odgovara dosadašnjim literaturnim navodima jer je AMH potencijalni tumorski biljeg u pasa s tumorima testisa (HOLST i DREMAINS, 2015., HORNAKOVA i sur., 2017.).

Budući da na ostalim tipovima tumora testisa osim SCT-a nije provedeno istraživanje vezano uz ekspresiju AMH u serumu, nemamo s čime usporediti naše rezultate, ali možemo zaključiti da se uspoređujući koncentraciju AMH u tipovima tumora (SEM, LCT, MSCT) u odnosu na kontrolnu skupinu, utvrdila statistički značajna razlika između SEM i kontrolne skupine.

Na temelju spomenutih rezultata, možemo zaključiti da je vrijednost AMH u serumu značajno niža u kontrolnoj skupini pasa u odnosu na skupinu pasa sa svim tipovima tumora. Uspoređujući naše dobivene vrijednosti AMH u serumu, također se slažu s drugim istraživanjem gdje se spominje da je u skupini pasa s tumorima koncentracija AMH u serumu bila povišena otprilike 4 puta u odnosu na zdravu skupinu (HORNAKOVA i sur., 2017.). Nedostatak je navedenog istraživanja odsutnost histopatološke tipizacije tumora testisa, dok je u našem istraživanju histopatološka analiza bila temelj za razvrstavanje pasa u određene skupine i podskupine tumora.

Ovim istraživanjem na temelju naših rezultata postavilo se dobro uporište za AMH kao koristan tumorski biljeg kod pasa s tumorom testisa, a posebice SEM-a. Za SCT skupinu, potrebna je veća skupina pasa kako bi se moglo utvrditi postoji li statistička značajnost.

Dosadašnja istraživanja navode značajno višu serumsku koncentraciju AMH u kriptorhidnih pasa u usporedbi sa zdravim i kastriranim psima (GHARAGOZLOU i sur., 2014., BANCO i sur., 2012., HORNAKOVA i sur., 2017., KHAN i sur., 2018., WALTER, 2020.) što u našem istraživanju možemo uzeti kao pretpostavku. Naime, iako imamo malu skupinu pasa kriptorhida (N = 6), svih 6 pasa je imalo iznimno visoku vrijednost AMH u serumu (Mdn = 147,9 ng/mL), a vrijednosti su se kretale od 32,2 ng/mL do 150 ng/mL.

Smatramo da je razlog višoj serumskoj koncentraciji AMH u kriptorhida zbog povećane količine nezrelih Sertolijevih stanica u tim gonadama, no da bismo utvrdili statističku značajnost, potrebna je veća skupina pasa kriptorhida kako bi se mogao potvrditi potencijalni biljeg AMH za dokaz kriptorhizma.

Po pitanju odabira vrste ELISA kita za određivanje serumske vrijednosti AMH prema dosadašnjoj literaturi (PLACE i sur., 2011, HOLLINSHEAD, 2016.) dokazala se puno viša specifičnost i osjetljivost ELISA analize AMH-a iz seruma koristeći vrsno specifičan kit za pse u odnosu na humano specifičan ELISA kit. Suprotno navedenim rezultatima, govori istraživanje YAGCI i sur., (2016) gdje su se uspoređivale koncentracije serumskog AMH kod kuja prije i nakon OHE koristeći 2 različita komercijalna ELISA kita, od čega je jedan bio humani, dok je drugi bio pseći vrsno specifični. Zaključak istraživanja je bio da se humanim ELISA kitom puno bolje detektirala razlika u koncentraciji AMH prije i nakon operacijskog zahvata. U našem istraživanju koristio se komercijalni ELISA kit koji je vrsno specifičan za pse te je dao očekivane vrijednosti u navedenim rasponima.

THEMMEN i sur. (2016.) su mjerili serumsku i plazma vrijednost AMH kod kastriranih i intaktnih mužjaka te su također određivali vrijednosti kod kastriranih i intaktnih ženki. Zaključak je bio da bi se osjetljivost testa kod mužjaka trebala dodatno istražiti određivanjem koncentracije testosterona koji utječe na razinu koncentracije AMH. U istraživanju je i određena granična vrijednost koncentracije AMH koja je za intaktne mužjake iznosila 5.5 ng/ml za razliku od našeg istraživanja gdje je medijan koncentracije AMH iz seruma za kontrolnu skupinu (intaktni mužjaci) iznosio 42,8 ng/mL.

Iz svega navedenog, budući da imamo statistički dovoljno velike skupine pasa, možemo postaviti granice vrijednosti AMH u serumu za određene dijagnostičke svrhe.

U svrhu distinkcije je li jedinka kastrirana, treba prvo uzeti u obzir dobnu dispoziciju budući da je kod mladih prebubertalnih pasa koncentracija AMH fiziološki puno viša. Stoga je preporuka, ukoliko je potrebna distinkcija je li jedinka kastrirana, da se mjerenje AMH radi poslije spolnog sazrijevanja. Na temelju našeg istraživanja za postavljanje potencijalne granice AMH u serumu intaktnih mužjaka možemo usporediti vrijednosti naše kontrolne skupine sa skupinom tumora i degeneracija te time utvrditi da iznos medijana koncentracije AMH u serumu za intaktne mužjake koji iznosi 30,5 ng/mL.

## 6.4. ANALIZA NAZOČNOSTI I ZNAČAJNOSTI IMUNOHISTOKEMIJSKIH BILJEGA

### Biljeg Ki-67

Proliferacijski indeks najčešće je definiran kao postotak pozitivnih jezgri na 1000 tumorskih stanica (DOWSETT i sur., 2011.). U našem istraživanju jednako smo definirali proliferacijski indeks kod svih skupina (kontrolna, degenerativni tetisi i tumori testisa), osim kod mješovitih tumora gdje smo u slučaju histopatološkog nalaza 2 tumora u jednom testisu za svaki tumor izbrojali postotak pozitivnih jezgri na 500 tumorskih stanica.

U veterinarskoj je medicini dokazano da je kod pasa s tumorima (primarno karcinomina, sarkomima i limfomima) utvrđena pozitivna imunohistokemijska i serumska ekspresija biljega Ki-67 kao i u humanoj medicini kod pacijenata s karcinomom dojke i prostate (PLAVETIĆ i sur., 2013.; REN i sur., 2020.; ESTALLER i sur., 2022.).

Postoji i veći broj oprečnih istraživanja, koja navode da nema pozitivne ekspresije Ki-67 u tumorima Sertolijevih stanica (BANCO i sur., 2012., HOHŠTETER, 2012.). Po pitanju ekspresije u pasa s tumorima testisa, navodi se da u više od 50 % slučajeva postoji pozitivna ekspresija imunohistokemijskog biljega Ki-67 kod SEM-a (HOHŠTETER, 2012). Uspoređujući s našim istraživanjem, u sve tri skupine (T, D, K) smo utvrdili statistički značajnu razliku. No u našem istraživanju najviša vrijednost ekspresije Ki-67 prikazana putem medijana nije niti u SCT niti u skupini SEM-a, stoga se naši rezultati podudaraju s dijelom literaturnih navoda (BANCO i sur., 2012., HOHŠTETER, 2012.).

### Biljeg anti-Müllerov hormon

Uspoređujući istraživanja na ekspresiji imunohistokemijskog biljega AMH u tkivu testisa, utvrdili smo da SCT skupina ima znatno veću šansu za ekspresijom AMH u tkivu u odnosu na SEM, LCT i kontrolnu skupinu što je u skladu s literaturnim navodima kako u veterinarskoj, tako i u humanoj medicini (BANCO i sur., 2012., WALTER, 2020.).

Nadalje, analizirajući SEM skupinu, navedena skupina ima također mogućnost veće ekspresije AMH biljega u odnosu na skupine LCT i kontrolnu skupinu, no u veterinarskoj medicini nisu provedena istraživanja na ekspresiji drugih tipova tumora osim SCT-a.

Može se zaključiti da je u našoj istraživanoj skupini pasa imunohistokemijska ekspresija AMH u tkivu testisa bila najdominantnije prisutna kod pasa sa Sertolijevim tumorom, odnosno 83,3 % tumora SCT-a je pokazivalo pozitivnu ekspresiju s ocjenom minimalno 1, dok ostatak od 16,7 % nije pokazivao ekspresiju AMH biljega. Najviše SCT-a bilo je s ocjenom 1, a zatim s ocjenom 3.

## 6.5. PROTEOMSKA ANALIZA SERUMA ISTRAŽIVANIH PASA

Većina opsežnih proteomskih istraživanja provedena je kod ljudi, glodavaca i domaćih životinja čime se omogućuje provedba komparativnih analiza. Analiza proteomskog profila stanica ili tkiva je budućnost u detekciji novih dijagnostičkih biljega, nužna za točno utvrđivanje razvoja odnosno faze bolesti ili za predviđanje ishoda terapije. Ovo istraživanje djelomično se usredotočilo i na proteomsku karakterizaciju seruma i tkiva testisa u pasa te time omogućilo komparaciju identificiranih proteina između skupina zdravih jedinki i jedinki s prisutnim tumorom testisa. Naime, serum je važan biološki uzorak koji sadržava stotine proteina, a promjene u ekspresiji proteina može ukazati na oštećenje stanice, bolesna stanja te ga time čini relevantnim potencijalnim biljekom bolesti i/ili tumorskih procesa. No s druge, strane treba uzeti u obzir da serum sadržava prilično širok dinamičan raspon koncentracija proteina od čega su najzastupljeniji (> 80 %) albumini i imunoglobulini, a postoje i velike fiziološke varijacije među uzorcima.

U ovom istraživanju u serumu je ukupno identificirano 128 proteina s pomoću najmanje dva jedinstvena peptida i uz 1 % FDR, a u daljnju statističku i bioinformatičku obradu uključeni su samo proteini koji su bili prisutni u najmanje 50 % uzoraka.

