

DOI 10.7251/VETJ1802370V

UDK 616.5-006.6:636.7.09

Originalni naučni rad

HISTOLOŠKI I IMUNOHISTOHEMIJSKI PARAMETRI BITNI ZA KLASIFIKACIJU MASTOCITOMA PASA^{1*}

Ivana Vučićević^{1*}, Darko Marinković¹, Vladimir Kukulj¹, Slađan Nešić¹, Milan Aničić¹, Sanja Aleksić-Kovačević¹

¹ Katedra za patološku morfolогију, Fakultet ветеринарске medicine,
Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija

* Korespondentni autor: Ivana Vučićević, e-mail adresa: ivucicevic@gmail.com

Kratak sadržaj: Mastocitomi su najučestaliji tumori kože паса. Vode poreklo iz kostne srži, a zbog vrlo променљивог биолошког понашања је предложено неколико критеријума за њихову класификацију, укључујући histološku gradaciju i markere proliferacije ćelija. Mitotski indeks, prisustvo вишеједарних ćelija, ćelija sa bizarnim jedrom i kariomegalija su најважнији параметри за класификацију мастоцитоме паса на мастоцитоме високог и ниског степена maligniteta. За потврду степена maligniteta мастоцитоме битно је утврдити и експресију transmemбранског receptora kinaza tipa (KIT) који игра значајну улогу у расту и диференцијацији мастоцита, а кога кодират c-KIT protoonkogen. Код мастоцитоме високог степена maligniteta, осим мембранске експресије KIT receptora, може се уочити и aberantna citoplazmatska експресија. Испитана су укупно 52 мастоцитоме паса и 12 узорака непромјенјене коже паса. Узорци коже фиксирани у formalinu и укалупљени у парафину су обојени hematoksilin-eozinom. Експресија KIT receptora је испитана применом imunohistoхемијске методе бојења. Класификација мастоцитоме на мастоцитоме високог и ниског степена maligniteta је извршена према критеријумима Kiupel-ове dvostepene класификације, узимајући у обзир и експресију KIT receptora. Од укупно 52 мастоцитоме паса 16 је било ниског степена maligniteta, док је 36 класификовано као мастоцитоме високог степена maligniteta, од којих 19 мастоцитоме показује citoplazmatsku експресију KIT receptora. Код свих 16 мастоцитоме ниског степена maligniteta исполјена је само мембранска експресија KIT proteina. Чинjenica да је код већине мастоцитоме високог степена maligniteta исполјена експресија KIT receptora у citoplazmi потврђује везу између aberantne експресије KIT receptora и повећане ćелијске proliferacije. Prisustvo mitotskih figura, вишеједарних ćelija, bizarnih jedara i kariomegalije, као и

^{1*} Презентован на 23. Годишњем савјетовању доктора ветеринарске medicine Републике Српске (БиХ).
Теслић, 6-9- јуна 2018.

tip ekspresije KIT receptora predstavljaju ključne prognostičke parametre kod pasa sa mastocitomima.

Кljučне речи: psi, mastocitom, klasifikacija, KIT receptor

UVOD

Mastocitomi su najčešći okrugloćelijski tumori kod pasa, koji ujedno predstavljaju najučestalije tumore kože kod ove životinjske vrste (Welle i sar., 2008). Prema poreklu, mastocitomi pripadaju grupi mezenhimskih tumora kože i mekih tkiva (Hendrick i sar., 1998). Sastavljeni su od različito diferentovanih mastocita koji se uočavaju kao okrugle ćelije sa različitom količinom granula u citoplazmi, poređane u redove ili grupe (Strefezzi i sar., 2009; Jovanović i sar., 2012). Mastocitomi se kod pasa najčešće sreću na trupu (50-60%), ekstremitetima (25 - 40%), glavi i vratu (10%). Na skrotumu, međici, leđima i repu tumor se ređe sreće (Welle i sar., 2008). Makroskopski izgled mastocitoma varira od stepena diferentovanosti. Dobro diferentovani mastocitomi se najčešće pojavljuju kao nodularne, nekapsulirane mase gumaste konzistencije, iznad kojih su polja kože bez dlake. Veličina varira od 1 do 4 cm u prečniku a klinički podsećaju na lipom. Slabije diferentovani mastocitomi imaju tendenciju bržeg rasta, manje su ograničeni i često praćeni inflamacijom i edemom okolnog tkiva (Jubb i sar., 2007). Na njihovoj površini mogu nastati ulceracije, dok se u blizini mogu razviti manji čvorići, tzv. satelitski noduli. Većina mastocitoma nije pigmentisana,

ali se kao povremen nalaz mogu uočiti eritematozni i hiperpigmentisani noduli (Welle i sar., 2008). Lezije na distalnim delovima ekstremiteta, usnama i u području prepona mogu biti u vidu slabo definisanih otoka ili nalik dermatitisu uzrokovanom lizanjem (acral lick dermatitis, eng.) (Gross i sar., 2005; Welle i sar., 2008). Maligni mastocitomi mogu metastazirati putem limfe ili krvi i u većini slučajeva, prvi znak metastaze je uvećanje regionalnog limfnog čvora. Metastaze mastocitoma na plućima su retke, dok se uglavnom javljaju na slezini, jetri i bubrezima, a mogu se često dijagnostikovati i na koži (Morris i sar., 2001).

Etiologija mastocitoma nije u potpunosti poznata, ali se smatra da je, kao i kod većine tumora, multifaktorijalna. Predispozicija pojedinih rasa govori u prilog značaja genetske komponente u nastanku mastocitoma (Welle i sar., 2008). Noviji radovi ističu ulogu površinskog receptora tirozin kinaze (KIT protein, CD117) u etiologiji mastocitoma (Vučićević i sar., 2016; Halsey i sar., 2017).

Dijagnoza mastocitoma postavlja se na osnovu citoloških bojenja preparata dobijenih pravljem razmaza dobijenog biopsijom tumora iglom ili

pravljena otisak preparata tkiva tumora. Od metoda bojenja, najčešće se koriste Romanowsky tip bojenja (npr. *Diff-Quik*, *Giemsa*, *Wright's*) ili New Methylene Blue (London i sar., 2003; Strefezzi i sar., 2009). Dok se na osnovu citoloških bojenja može utvrditi da li je u pitanju mastocitom, za klasifikaciju tumora je neophodan histopatološki pregled biopsiranog tkiva (Bostock, 1973; Patnaik i sar., 1984; Kiupel i sar., 2011). Diferencijalnodijagnostički, mastocitomi (naročito slabo diferentovani) se mogu zameniti sa drugim okruglo-ćelijskim tumorima (limfomom, plazmocitomom, histiocitomom i transmisivnim veneričnim tumorom) (Welle i sar., 2008; Oliveira i sar., 2012). U svrhu potvrđivanja dijagnoze mastocitoma i razlikovanja od drugih okrugloćelijskih tumora koristi se toluidin plavo (*toluidin blue* - TB, eng.) bojenje za vizuelizaciju citoplazmatskih granula (London i sar., 2003; Strefezzi i sar., 2009).

Klasifikacija mastocitoma je veoma bitna sa prognostičkog aspekta i izbora terapije. Primarna klasifikaciona determinanta je histološka građa mastocitoma. U novije vreme, koristi se dvostepeni sistem klasifikacije na mastocitome visokog i niskog stepena maligniteta. Na osnovu ove podele, mastocitomi visokog stepena maligniteta moraju imati ispunjen najmanje jedan od sledećih kriterijuma: najmanje 7 mitotskih figura na 10 hpf (*High-power Fields* – hpf, eng.), najmanje 3 multinuklearne ćelije na 10 hpf, najmanje 3 bizarna jedra na 10 hpf ili prisustvo

kariomegalije kod najmanje 10% neoplastičnih ćelija (Kiupel i sar., 2011). Predloženi dvostepeni sistem gradiranja trebao bi da se koristi pri svakom rutinskom histološkom ispitivanju i dijagnostikovanju mastocitoma. Za mastocitome visokog stepena maligniteta treba primeniti dodatna ispitivanja, kao što su određivanje ekspresije KIT receptora i skrining na c-KIT mutacije, kako bi se odredila adekvatna terapija (Kiupel i sar., 2011, Sabbatini i sar., 2014).

KIT protein je receptor za faktor rasta matične ćelije i normalno se nalazi na površini hematopoetskih ćelija i mastocita, igrajući značajnu ulogu u rastu i diferencijaciji ovih ćelija. KIT receptor je transmembranski receptor kinaza tip III koga kodira c-KIT protoonkogen. Ekspresija KIT receptora dokazana je imunohistohemijским bojenjem, kako na površini normalnih, tako i na površini neoplastično transformisanih mastocita pasa. Povećana ekspresija zabeležena je kod slabo diferentovanih i nediferentovanih mastocitoma (Welle i sar., 2008; El-Agamy, 2012). Izuzev membranske ekspresije, opisana je ekspresija KIT proteina fokalno i difuzno u citoplazmi. Tip I ekspresije KIT receptora se karakteriše prebojavanjem membrane mastocita usled lokalizacije KIT proteina u membrani ćelija, dok je prebojavanje citoplazme prisutno u maloj meri ili potpuno izostaje. Tip II ekspresije se karakteriše difuznim prebojavanjem citoplazme. Tip III ekspresije je takođe vezan za prisustvo KIT proteina u