U istraživanju smo uspoređivali ekspresiju različitih proteina između skupina. Prilikom usporedbi skupina tumora i kontrolne skupine, u skupini tumora identificirali smo povećanu ekspresiju sljedećih proteina:

- a) Alfa-2-makroglobulin (A2M) – funkcioniraju kao nespecifični inhibitori proteaze, a također igraju i ulogu u transportu i uklanjanju citokina i faktora rasta iz cirkulacije, regulaciji fibrinolize, koagulaciji i aktivaciji komplementa te djeluje kao transportni protein. Općenito, A2M proizvodi jetra kao protein akutne faze tijekom stanja stresa, a zatim se izlučuje u krv. Također ga lokalno proizvode makrofagi, fibroblasti i epitelne stanice. Mutacije gena A2M igraju ulogu kod ljudi u patogenezi bolesti kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest i rak prostate u ljudi (*The Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*). Protein A2M uglavnom je pronađen u bolesnih pasa, posebno u labrador retrievera (ANDERSSON i sur., 2002.). Budući da A2M sudjeluje i u kancerogenim biološkim putevima, a s obzirom na to da je njegova ekspresija prisutna u skupini tumora, mogli bismo zaključiti da bi ovaj protein mogao biti potencijalni tumorski biljeg kod tumora testisa u pasa.
- b) Fosfatidilinozitol-glikan-specifična fosfolipaza D – molekularna funkcija je kataliziranje reakcije hidrolize (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.).
- c) Protein S – antikoagulantni protein plazme koji je ko-faktor aktiviranom proteinu C u razgradnji koagulacijskih faktora Va i VIIIa. Pomaže u sprečavanju koagulacije i potiče fibrinolizu. Poznato je da tumorski procesi mogu utjecati na poremećaj faktora grušanja te također na pojavu sindroma diseminirane intravaskularne koagulacije (DIK). Stoga sve identificirane proteine koji su povezani s poremećajima faktora grušanja možemo smatrati potencijalnim tumorskim biljezima (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.).
- d) Fetuin B – inhibitor serin-proteaze koji ima visoku katalitičku učinkovitost za F10/faktor Xa koagulacije krvi i može djelovati kao antikoagulans inhibicijom aktivacije protrombina. Inhibira tripsin i proteaze CMA1/kimaze i triptaze mastocita (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.).

Uz navedena 4 proteina još su identificirana dva proteina koja sadržavaju Ig sličnu domenu.



Pri usporedbi skupina tumora i kontrolne skupine, u skupini tumora identificirali smo manju ekspresiju sljedećih proteina:

- a) Antitrombin-III – molekularna funkcija mu je vezanje heparina, a biološki procesi ovog proteina vezani su uz zgrušavanje krvi (MARUYAMA i sur., 2015.).
- b) Ekstracelularni (izvanstanični) matriks protein 1 – igra ključnu ulogu u razvoju i napredovanju raka. Izvanstanični matriks tumora vrlo se razlikuje od matriksa normalnog tkiva. Naime, proteinski sastav i struktura izvanstaničnog matriksa mijenjaju se tijekom progresije raka i abnormalni matriks deregulira ponašanje stromalnih stanica i utječe na progresiju raka. Fibroblasti uglavnom proizvode i reguliraju remodeliranje matriksa, ali kod raka tumorski matriks također potječe od stanica raka (POPOVA i JUCKER, 2022.).
- c) Član obitelji Serpin D – inhibitori serpin-proteaze (serpini) važni su u regulaciji širokog spektra različitih bioloških aktivnosti, čineći do 2 – 10 % cirkulirajućih proteina plazme. Reguliraju koagulaciju (trombozu i trombolizu), transport hormona, komplement i upalu, angiogenezu i krvni tlak. Odabrani serpini povezani su s progresijom ili remisijom odabranih karcinoma, što ih čini vrijednima za terapijsku ili dijagnostičku upotrebu. Inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1), glavni regulator trombolize, ima potencijal ili smanjiti ili ubrzati rast tumora, ali nedavno je objavljeno da blokada PAI-1 smanjuje migraciju stanica raka, proliferaciju i preživljavanje modulacijom funkcije receptora aktivatora plazminogena tipa urokinaze. Maspin je neinhibijski serpin, koji povećava osjetljivost stanica raka na apoptozu i inhibira migraciju stanica raka, čime se stvara serpin koji blokira rast tumora. Između ostalih serpina, serpin sisavaca, neuroserpin i serpin izveden iz miksomavirusa, Serp-1 imaju potencijalnu funkciju supresije tumora. Daljnja studija o učinkovitosti i mehanizmima djelovanja protiv raka posredovanog serpinom je opravdana kako bi se razvili novi pristupi koji se temelje na serpinu u terapiji raka (ZHENG i sur., 2013.).
- d) Transferin receptor protein 1 – protein koji sudjeluje u staničnom unosu željeza endocitozom u specijalizirane endosome. Endosomska acidifikacija dovodi do oslobađanja željeza. Kompleks apotransferin-receptor zatim se reciklira na površinu stanice uz povratak na neutralni pH i popratni gubitak afiniteta apotransferina za njegov receptor.

Transferinski receptor nužan je za razvoj eritrocita i živčanog sustava (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.).

- e) Protein AMBP – inhibitor serin-proteaze ima visoku katalitičku učinkovitost za F10/faktor Xa koagulacije krvi i može djelovati kao antikoagulans inhibicijom aktivacije protrombina. Inhibira tripsin i proteaze CMA1/kimaze i triptaze mastocita (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.).

Uspoređujući skupinu degeneracija i kontrolnu skupinu, u skupini degeneracija identificiran je protein koji sadržava Ig domenu te povećanu ekspresiju sljedeća 2 proteina u odnosu na kontrole:

- a) Komplement C7 – protein koji je uključen u sustav komplementa urođenog imunskog sustava. C7 je dio membranskog napadajućeg kompleksa (MAC) koji stvara rupu na površini patogena, što dovodi do lize i smrti stanice. Njegova je primarna zadaća vezanje kompleksa C5bC6. Ovaj spoj mijenja konfiguraciju proteinskih molekula. Mutacije u ovom genu povezane su s rijetkim poremećajem koji se zove nedostatak C7 (The Human Gene Database).
- b) Gelsolin – kalcijem regulirani protein koji modulira aktin koji se veže na plus (ili bodljikave) krajeve aktinskih monomera ili filamenata, sprečavajući izmjenu monomera (blokiranje ili zatvaranje). Može pospješiti sastavljanje monomera u filamente (nukleacija) kao i raskinuti već formirane filamente. Sudjeluje u ciliogenezi (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.).

Međusobnim analiziranjem skupine tumora i i degeneracija, veću ekspresiju u skupini tumora pokazuju sljedeći proteini:

- a) Alfa-2-makroglobulin (A2M) čija funkcija je već ranije opisana.
- b) Kalikrein B1 – ljudske peptidaze povezane s kalikreinom čine obitelj od 15 serin-proteaza s različitim ulogama kao što su mnogi fiziološki i patološki procesi, uključujući karcinogenezu (ANGELOPOULOU i sur., 2009.). Ovaj gen kodira glikoprotein koji sudjeluje u površinski ovisnoj aktivaciji koagulacije krvi, fibrinolize, stvaranja kinina i upale (*The Humane Gene Database*). Budući da sudjeluje i u onkogenim putevima, a s obzirom na to da je njegova ekspresija prisutna u skupini tumora, mogli bismo zaključiti da bi ovaj protein mogao biti potencijalni tumorski biljeg kod tumora testisa u pasa.

U skupini degeneracija u odnosu na skupinu tumora, uz albumin, veću ekspresiju pokazuju sljedeći proteini:

- a) Član obitelji Serpin F2 – glavni je inhibitor plazmina koji razgrađuje fibrin i razne druge proteine. Posljedično, pravilna funkcija ovog gena ima glavnu ulogu u regulaciji puta zgrušavanja krvi. Mutacije u ovom genu rezultiraju nedostatkom inhibitora alfa-2-plazmina, koji je karakteriziran teškom hemoragijskom dijatezom (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.).
- b) Transferinski receptorski protein 1 čija je uloga već ranije opisana.
- c) Globulin koji veže spolne hormone – djeluje kao protein transporta androgena, ali također može biti uključen u procese posredovane receptorima. Svaki dimer veže jednu molekulu steroida. Specifično za 5-alfa-dihidrotestosteron, testosteron i 17-beta-estradiol. Regulira brzinu metaboličkog čišćenja steroidnih hormona u plazmi kontrolirajući njihovu koncentraciju u plazmi (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.).

## 6.6. PROTEOMSKA ANALIZA TKIVA TESTISA U ISTRAŽIVANIH PASA

Većina značajno različitih proteina identificiranih i kvantificiranih u proteomu seruma pasa između kontrolne skupine i skupine tumora uključena je u hemostazu, dok su ostali zastupljeni biološki putevi vezani za stvaranje fibrinskog ugruška, degranulaciju, aktivaciju, agregaciju i signalizaciju trombocita i drugo. Hemostaza uz imunski sustav su dva glavna obrambena i usko povezana (pato)fiziološka sustava domaćina odgovorna za prepoznavanje i borbu protiv uzročnika bolesti (MARGETIĆ, 2012.).

Hemostaza je složen proces uzajamno povezanih reakcija koje sudjelju u zaustavljanju krvarenja. Funkcija cjelokupnog hemostatskog sustava ima tri faze – primarnu i sekundarnu hemostazu te fibrinolizu. Bolesti hemostaze uključuju bolesti trombocita, nasljedne bolesti hemostaze (hemofilija A i B, von Willebrandova bolest), stečene poremećaje (diseminirana intravaskularna koagulacija, poremećaji hemostaze u bolestima jetre i maligne bolesti), poremećaje koji se očituju povećanom sklonošću trombozi te poremećaje fibrinolitičkog učinka (MARGETIĆ i ČARŽAVEC, 2018.). Tako su u proteomu seruma prisutne različite komponente hemostatskog sustava kao što su stvaranje fibrinskog ugruška, degranulacija trombocita, aktivacija, signalizacija i agregacija trombocita, unos i transport željeza, uklanjanje hema iz plazme te interakcija stanične površine na vaskularnoj stijenci.