citoplazmi naoplastičnih mastocita i karakteriše se intenzivnim fokalnim prebojavanjem citoplazme neoplastičnih mastocita. Poremećaji u ekspresiji mogu doprineti neoplastičnoj transformaciji (Misdorp, 2004; Takeuchi i sar., 2010). Povećano prisustvo KIT receptora u citoplazmi (fokalno ili difuzno) je u korelaciji sa kraćim preživljavanjem pasa sa mastocitomom, kao i sa kraćim

intervalom do remisije bolesti u odnosu na mastocitome kod kojih je povećana ekspresija membranskih KIT receptora (Webster i sar., 2004).

Cilj našeg ispitivanja je da odredimo vezu između lokalizacije KIT receptora na malignim mastocitima i histološkog stepena posmatranog mastocitoma kod pasa.

MATERIJAL I METODE

Životinje

Ispitivanjima su obuhvaćeni iseći kože 52 psa kod kojih je kliničkim pregledom postavljena sumnja na mastocitom. Iseći nepromenjene kože 12 odraslih pasa, uzorkovani na obdukciji, služili su kao kontrola. Psi različite rase i pola, uzrasta od 3 do 11 godina, poticali su sa teritorije Republike Srbije. Histopatološka dijagnoza kod ovih pasa postavljena je na Katedri za patološku morfologiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

Histopatologija

Neposredno nakon biopsije tumora kože pasa, uzorci su fiksirani u 10% neutralnom puferizovanom formalinu ne duže od 48 sati, posle čega su procesovani u automatskom tkivnom procesoru LEICA TP1020. Parafinski blokovi su sečeni pomoću mikrotoma LEICA RM 2235 na tkivne isečke debljine 3-5 μm . Dobijeni preparati su bojeni hematoksilin-eozin (HE) metodom. Na preparatima bojenim hematoksilin-

eozirom postavljena je preliminarna patohistološka dijagnoza mastocitoma, a za njenu potvrdu, preparati su dalje bojeni TB metodom.

Histopatološke osobine tumora, kao što su prisustvo mitoz, multijedarnih ćelija, bizarnih jedara i kariomegalije analizirani su na preparatima bojenim hematoksilin-eozinom. Broj navedenih parametara određivan je na deset vidnih polja svakog tumora, pri uveličanju 400 puta primenom metode opisane od strane Romansik i sar. (2007). Na osnovu navedenih parametara, tumori su razvrstani u dva stepena diferentovanosti – tumore visokog stepena maligniteta i na tumore niskog stepena maligniteta.

Imunohistohemijsko bojenje

U formalinu fiksirani i u parafinu ukalupljeni tkivni uzorci sečeni su na 5 mm tanke isečke koji su zatim bojeni primenom višestepene indirektno imunohistohemijske (IHC) tehnika. Iseći su inkubirani sa primarnim antitelom CD117 (polyclonal rabbit anti-human antibody (DAKO, A4502))

razblaženim fosfatnim puferom (PBS) u odnosu 1:400. Imunorekcija je vizualizovana upotrebom DAB + (3,3'-diaminobenzidinom tetrahidrohlorid, DAKO, K3468). Za kontrastiranje korišćen je Majerov hematoksilin. Korišćene su odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole.

Morfometrijska analiza

Za morfometrijska ispitivanja korišćen je morfometrijski softver Olympus Cell B, uz upotrebu kamere Olympus Color View III. Lokalizacija KIT proteina je određena na način opisan u istraživanju Webster i sar. (2007), s obzirom na to da se razlikuju membranski KIT proteini i dve vrste citoplazmatskih KIT proteina - fokalno i difuzno raspoređeni u citoplazmi. Koji od KIT proteina preovlađuje, određivano je na osnovu prisustva kod najmanje 10% neoplastičnih ćelija tumora. Ćelije na ivici tumora nisu uzimane u razmatranje.

Statistička analiza

U statističkoj analizi dobijenih rezultata, kao osnovne statističke metode, korišćeni su deskriptivni parametri, kao što su aritmetička sredina i standardna devijacija. Prilikom testiranja i utvrđivanja statistički značajnih razlika korišćen je χ^2 test. Pomoću ovih testova utvrđivano je postojanje statistički signifikantne razlike između ispitivanih parametara na nivou značajnosti od 5% i 1%.