Značajnu ekspresiju u skupini tumora u odnosu na kontrolnu skupinu ima niz proteina, a u nastavku je opisana funkcija onih koji pokazuju značajno promijenjenu ekspresiju u tumorskom tkivu testisa u pasa.

Protein Aneksin A2 koji ima ulogu u kodiranju proteina lokaliziranog na membrani u svrhu vezanja fosfolipida. Ovaj protein inhibira fosfolipazu A2 i ima protuupalno djelovanje. Gubitak funkcije ili ekspresije ovog gena otkriven je u više tumora što je značajno budući da je i u našoj skupini tumora prisutna pozitivna ekspresija (*The Human Gene Database*).

Također smo utvrdili i ekspresiju proteina koji sadržava domenu tireodoksina što se slaže s navodima u humanoj onkologiji gdje tumorske stanice u trenutku oksidativnog i upalnog procesa otpuštaju stanice tireodoksina (HLOUŠEK, 2015.).

Nadalje, ekspresiju u skupini tumora u odnosu na kontrolnu skupinu ima i protein fibronektin. Uloga fibronektina (FN) u humanoj medicini u tumorogenezi i malignoj progresiji vrlo je kontroverzna.

S jedne strane, objavljeno je da ekspresija FN u tumorskim stanicama ima ulogu supresije tumora kako bi se spriječila transformacija tumora i zaustavila njihova rana progresija, dok s druge strane, brojni dokazi otkrivaju da FN izaziva kasne stadije metastaza raka i povezan je s lošom prognozom kada se endogeno izražava u tumorskim stanicama (LIN i sur., 2020.).

Neeritroidni spektrin alfa (SPTAN1) je važan citoskeletni protein koji osigurava vitalna stanična svojstva uključujući polaritet i stabilizaciju stanice. Osim toga, uključen je u staničnu adheziju, međustanični kontakt i apoptozu. Otkrivanje promijenjene ekspresije SPTAN1 u tumorima ukazuje da bi SPTAN1 mogao biti uključen u razvoj i napredovanje raka. SPTAN1 je opisan u odgovoru na rak i terapiju te je predložen kao potencijalni protein marker za neoplaziju, agresivnost tumora i terapijsku učinkovitost u humanoj medicini. S jedne strane, postojeći podaci sugeriraju da prekomjerna ekspresija SPTAN1 u tumorskim stanicama odražava neoplastičnu i tumorsku aktivnost. S druge strane, nuklearni SPTAN1 može imati učinke na suzbijanje tumora omogućujući popravak DNA interakcijom s proteinima za popravak DNA. Štoviše, proizvodi cijepanja SPTAN1 javljaju se tijekom apoptoze i mogu poslužiti kao markeri za učinkovitost terapije raka. Zbog višestrukih funkcija SPTAN1 i njegove uloge u adheziji i migraciji, SPTAN1 može utjecati na rast i progresiju tumora u pozitivnom i negativnom smjeru, ovisno o svojoj specifičnoj regulaciji (ACKERMANN i BRIEGER, 2019.).

Vezano uz ekspresiju proteina citoplazmatska akonitat hidrataza (ACO1), gen koji je uključen u citoplazmu i metabolizam mitohondrija. U ljudi sa T-staničnim limfoblastičnim neoplazijama istraživanja su pokazala da neciljani nedostatak ACO1 izazvan uobičajenim delecijama izaziva kolateralnu staničnu smrtnost koja se može koristiti kao nova terapijska strategija u liječenju nekoliko vrsta raka (SANCHEZ i sur., 2020.).

Protein povezan s adenilil ciklazom 1 (CAP1) - pripada skupini glikoproteina koji reguliraju unutarstaničnu signalizaciju a djeluju kao ključni regulatori u signalnom putu cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) i povezani su s osjetljivošću stanica na kemoterapiju i ionizirajuće zračenje. Mnogi članovi superobitelji mogu se otkriti u većini slučajeva kemorezistencije usprkos složenosti i nepoznatosti specifičnog mehanizma koji leži u osnovi uloge u proliferaciji i invaziji stanica raka. Pretjerana aktivacija ADCY-a, kao i njegovih uzvodnih i nizvodnih regulatora, implicira se kao glavna potencijalna meta novih terapija protiv raka i markera iznimnog odgovora na kemoterapiju.

Daljnje istraživanje ovog proteina pruža nove mogućnosti za razvoj novih terapijskih strategija u personaliziranoj onkologiji i nove pristupe za poboljšanje učinkovitosti kemoimunoterapije u liječenju različitih vrsta raka (GUO i sur., 2022.).

Protein kolagen tip VI alfa 3 lanac (COL6A3) - jedna je od 3 podjedinice kolagena VI koji je mikrofibrilarna komponenta izvanstaničnog matriksa i bitan je za stabilan proces sklapanja kolagena VI. Lanac kolagena alfa-3 (VI) i odcijepljeni fragment C5 domene, nazvan endotrofin, snažno su izraženi u različitim vrstama raka i igraju ključnu ulogu u napredovanju raka. Biološke funkcije endotrofina u tumorima mogu potaknuti adipociti. Studije su pokazale da endotrofin može izravno utjecati na zloćudnost stanica raka putem mehanizama ovisnih o TGF- $\beta$ , inducirajući epitelno-mezenhimalni prijelaz i fibrozu mikrokruženja tumora. Osim toga, endotrofin također može regrutirati makrofage i endotelne stanice kroz kemotaksiju za regulaciju mikrokruženja tumora i u konačnici potaknuti upalu tumora i angiogenezu. Nadalje, COL6A3 i endotrofin služe kao novi dijagnostički i prognostički biomarkeri raka i pridonose kliničkim terapijskim primjenama u budućnosti u humanoj medicini (WANG i PAN, 2020.).

Protein sličan S-adenozilhomocistein hidrolazi 1 (AHCYL1)– istraživanja u humanoj medicini kod onkoloških pacijenata s karcinomom pluća pokazuju da je AHCYL1 negativni regulator u tumorogenezi NSCLC stanica (rak pluća nemalih stanica - Non-Small Cell Lung Cancer) modulacijom stanja diferencijacije stanica i naglašavanjem AHCYL1 kao potencijalnog prognostičkog biomarkera za rak pluća (BERNART i sur., 2023.).

Feritin je reaktant akutne faze a proizvode ga i luče jetrene stanice, makrofagi i neoplastične stanice te je dokazani tumorski marker u humanoj medicini a vezan je za tumor bubrega, gušterače, karcinoma dojke i limfoma. Istraživanjima je zaključeno da postoji poremećaj metabolizma željeza kod malignih stanja, te da dolazi do promjena i unutarstaničnog i izvanstaničnog feritina. Također ima pozitivnu ekspresiju i kod ne-malignih oboljenja, odnosno kod bolestijetre i nekih infekcija (SKOKO i sur., 2012.).

Talin 1 (TLN1) kao komponenta višeproteinskih adhezijskih kompleksa ima ulogu u stvaranju i migraciji tumora u različitim zloćudnim bolestima. Istraživanja su pokazala da veća ekspresija TLN1 u razini proteina može biti značajno povezana s agresivnijim ponašanjem tumora i uznapredovalom bolešću kod pacijenata s rakom kože. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se otkrio mehanizam djelovanja TLN1 kod raka kože (REZAIE i sur., 2023.).

Vimentin (VIM) je visoko izražen kod metastatskih karcinoma, a njegova ekspresija korelira s lošim prognozama za pacijente. Međutim, do sada nije bilo uzročnih in vivo studija koje povezuju vimentin i progresiju raka pluća (NSCLC). Rezultati istraživanja u humanoj medicini pokazuju da je vimentin potreban za brzi rast tumora, metastaze i zaštitu od ferroptoze kod NSCLC (BERR i sur., 2023.).

Alfa-1-B glikoprotein (A1BG) - Utvrđeno je da su ovi proteini povezani s nizom bolesti. Otkriveni su u urinu djece s nefrotskim sindromom minimalnih promjena otpornim na steroide (SRINS). Također je utvrđeno da je povezan s rakom mokraćnog mjehura, jer je otkriven u svim uzorcima pacijenata koji imaju tumor, ali ne i u uzorcima dobivenim od osoba koje nemaju tumor (KREUNIN i sur., 2007.).

Alfa aktinini (ACTN), u našem istraživanju pod oznakom gena LGALS7B, su glavni citoskeletni proteini i pokazuju mnoge nemišićne funkcije. Novi dokazi otkrili su regulatornu ulogu ACTN-a u tumorigenezi, međutim, obrazac ekspresije, biološke funkcije i temeljni mehanizam ACTN1 u hepatocelularnom karcinomu (HCC) ostaju uglavnom neistraženi (CHEN i sur., 2021.).

## 7. ZAKLJUČCI

1. Prosječna dob pasa s tumorom testisa iznosi 11,4 godine.
2. Tumor Leydigovih stanica najzastupljeniji je tip tumora testisa.
3. Koncentracija anti-Müllerova hormona u serumu je značajno viša u pasa s tumorom testisa u odnosu na kontrolnu skupinu pasa.
4. Zdravi psi imaju najnižu vrijednost anti-Müllerova hormona u serumu
5. Seminomi imaju značajno višu koncentraciju anti-Müllerova hormona u serumu u odnosu na ostale tumore testisa.
6. Imunohistokemijski biljeg Ki-67 ne pokazuje veću ekspresiju u skupini pasa s tumorom testisa u odnosu na kontrolnu skupinu.
7. Imunohistokemijski biljeg anti-Müllerov hormon pokazuje veću ekspresiju kod tumora Sertolijevih stanica i seminoma u odnosu na kontrolnu skupinu pasa.
8. Proteomskim analizama seruma utvrđene su značajne promjene ekspresije proteina u skupini pasa s tumorom testisa u odnosu na kontrolnu skupinu, od čega je većina proteina uključena u hemostazu.
9. Proteomskim analizama tkiva testisa utvrđene su značajne promjene ekspresije proteina u skupini pasa s tumorom testisa u odnosu na kontrolnu skupinu, od čega je većina proteina uključena u imunski sustav i stanični odgovor na stres.
10. Proteomskim analizama tkiva testisa utvrdili smo veću ekspresiju proteina koji su vezani uz onkogene procese u skupini pasa s tumorom testisa u odnosu na kontrolnu skupinu pasa.