Rezultati

Histološkom analizom isečaka mastocitoma bojenih hematoksilin-eozinom kod 53,85% mastocitoma uočeno je više od šest mitotskih figura na 10 hpf (slika 1a), dok se 46,15% mastocitoma odlikovalo slabijom mitotskom aktivnošću.

Prisustvo više od dve multinuklearne ćelije na 10 hpf bilo je uočeno kod 59,61% mastocitoma (slika 1b). Kod 17,31% mastocitoma su bile su prisutne po dve multinuklearne ćelije, dok je kod 19,23% mastocitoma bila uočena po jedna multinuklearna ćelija na istom broju vidnih polja. Multinuklearne ćelije nisu bile uočene kod 3,85% mastocitoma.

Više od dve ćelije sa bizarnim jedrom na 10 hpf bile su prisutne kod 55,77% mastocitoma (slika 1c). Dve ćelije sa bizarnim jedrom na istom broju vidnih polja bile su uočene kod 7,69% mastocitoma, dok je po jedna ćelija sa bizarnim jedrom bila prisutna kod 26,92% mastocitoma. Kod 9,61% mastocitoma nisu bile uočene ćelije sa bizarnim jedrima.

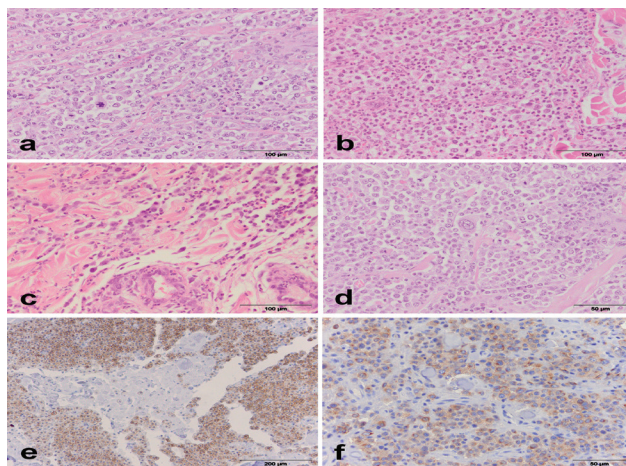
Više od 10% anaplastičnih mastocitoma sa jedrima promera oko 8-10 mikrometara bilo je uočeno kod 19,23% mastocitoma, dok je 42,30% mastocitoma sadržalo manje od 10% ćelija sa povećanim jedrom (slika 1d). Kod 38,46% mastocitoma nije bila prisutna kariomegalija

Na osnovu kriterijuma Kiupelove klasifikacije mastocitoma i ustanovljenih parametara (mitotski indeks, multijedarne ćelije, bizarna jedra i

kariomegalija) kod dijagnostikovanih mastocitoma, uočilo se da je 36 (69,23%) mastocitoma odgovaralo mastocitomima višeg stepena maligniteta, dok je 16 (30,77%) mastocitoma bilo nižeg stepena maligniteta.

Imunohistohemijskim bojenjem potvrđeno je prisustvo KIT receptora u isečcima tkiva kože pasa sa mastocitomom. Mikroskopskim pregledom preparata uočavaju se tri tipa imunohistohemijskog bojenja mastocita pozitivnih na KIT protein. Većina mastocitoma u ovom ispitivanju imala je tip I ekspresije KIT receptora, odnosno membransku ek-

spresiju (63,46%) (Slika 1e). Ovoj grupi su pripadali svi mastocitomi niskog stepena maligniteta i 17 od 36 mastocitoma visokog stepena maligniteta. Tip II ekspresije bio je prisutan kod 21,15% mastocitoma (Slika 1f) od kojih su svi bili visokog stepena maligniteta. Nijedan od pregledanih mastocitoma nije imao samo tip III ekspresije, ali su se uočavali kombinovani tipovi ekspresije, i to: 11,54% mastocitoma je ispoljavalo membranski i fokalni citoplazmatski tip ekspresije, dok je 3,85% mastocitoma imalo membranski i difuzni citoplazmatski tip ekspresije KIT proteina.