## 8. POPIS LITERATURE

1. ACKERMANN, A., A. BRIEGER (2019): The Role of Nonerythroid Spectrin  $\alpha$ II in Cancer. *J Oncol.* 2019. 7079604. 10.1155/2019/7079604
2. ADEL, A., M. KHADIDJA (2017): Canine Prostatic Disorders. *Veterinary Medicine – Open Journal*, 2(3), 83-90.
3. AEBERSOLD, R., M. MANN (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207. 10.1038/nature01511.
4. AEBERSOLD, R., M. MANN (2016): Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 537, 347-355.
5. ANDERSSON, M. U. JÖNSSON, A. OLSSON (2002): A slow form of alpha-2-macroglobulin in diseased and healthy dogs. *J Comp Patho*, 1127(1), 37-44. 10.1053/jcpa.2002.0564.
6. ANGELOPOULOU, K., I. Prassas, G.M. Yousef (2009): The canine kallikrein-related peptidase 14: Structural characterization, alternative splicing and differential expression in mammary cancer. *Gene* 446, 68–74.
7. APWEILER, R., A. BAIROCH, C. H. WU (2004): Protein sequence databases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 76–80. 10.1016/j.cbpa.2003.12.004.
8. BANCO., B., M. C. VERONESI, C. GIUDICE, A. ROTA, V. GRIECO (2012): Immunohistochemical Evaluation of the Expression of Anti-Müllerian Hormone in Mature, Immature and Neoplastic Canine Sertoli Cells. *J Comp Pathol.* 146 (1), 18 – 23.
9. BATRA, J., J. F. HULTQUIST, D. LIU, O. SHTANKO, J. VON DOLLEN, L. SATKAMP, G. M. JANG, P. LUTHRA, T. M. SCHWARZ, G. I. SMALL, E. ARNETT, M. ANANTPADMA, A. REYES, D. W. LEUNG, R. KAAKE, P. HAAS, C. B. SCHMIDT, L. S. SCHLESINGER, D. J. LACOUNT, R. DAVEY, G. K. AMARASINGHE, C. F. BASLER, N. J. KROGAN (2018): Protein Interaction Mapping Identifies RBBP6 as a Negative Regulator of Ebola Virus Replication. *Cell* 175, 1917–1930. 10.1016/j.cell.2018.08.044.
10. BERR, A.L., K. WIESE, G. DOS SANTOS (2023): Vimentin is required for tumor progression and metastasis in a mouse model of non–small cell lung cancer. *Oncogene* 42, 2074–2087. 10.1038/s41388-023-02703-9.

11. BILIĆ, P., J. KULEŠ, A. GALAN, L. GOMES DE PONTES, N. GUILLEMIN, A. HORVATIĆ, A. FESTA SABES, V. MRLJAK, P. D. ECKERSALL (2018): Proteomics in Veterinary Medicine and Animal Science: Neglected Scientific Opportunities with Immediate Impact. *Proteomics* 18, 10.1002/pmic.201800047.
12. BODZON-KULAKOWSKA, A., A. BIERCZYNSKA-KRZYSIK, T. DYLAG, A. DRABIK, P. SUDER, M. NOGA, J. JARZEBINSKA, J. SILBERRING (2007): Methods for samples preparation in proteomic research. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 849, 1-31. 10.1016/j.jchromb.2006.10.040.
13. BOSCHIERO, C., X. DAI, P. K. LUNDQUIST, S. ROY, T. C. DE BANG, S. ZHANG, Z. ZHUANG, I. TORRES-JEREZ, M. K. UDVARDI, W. R. SCHEIBLE, P. X. ZHAO (2020): MtSSPdb: the Medicago truncatula Small Secreted Peptide Database. *Plant Physiol.* 183, 399–413. 10.1104/pp.19.01088.
14. CÂMARA, L. B. R. M., D. R. CÂMARA, F. C. MAIORION, V. A. SILVA JÚNIOR, M. M. P. GUERRA (2014): Canine testicular disorders and their influence on sperm morphology. *Anim Reprod.* 11 (1), 32 – 36.
15. CAPAK, H., LJ. BEDRICA, Z. VRBANAC, I. HARAPIN (2012): Dijagnostika i liječenje bolesti prostate u pasa. *Vet.stan.* 6. 507-514.
16. CERGOLJ i SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 15-34.
17. CHEN, Q., X. W. ZHOU, A. J. ZHANG (2021): ACTN1 supports tumor growth by inhibiting Hippo signaling in hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 40, 23. 10.1186/s13046-020-01821-6.
18. CHONG, J. i XIA, J. (2018): MetaboAnalystR: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. *Bioinformatics*, 27 4313–4314.
19. COFFEY, D.S., P.C. WALSH (1990): Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia, *The Urologic Clinics of North America*, 17(3), 461-475.
20. DEDIĆ PLAVETIĆ, N., J. JAKIĆ- RAZUMOVIĆ, M. BARIĆ, A. KULIĆ, M. SIROTKOVIĆ- SKERLEV, D. VRBANEC (2013): Prognošička vrijednost ki-67 u karcinomima dojke: usporedba metode tkivnog mikropostroja s metodom analize cijelog reza. 6. Simpozij i godišnji sastanak Hrvatskog društva za internističku onkologiju HLZ-a, 7. – 11. studeni, Zagreb, 64 – 64.

21. DJURENOVIC, D., L. FAGERBERG, B. HALLSTRO, A. DANIELSSON, C. LINDSKOG, M. UHLE, F. PONTE (2014): The huan testis -specific proteome defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *Molecular Human Repro.*, 20(6), 476-488.
22. DOWSETT, M., N. ELSEEN, T. O NIELSEN, R. A'HERN, J. BARTLETT, R.C. COOMBES, J. CUZIK, M. ELLIS, N.L. HENRY, J.C. HUGH, T. LIVELY, L. MCSHANE, S. PAIK, F. PENAULT-LLORCA, LJ. PRUDKIN, M. REGAN, J. SALTER, C. SOTIRIOU, I.E. SMITH, G. VIALE, J.A. ZUJEWSKI, D.F. HAYES (2011): Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J. NATL. Cancer Inst.* 103: 1656-1664.
23. EFENDIĆ, M., N. MAĆEŠIĆ, T. KARADJOLE, H. CAPAK, B. BEER-LJUBIĆ, M. BRKLJAČIĆ, M. CRNOGAJ, J. GOTIĆ, I. KIŠ, N. KUČER, V. MATIJATKO, I. ŠMIT, M. TORTI, M. HOHŠTETER, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, D. MILAS, D. VNUK (2021): Incidence of testicular tumors in dogs undergoing elective orchidectomy. 9th International Congress Veterinary Science and Profession, 9. listopad, Zagreb, 97 – 97.
24. EFENDIĆ, M. (2023): Serum, tissue, and proteomic analyses of testicular tumor marker s in dogs. Book of abstracts 10th International Congress Veterinary Science and Profession.5th-7th October 2023, Zagreb Croatia, pp. 156.
25. EFENDIĆ, M., D. VNUK, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, M. HOHŠTETER, J. KULEŠ, A. MUSULIN, N. MAĆEŠIĆ (2024): Testicular tumors in dogs. *Vet. stn.* 55, 721-728. 10.46419/vs.55.6.12
26. ENGLAND, G.W. (2010): The reproductive cycle. In: *BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. II Edition (England, G.W., A.W. Heimendahl ur.), UK, 1-44.
27. ESTALLER, A., M. KESSLER, A. WEHREND, J. HIRSCHBERGER, S. NEUMANN (2022): Utility of Serum Ki-67 as a Marker for Malignancy in Dogs. *Animals.* 12 (10), 1263.
28. FICHTNER, A., H. BOHNENBERGER, O. ELAKAD, A. RICHTER, C. LENZ, C. OING, P. STRÖBEL, S. KUEFFER, D. NETTERSHEIM, F. BREMMER (2022): Proteomic profiling of cisplatin-resistant and cisplatin-sensitive germ cell tumour cell lines using quantitative mass spectrometry. *World J. of Urology*, 40, 373-383.

29. FOSTER, R.A., P.W. LADDS (2007): Male genital system. U: Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of Domestic Animals. 5th ed. Vol. 3. (Grant Maxie, M., Ur.) Elsevier Saunders, Philadelphia.565-619.
30. FRESHMAN, J.L. (2002): Semen collection and evaluation. In: Clinical Techniques in Small Animal Practice. (Greco, D.S.), Saunders Elsevier, St. Louis, pp. 104-107.
31. GE, S.X., D. JUNG, R. YAO (2019): ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, 15;36(8), 2628-2629. 10.1093/bioinformatics/btz931.
32. GILLESPIE, M., B. JASSAL, R. STEPHAN, M. MILACIC, K. ROTHFELS, A. SENFF-RIBEIRO, J. GRISS, C. SEVILLA, L. MATTHEWS, C. GONG, C. DENG, T. VARUSAI, E. RAGUENEAU, Y. HAIDER, B. MAY, V. SHAMOVSKY, J. WEISER, T. BRUNSON, N. SANATI, L. BECKMAN, X. SHAO, A. FABREGAT, K. SIDIROPOULOS, J. MURILLO, G. VITERI, J. COOK, S. SHORSER, G. BADER, E. DEMIR, C. SANDER, R. HAW, G. WU, L. STEIN, H. HERMJAKOB, P. D'EUSTACHIO (2022): The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucl. Acids Res.* 50 (D1), D687-D692.
33. GONZALES-SANCHEZ, L., M. A. COBOS-FERNANDEZ, P. LOPEZ-NIEVA, M. VILLA-MORALES, K. STAMATAKIS, J. M. CUEZVA, J. L. MARIN-RUBIO, I. VAZQUEZ-DOMINGUEZ, I. GONZALEZ-VASCONCELLOS, E. SALIDO, P. LLAMAS, J. L. LOPEZ-LORENZO, J. SANTOS, J. FERNANDEZ-PIQUERAS (2020): Exploiting the passenger ACO1-deficiency arising from 9p21 deletions to kill T-cell lymphoblastic neoplasia cells. *Carcinogenesis*. 41, 1113-1122. 10.1093/carcin/bgz185.
34. GOPINATH, D., D. DRAFFAN, A. W. PHILBEY, R. BELL (2009): Use of intralesional oestradiol concentration to identify a functional pulmonary metastasis of canine sertoli cell tumour. *J Small Anim Pract.* 50 (4), 198 – 200.
35. GRAVES P.R., T.A. HAYSTEAD (2002): Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 39-63.
36. GRINSWOLD, M.D. (2016): Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol. Rev.*, Washington, 96, 1-17.
37. GUO, R., T. LIU, M. D. SHASALTANEH, X. WANG, S. IMANI, Q. WEN (2022): Targeting Adenylate Cyclase Family: New Concept of Targeted Cancer Therapy. *Front Oncol.* 12, 829212. 10.3389/fonc.2022.829212.

38. GUYTON, A.C., J. E. HALL (2017): Medicinska fiziologija. Medicinska naklada, Zagreb, 13. Izdanje.
39. HECK, M., B. A. NEELY (2020): Proteomics in Non-model Organisms: A New Analytical Frontier. *J. Proteome Res.* 19, 3595–3606. 10.1021/acs.jproteome.0c00448.
40. HITOSHI, A., Y. HIDAKA, H. KATAMOTO (2014): Evaluation of anti-Müllerian hormone in a dog with a Sertoli cell tumour. *Vet Dermatol.* 25 (2), 142 – 145.
41. HLOUŠEK KASUN, A. (2015): Uloga tireodoksina u adaptaciji stanice na oksidativni stres. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska.
42. HOHŠTETER, M. (2012): Poredbena patologija tumora sjemenika psa i čovjeka u Republici Hrvatskoj. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.
43. HOHŠTETER, M., B. ARTUKOVIĆ, K. SEVERIN, A. GUDAN KURILJ, A. BECK, I.-C. ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, Ž. BRABAREVIĆ (2014): Canine testicular tumors: two types of seminomas can be differentiated by immunohistochemistry. *BMC Vet Res.* 10, 169
44. HOLLINSHEAD, F. K., C. WALKER, D. W. HANLON (2016): Determination of the normal reference interval for anti-Müllerian hormone (AMH) in bitches and use of AMH as a potential predictor of litter size. *Reprod Domest Anim.* 53 (2), 35 – 40.
45. HOLST, B. S., U. DREIMAINS (2015): Anti-Müllerian hormone: a potentially useful biomarker for the diagnosis of canine Sertoli cell tumours. *BMC Vet Res.* 11, 166.
46. HORNAKOVA, L., T. VRBOVSKA, M. PAVL'AK, A. VALENCAKOVA-AGYAGOSOVA, M. HALO, J. HAJURKA (2017): The evaluation of blood concentrations of testosterone, 17 $\beta$ -oestradiol and anti-Müllerian hormone in dogs with cryptorchidism and testicular tumours. *Pol J Vet Sci.* 20, 677 – 685.
47. HORVATIĆ, A., N. GUILLEMIN, H. KAABB, D. MCKEEGAN, E. O'REILLY, M. BAIN, J. KULEŠ, D. P. ECKERSALL (2019): Quantitative proteomics using tandem mass tags in relation to the acute phase protein response in chicken challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin. *J. Proteomics* 192, 64-77. doi: 10.1016/j.jprot.2018.08.009.

48. JHUN, H., W.-Y. LEE, J.-K. PARK, S.-G.O. HWANG, H.-J. PARK (2022): Transcriptomic Analysis of Testicular Gene Expression in a Dog Model of Experimentally Induced Cryptorchidism. *Cells*, 11, 2476. 10.3390/cells11162476.
49. JOHNSTON, D. S., M. V. ROOT KUSTRITZ, P. N. S OLSON (2001): Semen collection, evaluation and presentation. U: Canine and feline theriogenology. W.B. Saunders, Philadelphia, 287-306.
50. KAY, N.D. (2006): Disease of the Prostate Gland. U: Saunders Manual of Small Animal Practice (Birchard, S.J., R.G. Sherding), Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 949.
51. KELMER SACRAMENTO, E., J. M. KIRKPATRICK, M. MAZZETTO, M. BAUMGART, A. BARTOLOME, S. DI SANZO, C. CATERINO, M. SANGUANINI, N. PAPAEOGENIOU, M. LEFAKI, D. CHILDS, S. BAGNOLI, E. TERZIBASI TOZZINI, D. DI FRAIA, N. ROMANOV, P. H. SUDMANT, W. HUBER, N. CHONDROGIANNI, M. VENDRUSCOLO, A. CELLERINO, A. ORI (2020): Reduced proteasome activity in the aging brain results in ribosome stoichiometry loss and aggregation. *Mol. Syst. Biol.* 16, e9596. 10.15252/msb.20209596.
52. KENNEDY, P. C., J. M. CULLEN, J. F. EDWARDS, M. H. GOLDSCHMIDT, S. LARSEN, L. MUNSON, S. NIELSEN (1998): Histological classifications of tumors of the genital system of domestic animals. World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, 4: 17-18. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology.
53. KHAN, F.A., C. J. GARTLEY, A. KHANAM (2018): Canine cryptorchidism: An update. *Reprod Domest Anim.* 53 (6), 1263 – 1270.
54. KREUNIN, P., J. ZHAO, C. ROSSER, V. URQUIDI, D.M. LUBMAN, S. GOODISON (2007): Bladder cancer associated glycoprotein signatures revealed by urinary proteomic profiling. *J. Proteome Res.* 6, 2631-9.
55. KULEŠ, J., L. LOVRIĆ, A. GELEMANOVIĆ, B. BEER LJUBIĆ, I. RUBIĆ, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ (2021): Complementary liver and serum protein profile in wild boars infected by the giant liver fluke *Fascioloides magna* using tandem mass tags quantitative approach. *J. Proteomics* 247, 104332.

56. LIANG, J., Y. ZHENG, W. ZENG, L. CHEN, S. YANG, P. DU, Y. WANG, X. YU, X. ZHANG (2020): Comparison of proteomic profiles from the testicular tissue of males with impaired and normal spermatogenesis. *System Biology in Reproduct.Med.*, 62(2), 127-136.
57. LIAO, A. T., P.-Y. CHU, L.-S. YEH, C.-H. LIU (2009): A 12-Year Retrospective Study of Canine Testicular Tumors. *J Vet Med Sci.* 71 (7), 919 – 923.
58. LIN, T. C., C. H. YANG, L. H. CHENG, W. T. CHANG, Y. R. LIN, H. C. CHENG (2019): Fibronectin in Cancer: Friend or Foe. *Cells.* 9. 27. 10.3390/cells9010027.
59. MARGETIĆ, S. (2012): Inflammation and haemostasis. *Biochem Med (Zagreb)*, 22(1), 49-62.
60. MARGETIĆ, S., D. ČARŽAVEC (2018): Bolesti heomstaze. U: *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi.* (Topić, E., D. Primorac, S. Janković, M. Štefanović, ur.). Zagreb, Medicinska naklada, 349-387.
61. MARUYANA, K., M. AKIYAMA, T. MIYATA, K. KOKAME (2018): Protein S K196E mutation reduces its cofactor activity for APC but not for TFPI. *Res Pract Thromb Haemost.*,2, 751–756.
62. MATTHEEUWS, D., F. H. COMHAIRE (1989): Concentrations of oestradiol and testosterone in peripheral and spermatic venous blood of dogs with unilateral cryptorchidism. *Domest Anim Endocrinol.* 6 (3), 203 – 209.
63. MIHOKOVIĆ, S. D. KNEZIĆ, M. MIŠIĆ, M. POPOVIĆ, M. HOHŠTETER (2017): Komparativna analiza tumora sjemenika pasa upotrebom histopatološke pretrage i metodom protočne citometrije. *Veterinar*, 55 (1), 2–8.
64. MILARDI, D., G. GRANDE, F. VINCENZONI, F. PIERCONTI, A. PONTECORVI (2019): Proteomics for the Identification of Biomarkers in Testicular Cancer-Review. *Front. Endocrinol.* 10, 462.
65. MISCHKE, R., D. MEURER, H.-O. HOPPEN, S. UEBERSCHÄR, M. HEWICKER-TRAUTWEIN (2002): Blood plasma concentrations of oestradiol-17b, testosterone and testosterone/oestradiol ratio in dogs with neoplastic and degenerative testicular diseases. *Res Vet Sci.* 73 (3), 267–272.

66. MUÑOZ-BERNART, M., N. BUDNIK, A. CASTRO, M. MANZI, M. E. MONGE, J. PIOLI, s. DEFRANCHI, G. PARRILLA, J. P. SANTILLI, K. DAVIES, J. M. ESPINOSA, K. KOBAYASHI, C. VIGLIANO, C. PEREZ-CASTRO (2023): S-adenosylhomocysteine hydrolase-like protein 1 (AHCYL1) inhibits lung cancer tumorigenesis by regulating cell plasticity. *Biol Direct.* 18, 8. 10.1186/s13062-023-00364-y.
67. PAPAIOANNOU, N., D. PSALLA, M. ZAVLARIS, P. LOUKOPOULOS, N. TZIRIS, I. VLEMMAS (2009): Immunohistochemical expression of dogTERT in canine testicular tumours in relation to PCNA, ki67 and p53 expression. *Vet Res Commun.* 33 (8), 905–919.
68. PETERS, M. A. J., F. H. DE JONG, K. J. TEERDS, D. G. DE ROOIJ, S. J. DIELEMAN, F. J. VAN SLUIJS (2000): Ageing, testicular tumours and the pituitary–testis axis in dogs. *J Endocrinol.* 166 (1), 153–161.
69. PETRAČ, L. (2015): Analozi gonadotropin oslobađajućeg hormona u humanojoj reprodukciji. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska.
70. POPOVA I JÜCKER (2022): The Functional Role of Extracellular Matrix Proteins in Cancer. *Cancers (Basel)*, 4;14(1),238. 10.3390/cancers1401023.
71. POSASTIUC, F.P., A. I. DIACONESCU, N. T. CONSTANTIN, C. MICȘA, M. CODREANU (2022): Potential biomarkers for testicular cancer in dogs – groundwork for innovative screening programs: a review. *Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine.* 68 (1), 100–107.
72. PROPADALO, T. (2019): Metode procjene kvalitete ejakulata i rasplodnog potencijala vojnih radnih pasa. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.
73. REN, A., M. WEI, Y. YANG, L. YANG, J. YANG (2020): Detection and value of serum antigen KI-67 (ki67) in clinical diagnosis of breast cancer patients. *Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* 36, 1124-1128.
74. REZAIIE, Y., F. FATTAHI, B. MASHINCHI, K. K. HESARI, S. MONTAREZI, E. KALANTARI, Z. MADJD, L. S. ZANJANI (2023): High expression of Talin-1 is associated with tumor progression and recurrence in melanoma skin cancer patients. *BMC Cancer* 23, 302. 10.1186/s12885-023-10771-z.



75. ROBINSON, B., D.E. NOAKES (2019): Basic Physiology. U: Veterinary Reproduction and Obstetrics. (Noakes, D.E., E. Parkinson, G.C.W. England). Saunders Ltd., St. Louis, 13-20.
76. SAMARDŽIJA, M., D. ĐURIČIĆ, T. DOBRANIĆ, M. HERAK, S. VINCE (2010): Rasplodivanje ovaca i koza. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 34-45.
77. SAMARDŽIJA, M., T. MAGAŠ, L. RADMANIĆ, J. PLEADIN (2018): Primjena testosterona u domaćih životinja – terapijsko i anaboličko djelovanje. Vet.stan. 49(4).
78. SHAH, P. S., N. LINK, G. M. JANG, P. P. SHARP, T. ZHU, D. L. SWANEY, J. R. JOHNSON, J. VON DOLLEN, H. R. RAMAGE, L. SATKAMP, B. NEWTON, R. HÜTTENHAIN, M. J. PETIT, T. BAUM, A. EVERITT, O. LAUFMAN, M. TASSETTO, M. SHALES, E. STEVENSON, G. N. IGLESIAS, L. SHOKAT, S. TRIPATHI, V. BALASUBRAMANIAM, L. G. WEBB, S. AGUIRRE, A. J. WILLSEY, A. GARCIA-SASTRE, K. S. POLLARD, S. CHERRY, A. V. GAMARNIK, I. MARAZZI, J. TAUNTON, A. FERNANDEZ-SESMA, H. J. BELLEN, R. ANDINO, N. J. KROGAN (2018): Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. Cell 175, 1931–1945. 10.1016/j.cell.2018.11.028.
79. SKOKO, M., I. MIHIĆ-LASAN, J. CULEJ, G. KRAJAČIĆ-KARAS, T. VUČEMILO, D. ŠTURM (2012): Koncentracija feritina u serumu kod bolesnika sa solidinim tumorima. Cro. J. Onco. 40, 1-3.
80. SONG, D.-W., C.-M. LEE, S.-G. KIM, M.-H. KANG, D.-W. KIM, H.-Y. KIM, K. EOM, H.-M. PARK (2021): Testosterone/Estradiol Ratio in a Dog with Sertoli Cell Tumor-Seminoma Combination. J Vet Clin. 38 (5), 221–224.
81. SZKLARCZYK, D., R. KIRSCH, M. KOUTROULI, K. NASTOU, F. MEHRYARY, R. HACHILIF, G.L. ANNIKA, T. FANG, N.T. DONCHEVA, S. PYYSALO, P. BORK, L.J. JENSEN, C. VON MERING (2023): The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. Nucleic Acids Res.;51(D1), 638-646.
82. ŠIMONJI, K. (2023): Proteomsko profiliranje seruma i jetre jelena običnog (*cervus elaphus*) primjenom spektrometrije masa. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.

83. ŠPOLJARIĆ, B., D. SVODOBA, S. VINCE, J. GRIZELJ, D. ŠPOLJARIĆ, I. STOLIĆ, M. POPOVIĆ, I. FOLNOŽIĆ (2018): Farmakološke metode indukcije pobačaja ukuja. *Vet.stan.* 49, 441-453.
84. THE ATLAS OF GENETICS AND CYTOGENETICS IN ONCOLOGY AND HAEMATOLOGY. <https://atlasgeneticsoncology.org/gene/42923/a2m>. (24.02.2024.).
85. THE HUMAN GENE DATABASE. <https://www.genecards.org> (25.02.2024.).
86. THE UNIPROT CONSORTIUM (2020): UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucl. Acids Res.* 49 (D1), D480-D489. 10.1093/nar/gkaa1100.
87. THEMEN, A. P. N., B. KALRA, J. A. VISSER, A. KUMAR, G. SAVJANI, J. DE GIER, S. JAQUES (2016): The use of anti-Müllerian hormone as diagnostic for gonadectomy status in dogs. *Theriogenology.* 86 (6), 14667–1747.
88. THOMAS, P.D., D. EBERT, A. MURUGANUJAN, T. MUSHAYAHAMA, L.P. ALBOU, H. MI (2022): PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Society*, 31(1):8-22. 10.1002/pro.4218.
89. TZAVLAKI, K., A. MOUSTAKAS (2020): TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules.*, 10 (3), 487.
90. VUČINIĆ, S. (2014): Nove tehnologije u veterinarskoj medicine – proteomika. <https://veterina.com.hr/?p=28087> (28.02.2024.)
91. VUJAČIĆ, S. (2018): Identifikacija novih molekularnih biomarkera – proteomika. *Sanamed*, 13(1), 51-59.
92. VULJAK, P. (2021): Dijagnostika i liječenje tumora testisa pasa. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.
93. WALTER, B. (2020): Anti-Müllerian hormone in dogs and cats reproduction. *Reprod Domest Anim.* 55 (S2), 26–31.
94. WANG, J., W. PAN (2020): The Biological Role of the Collagen Alpha-3 (VI) Chain and Its Cleaved C5 Domain Fragment Endotrophin in Cancer. *Oncotargets Ther.* 13, 5779–5793. 10.2147/OTT.S256654
95. WASINGER, V. C., S. J. CORDWELL, A. CERPA-POLJAK, J. X. YAN, A. A. GOOLEY, M. R. WILKINS, M. W. DUNCAN, R. HARRIS, K. L. WILLIAMS, I. HUMPHERY-SMITH (1995): Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16, 1090-1094. 10.1002/elps.11501601185.

96. WISNIEWSKI, J. R., A. ZOUGMAN, N. NAGARAJ, M. MANN (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* 6, 359-365. 10.1038/nmeth.1322.
97. WITHERS, S. C. M. LAWSON, A. G. BURTON, R. B. REBHUN, M. A. STEFFEY (2016): Management of an invasive and metastatic Sertoli cell tumor with associated myelotoxicosis in a dog. *Can Vet J.* 57 (3), 299–304.
98. YAGCI, I. P, M. PEKCAN, I. M. POLAT, H. KALENDER, H. C. MACUN (2016): Does serum anti-Müllerian hormone levels always discriminate presence of the ovaries in adult bitches? Comparison of two ELISA kits. *Reprod Domest Anim.* 51 (6), 910–915.
99. YATES, J. R., C. I. RUSE, A. NAKORCHEVSKY (2009): Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Engl.* 11, 49-79. 10.1146/annurev-bioeng-061008-124934.
100. ZHENG, D., H. CHEN, J. DAVIDS, M. BRYANT, A. LUCAS (2013): Serpins for diagnosis and therapy in cancer. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 13(2),123-132. 10.2174/1871529x11313020005.
101. ZHENG, Y., S. M. SWEET, R. POPOVIC, E. MARTINEZ-GARCIA, J. D. TIPTON, P. M. THOMAS, J. D. LICHT, N. L. KELLEHER (2012): Total kinetic analysis reveals how combinatorial methylation patterns are established on lysines 27 and 36 of histone H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 13549–13554. 10.1073/pnas.1205707109.

## 9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Maša Efendić, dr. med. vet. rođena je u Zagrebu 1987. godine. Diplomirala je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2013. godine. Tijekom studija usavršavala se u Nizozemskoj i Belgiji na klinikama za konje te je tijekom studija aktivno volontirala u dnevnim i noćnim dežurstvima na Klinici za porodništvo i reprodukciju gdje je bila i demonstrator. Dobitnica je dviju Dekanovih nagrada za znanstveno stručni rad tijekom studija. Nakon završetka fakulteta radila je u Veterinarskoj školi u Zagrebu te je završila Pedagoško psihološki studij za kompetencije nastavnika. Tijekom rada u Veterinarskoj školi upisala je poslijediplomski doktorski studij iz Veterinarskih kliničkih znanosti. Akademske godine 2018./2019. upisala je prvu generaciju „Internship“ programa iz malih životinja na matičnom fakultetu koji je uspješno i završila. Nakon završenog Internshipa interesna sfera su joj postale unutarnje bolesti te je dobila poziciju asistenta na Klinici za unutarnje bolesti. Autorica je i koautorica brojnih znanstveno stručnih radova. U slobodno vrijeme bavi se uzgojem Vajmarskih ptičara te je voditeljica uzgoja ptičara na području grada Zagreba.

### **Radovi objavljeni u časopisima indeksiranih u bazama Current Contents, WoSCC (Web of Science Core Collection) ili Scopus**

1. VOJTA, A., A. SHEK-VUGROVEČKI, L. RADIN, **M. EFENDIĆ**, J. PEJAKOVIĆ, M. ŠIMPRAGA (2011): Hematological and biochemical reference intervals in Dalmatian pramenka sheep estimated from reduced sample size by bootstrap resampling. *Vet. arhiv* 81. 25-33.
2. FOLNOŽIĆ, I., D. ĐURIČIĆ, N. MAĆEŠIĆ, M. ĐERI, **M. EFENDIĆ**, G. BAČIĆ, M. SAMARDŽIJA (2014): Cesarean section in the Oriental small-clawed otter, *Aonyx cinerea*: a case report. *Kleintierpraxis* 59. 674-677.
3. MAĆEŠIĆ, N., G. BAČIĆ, K. BOŽIČEVIĆ, M. BENIĆ, T. KARADJOLE, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, M. LOJKIĆ, **M. EFENDIĆ**, I. BAČIĆ, M. PAVLAK (2016): Assessment of the Zagreb mastitis test in diagnosis of subclinical mastitis in dairy cattle. *Vet. arhiv* 86. 475-485.

4. **EFENDIĆ, M.**, M. SAMARDŽIJA, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, M. LOJKIĆ, H. CAPAK, M. PEĆIN, N. MAĆEŠIĆ (2017): Postovulatory egg retention (dystocia) in lizards-diagnostic and therapeutic options. *Kleintierpraxis* 62. 754-764.
5. **EFENDIĆ, M.**, M. SAMARDŽIJA, H. CAPAK, G. BAČIĆ, N. MAĆEŠIĆ (2018): Hormonal induction of mummified fetus abortion in a breeding Weimaraner bitch. *Slov. Vet. Res.* 55. 193-200.
6. **EFENDIĆ, M.**, N. MAĆEŠIĆ, M. SAMARDŽIJA, A. VOJTA, N. KORABI, H. CAPAK, M. ABRAMOVIĆ SUŠNIĆ, I. ŽURA ŽAJA, M. PEĆIN, N. PRVANOVIĆ BABIĆ (2018): Determination of Sublethal Mutation Causing Lavender Foal Syndrome in Arabian Horses from Croatia. *J. Equine Vet. Sci.* 61. 72-75.
7. **EFENDIĆ, M.**, M. SAMARDŽIJA, H. CAPAK, G. BAČIĆ, B. ARTUKOVIĆ, G. JURKIĆ, H. VALPOTIĆ, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, N. MAĆEŠIĆ (2019): Endometrial polyp with chronic endometritis in an African pygmy hedgehog (*Atalapha albiventris*) – a case report. *Acta Veterinaria Brno*, 88. 337-340.
8. **EFENDIĆ, M.**, M. SAMARDŽIJA, H. CAPAK, G. BAČIĆ, I. ŽURA ŽAJA, V. MAGAŠ, N. MAĆEŠIĆ (2018): Induction of the oviposition in bearded dragon (*Pogona vitticeps*) with postovulatory egg retention (dystocia). *Vet. Arhiv* 89. 131-142.
9. KNEŽEVIĆ, K., V. DOBRANIĆ, D. ĐURIČIĆ, M. SAMARDŽIJA, M. BENIĆ, I. GETZ, **M. EFENDIĆ**, L. CVETNIĆ, J. ŠAVORIĆ, I. BUTKOVIĆ, M. CVETNIĆ, M. MAZIĆ, N. MAĆEŠIĆ (2021): Primjena broja somatskih stanica za dijagnostiku mastitisa i utjecaj na kakvoću mlijeka. *Vet. stn.* 52, 751-764.
10. MAĆEŠIĆ, N., T. FUMIĆ, S. DUVNJAK, G. BAČIĆ, L. CVETNIĆ, T. KARADJOLE, B. HABRUN, M. LOJKIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, **M. EFENDIĆ**, M. CVETNIĆ, M. BENIĆ (2022): Agreement of conventional microbiological and molecular identification of streptococci isolated from bovine milk. *Vet. arhiv* 92, 381-387.
11. MAĆEŠIĆ, N., I. BAČIĆ, M. LOJKIĆ, M. SAMARDŽIJA, M. BENIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, **M. EFENDIĆ**, T. KARADJOLE (2022): Selektivno zasušivanje mliječnih krava. *Vet. stn.* 53, 735-743.

12. VINCE, S., A. M. VEČKOVEC, H. VALPOTIĆ, D. ŠPOLJARIĆ, I. ŽURA ŽAJA, D. ĐURIČIĆ, D. LEINER, J. ŠAVORIĆ, I. BUTKOVIĆ, B. HABRUN, B. NJARI, A. K. JANJATOVIĆ, **M. EFENDIĆ**, M. SAMARDŽIJA, M. POPOVIĆ, I. VALPOTIĆ, B. ŠPOLJARIĆ (2022): Immunogenicity of a live bivalent non-enterotoxigenic Escherichia coli (non-ETEC) vaccine and dietary clinoptilolite efficacy against postweaning diarrheal disease of pigs due to F4+ and F18+ ETEC strains. Vet. stn. 92, 259-276.
13. KIŠ, I., M. BRKLJAČIĆ, A. KRIZMAN, V. MATIJATKO, G. JURKIĆ KRSTESKA, **M. EFENDIĆ**, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, D. POTOČNJAK, N. KUČER (2022): Hiperadrenokorticism u pasa. I dio: Definicija, klinička slika i laboratorijski nalazi. Vet. Stn. 53, 617-625.
14. KARADJOLE, T., LJ. FUČKALA, LJ. BEDRICA, N. MAČEŠIĆ, G. BAČIĆ, I. FOLNOŽIĆ, B. ŠPOLJARIĆ, J. ŠAVORIĆ, I. BUTKOVIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, **M. EFENDIĆ**, M. TOMIĆ (2023): Pokazatelji ukupnog antioksidacijskog statusa kuje prije i nakon ovarijektomije. Vet. stn. 54. 87-94.
15. PONGRAC, E., A. RAIĆ, L. EĆIMOVIĆ, I. KIŠ, **M. EFENDIĆ**, G. JURKIĆ KRSTESKA, M. BRKLJAČIĆ (2024): „Chiari like” malformacija. Vet. stn. 55, 421-428.
16. **EFENDIĆ, M.**, D. VNUK, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, M. HOHŠTETER, J. KULEŠ, A. MUSULIN, N. MAČEŠIĆ (2024): Testicular tumors in dogs. Vet. stn. 55, 721-728. 10.46419/vs.55.6.12

**Radovi objavljeni u časopisima koji su zastupljeni u bibliografskim bazama podataka CAB Abstracts, Medline, Biological Abstracts, Global Health, VetMed Resource ili u drugim odgovarajućim međunarodnim indeksnim publikacijama:**

1. PRVANOVIĆ BABIĆ, N., G. BAČIĆ, **M. EFENDIĆ**, N. MAČEŠIĆ, T. KARADJOLE, N. BRKLJAČA BOTTEGARO, M. LOJKIĆ, I. FOLNOŽIĆ, A. KOSTELIĆ, M. SAMARDŽIJA (2014): Reproductive management and possibility of introducing artificial insemination in Istrian donkeys. Vet. stn. 45. 229-238.
2. VRBANAC, Z., **M. EFENDIĆ**, N. BRKLJAČA BOTTEGARO, V. GUSAK, P. KOSTEŠIĆ, H. CAPAK, D. STANIN (2016): Acute coccygeal miopathy in dog – limber tail syndrome. Hrv. vet. vjesnik 24. 40-43.

3. BAČIĆ, G., M. RITOŠA, **M. EFENDIĆ**, I. BAČIĆ, M. SAMARDŽIJA (2016): Uterine prolapse in a Croatian drought horse-a case report. *Vet. stn.* 47 (6). 551-558.
4. MAČEŠIĆ, N., T. KARADJOLE, G. BAČIĆ, M. LOJKIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, D. LEVENTIĆ, M. CVETNIĆ, **M. EFENDIĆ** (2017): Dijagnostika i liječenje tumora mliječne žlijezde mačaka. *Vet. stn.*, 48 (2). 119-125.

**Radovi i sažetci radova recenziranih i objavljenih u zborniku sažetaka s domaćeg znanstvenog skupa i domaćeg znanstvenog skupa s međunarodnim sudjelovanjem:**

1. RADIN, L., A. VOJTA, A. SHEK-VUGROVEČKI, **M. EFENDIĆ**, M. ŠIMPRAGA (2009): Hematological and biochemical reference intervals for weaned Dalmatinska pramenka lambs - preliminary report. Proceedings of the International Scientific Meeting of Anatomy and Physiology, Fundamentals of Medicine. 12.-13. lipanj 2013., Zagreb, Hrvatska, pp. 16-24.
2. **EFENDIĆ, M.**, D. JAKŠIĆ, S. HORVAT, N. PRVANOVIĆ BABIĆ (2011): Reproductive efficiency of Lipizzan stallions during the application of natural cover and the ultrasound monitoring of the breeding. Book of Abstracts 4<sup>th</sup> International Congress "Veterinary Science and Profession. 3<sup>rd</sup> -4<sup>th</sup> October 2011, Zagreb, Croatia, pp. 53.
3. GETZ, I., M. RADOSAVLJEVIĆ, T. KARADJOLE, J. GRIZELJ, M. SAMARDŽIJA, T. DOBRANIĆ, G. BAČIĆ, N. MAČEŠIĆ, S. VINCE, I. FOLNOŽIĆ, **M. EFENDIĆ**, I. HAPARIN, N. PRVANOVIĆ-BABIĆ (2013): A retrospective study of casuistics in mares at Clinic for Obstetrics and Reproduction from year 2008 until 2012. Zbornik radova Veterinarski dani. 9-12. listopada 2013, Opatija, Hrvatska, pp.183-197.
4. PRVANOVIĆ BABIĆ, N., G. BAČIĆ, **M. EFENDIĆ**, N. MAČEŠIĆ, T. KARADJOLE, N. BRKLJAČA BOTTEGARO, I. GETZ, M. SAMARDŽIJA, I. FOLNOŽIĆ, S. VINCE, M. SELETKOVIĆ, K. ŠLOGAR, T. DOBRANIĆ (2013): The most frequent reproductive disturbances in istrian donkeys. Zbornik radova Veterinarski dani. 9-12. listopada 2013, Opatija, Hrvatska, pp. 199-207.

5. BAČIĆ, G., N. MAČEŠIĆ, T. KARADJOLE, M. LOJKIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, M. CERGOLJ, **M. EFENDIĆ** (2013): Standard milking procedures in milking parlour. Book of Abstracts 5<sup>th</sup> International Congress "Veterinary Science and Profession". 3<sup>rd</sup> -4<sup>th</sup> October 2013, Zagreb, Croatia, pp. 28.
6. BAČIĆ, G., T. KARADJOLE, N. MAČEŠIĆ, M. KARADJOLE, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, M. CERGOLJ, **M. EFENDIĆ**, M. PLATIŠA (2013): Importance of milkers education in mastitis prevention and milk quality improvement. Congress proceedings workshop book XIII Middle European Buiatric's Congress. 5<sup>th</sup> -8<sup>th</sup> June 2013, Belgrade, Serbia, pp. 1-23.
7. PRVANOVIĆ BABIĆ, N., N. MAČEŠIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, N. BRKLJAČA-BOTTEGARO, **M. EFENDIĆ**, M. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA (2014): Recovery of cyclicity postpartum and pregnancy length in Istrian jennies, an endangered Croatian donkey breed. Proceedings of the 18th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR). 11-13<sup>th</sup> September 2014, Helsinki, Finland. 89-89.
8. KARADOLE, T., G. BAČIĆ, N. MAČEŠIĆ, M. LOJKIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, **M. EFENDIĆ**, I. BAČIĆ (2015): Laparoscopic ovariohysterectomy in dogs. Book of Abstracts 17<sup>th</sup> Regional Symposium in "Small animal clinical pathology and therapy". 18<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> June 2015, Fruška Gora, Serbia, pp. 12-14.
9. VRBANAC, Z., **M. EFENDIĆ**, N. BRKLJAČA BOTTEGARO, V. GUSAK, P. KOSTEŠIĆ, H. CAPAK, D. STANIN (2015): Limber tail syndrome in Weimaraner dog-a case report. Book of Abstracts 6<sup>th</sup> International Congress "Veterinary Science and Profession". 1.-2. listopad 2015., Zagreb, Hrvatska, pp. 115-115.
10. BAČIĆ, I., N. MAČEŠIĆ, L. RADIN, J. ALADROVIĆ, K. MATANOVIĆ, T. MAŠEK, D. BROZIĆ, M. BENIĆ, B. RADIĆ, J. ŠURAN, **M. EFENDIĆ**, J. DAUD, A. KOSTELIĆ, G. BAČIĆ (2016): Preliminarni rezultati aplikacije intramamarne otopine propolisa (3% i 5%) u svrhu liječenja mastitisa mliječnih krava Krndija. Zbornik 6. Hrvatski veterinarski kongres, Opatija, Hrvatska, pp. 551-558.



11. **EFENDIĆ, M.**, M. SAMARDŽIJA, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, M. LOJKIĆ, H. CAPAK, Z. VRBANAC, N. MAČEŠIĆ (2017): Postovulatory egg retention (dystocia) in bearded dragon (*Pogona vitticeps*) - a case report. Book of Abstracts 7th International Congress "Veterinary Science and Profession". Zagreb, Hrvatska, pp. 123-123.
12. BAČIĆ, G., N. MAČEŠIĆ, T. KARADJOLE, M. LOJKIĆ, N. PRVANOVIĆ, I. BAČIĆ, **M. EFENDIĆ** (2018): Dystocia in reptiles-clinical cases. Proceedings of the 1st scientific and professional meeting on reptiles „Reptilia”. May 25th-26th, 2018, Zagreb, Croatia, pp. 25-29.
13. ŽURA ŽAJA, I., M. VILIĆ, M. SAMARDŽIJA, A. SHEK VUGROVEČKI, S. VINCE, **M. EFENDIĆ**, J. MILJKOVIĆ, M. RADIN, S. MILINKOVIĆ TUR (2018): Regulatory mechanisms of Vitamin D and calcium metabolisms in reptiles. Book of Abstracts 1st International Congress "Reptilia". Zagreb, Hrvatska, pp. 71-76.
14. CAPAK, H., L. CIGLAR, B. ŠKRLIN, **M. EFENDIĆ**, I. FOLNOŽIĆ, M. LUKAČ (2018): Radiographic findings in reptiles with metabolic bone disease. Book of Abstracts 1st International Congress "Reptilia". Zagreb, Hrvatska, pp. 113-115.
15. KARADJOLE, T., G. BAČIĆ, M. LOJKIĆ, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, M. SAMARDŽIJA, **M. EFENDIĆ**, I. ŽURA ŽAJA, V. BUTKOVIĆ, N. MAČEŠIĆ (2018): Endoskopska kirurgija u reprodukciji male prakse. 9. naučni simpozijum Reprodukcijska domaćih životinja. Zbornik predavanja. Lazarević, M. (ur.). Divčibare: Fakultet Veterinarske Medicine u Beogradu, Srbija, pp. 47-54.
16. **EFENDIĆ, M.**, D. VNUK, M. ABAFFY KIRIN, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, M. HOHŠTETER, H. CAPAK, N. MAČEŠIĆ, M. LIPAR (2019): Short recurrence time in dog with acanthomatous ameloblastoma – a case report. Book of abstracts 8th International Congress Veterinary Science and Profession. 10-12th October 2019, Zagreb Croatia, pp. 148.
17. **EFENDIĆ, M.**, N. MAČEŠIĆ, M. SAMARDŽIJA, T. KARADJOLE, M. LOJKIĆ, V. BENKO, Z. ŠTRITOF, V. STEVANOVIĆ, I. RAIČ, H. CAPAK (2019): Canine foetal mummification as consequence of prolonged gestation. Book of abstracts 8th International Congress Veterinary Science and Profession. 10-12th October 2019, Zagreb Croatia, pp. 155.

18. JOSIPOVIĆ, T., L. CIGLAR, **M. EFENDIĆ**, H. CAPAK (2019): Michrochip migration in dogs – is there breed predisposition? Book of abstracts 8th International Congress Veterinary Science and Profession.10-12th October 2019, Zagreb Croatia, pp. 78.
19. MAĆEŠIĆ, N., G. BAČIĆ, T. KARADJOLE, M. SAMARDŽIJA, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, S. VINCE, **M. EFENDIĆ**, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, M. LOJKIĆ (2020): Endoskopsko osjemenjivanje kuja//*Endoscopic artificial insemination of bitch*. Zbornik radova 11. naučnog simpozijuma „Reprodukcija domaćih životinja” Fakultet Veterinarske Medicine Univerziteta u Beogradu. Beograd, Republika Srbija, 2020., str. 33-41.
20. **EFENDIĆ, M.**, N. MAĆEŠIĆ, T. KARADJOLE, H. CAPAK, B. BEER-LJUBIĆ, M. BRKLJAČIĆ, M. CRNOGAJ, J. GOTIĆ, I. KIŠ, N. KUČER, V. MATIJATKO, I. ŠMIT, M. TORTI, M. HOHŠTETER, L. MEDVEN ZAGRADIŠNIK, D. MILAS, D. VNUK (2021): Incidence of testicular tumor sin dogs undergoing elective orchidectomy. Book of Abstracts 9th International Congress Veterinary Science and Profession, 9. listopad, Zagreb (Online). 97-98.
21. MAĆEŠIĆ. N., M. BENIĆ, T. KARADJOLE, M. LOJKIĆ, M. SAMARDŽIJA, S. VINCE, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, **M. EFENDIĆ**, I. BUTKOVIĆ, J. ŠAVORIĆ, I. BAČIĆ, N. SHARMA, G. BAČIĆ (2021): Primjena i analiza broja somatskih stanica u stadu mliječnih krava. Zbornik radova međunarodnog znanstveno – stručnog skupa “VETERINARSKI DANI 2021.”, 27. - 31. listopada 2021. godine, Vodice. 231-238.
22. **EFENDIĆ, M.**, I. BACAN, A. JAVOR, H. CAPAK, E. PONGRAC, I. ŠMIT, M. CRNOGAJ, I. JOVIĆ, T. DODIG, K. ŠIMONJI, N. MAĆEŠIĆ, I. KIŠ (2023): Multiple cartilaginous exostosis causing spinal cord compression in a bull terrier puppy – a case report. Book of abstracts 10th International Congress Veterinary Science and Profession.5th-7th October 2023, Zagreb Croatia, pp. 97.
23. JAVOR, A., **M. EFENDIĆ**, I. BACAN, A. KRALJEVIĆ, F. TOPOLNJAK, F. KEREKOVIĆ, M. HOHŠTETER, L. MEDEVEN ZAGRADIŠNIK, M. KRESZINGER, D. VNUK, Z. VRBANAC, H. CAPAK (2023): Atypical presentation of osteomyelitis in a german shepherd dog – a case report. Book of abstracts 10th International Congress Veterinary Science and Profession.5th-7th October 2023, Zagreb Croatia, pp. 96.

24. **EFENDIĆ, M.**, B. BEER LJUBIĆ, D. IVŠIĆ ŠKODA, V. ĐURIĆ, E. PONGRAC, G. JURKIĆ, V. MATIJATKO, M. BRKLJAČIĆ, N. KUČER, M. TORTI, D. GRAČNER, D. POTOČNJAK, H. CAPAK, D. VNUK, N. MAĆEŠIĆ (2023): A challenging case of canine angiostrongylosis – a case report. Book of abstracts 10th International Congress Veterinary Science and Profession.5th-7th October 2023, Zagreb Croatia, pp. 98.
25. **EFENDIĆ, M.**, I. KIŠ, E. PONGRAC, G. JURKIĆ, K. ŠIMONJI, M. VLAŠIĆ, N. MAĆEŠIĆ, D. VNUK, L. MEDVEN ZAGRADIPNIK, D. VLAHOVIĆ (2023): Central nervous system neoplasia affecting the pituitary gland resulting in sudden vision loss in young female dog – a case report. Book of abstracts 10th International Congress Veterinary Science and Profession.5th-7th October 2023, Zagreb Croatia, pp. 100.
26. **EFENDIĆ, M.** (2023): Serum, tissue, and proteomic analyses of testicular tumor markers in dogs. Book of abstracts 10th International Congress Veterinary Science and Profession.5th-7th October 2023, Zagreb Croatia, pp. 156.