Slika 1. Koža, pas: a) Prisustvo mitotskih figura kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, HE; b) Prisustvo multijedarnih ćelija kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, HE; c) Prisustvo ćelija sa bizarnim jedrom kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, HE; d) Prisustvo kariomegalije kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, HE; e) Ekspresija KIT receptora, tip I (membranski) ekspresije, CD117, LSAB2; f) Ekspresija KIT receptora, tip II (difuzni citoplazmatski) ekspresije, CD117, LSAB2;

DISKUSIJA

Mastocitomi predstavljaju najučestalije tumore kože pasa, naročito kada se radi o pojedinim rasama kao što su bokser, zlatni retriever, labrador retriever i drugi (Welle i sar., 2008). Na osnovu rezultata dobijenih u našem istraživanju najveća učestalost mastocitoma uočena je kod pasa rase zlatni retriever (37,5%), a zatim kod pasa rase bokser (20,7%). Slično ovim rezultatima, većina autora navodi da su mastocitome najčešće dijagnostikovali kod pasa rase bokser (London i sar., 2003; Webster i sar., 2006a; Gil da Costa i sar., 2007; Welle i sar., 2008, Vučićević i sar., 2018). Drugi smatraju da iako bokseri imaju povećan rizik od nastanka mastocitoma, kod njih se uglavnom javljaju mastocitomi niskog stepena maligniteta koji imaju povoljniju prognozu (Thamm i sar., 2007).

Histološka građa se čini najdoslednijim prediktivnim parametrom i u bliskoj je vezi sa dvostepenim sistemom klasifikacije mastocitoma koji je predložio Kiupel (Kiupel i sar., 2011) prema kome se mastocitomi dele na mastocitome visokog i niskog stepena maligniteta. Prema kriterijumima dvostepene klasifikacije, mastocitomi pregledani u okviru našeg istraživanja klasifikovani su u mastocitome visokog i mastocitome niskog stepena maligniteta. Od ukupno 52 mastocitoma pasa, trideset šest pripada mastocitomima visokog stepena maligniteta, dok šesnaest mastocitoma ima morfološke karakteristike koje ukazuju na nizak stepen maligniteta. Više

od šest mitotskih figura na 10 hpf uočeno je kod 77,78% mastocitoma visokog stepena maligniteta, te se prisustvo mitotskih figura smatra statistički značajnim parametrom za klasifikaciju mastocitoma u ovom ispitivanju. Dok pojedini autori smatraju da i mastocitomi nižeg stepena maligniteta, mogu da metastaziraju, te da određivanje samo mitotskog indeksa nije pouzdan način predviđanja ponašanja tumora (Séguin i sar., 2006; Webster i sar., 2007), drugi autori smatraju da je mitotska aktivnost ključna osobina za prognozu ponašanja mastocitoma (Romansik i sar., 2007; Kiupel i sar., 2011). Pojedini autori smatraju da se smrtnost povećava već u slučajevima kada je mitotski indeks veći od 5/10 hpf (O'Connell i Thomson, 2011).

Prisustvo više od dve multinuklearne ćelije na 10 hpf uočeno je kod 86,11% mastocitoma visokog stepena maligniteta, što ukazuje da je ovo statistički značajan pokazatelj klasifikacije mastocitoma. Neka ispitivanja ukazuju da postoji značajna povezanost između broja multinuklearnih ćelija u mastocitomu i vremena preživljavanja pasa, tako da se vreme preživljavanja pasa smanjivalo sa povećanjem broja multinuklearnih ćelija (Thompson, 2012).

U našem ispitivanju uočeno je prisustvo više od dve ćelije sa bizarnim jedrom na 10 hpf kod 86,11% mastocitoma višeg stepena maligniteta, dok kod mastocitoma niskog stepena maligniteta nije zabeleženo prisustvo multinuklearnih ćelija.

Takođe, je uočeno da 27,78% mastocitoma visokog stepena maligniteta sadrži više od 10% anaplastičnih mastocita sa jedrima promera oko 8-10 mikrona, što ukazuje na to da se kariomegalija ne može razmatrati kao značajan prediktivni faktor u ovoj studiji.

Postoji značajna korelacija između mastocitoma visokog stepena maligniteta i bržeg javljanja metastaza, kao i kraćeg vremena preživljavanja pacijenata (Kiupel i sar., 2011; Stern, 2012). Stoga, za mastocitome visokog stepena maligniteta treba primeniti dodatna ispitivanja, kao što su određivanje ekspresije KIT receptora i skrining na c-KIT mutacije, kako bi se odredila adekvatna terapija.

Novija istraživanja ukazuju na postojanje, kako normalnih (membranskih), tako i aberantnih citoplazmatskih (fokalnih i difuznih) KIT receptora na mastocitima pasa (Morini i sar., 2004; Gil da Costa i sar., 2007). Za razliku od ranijih istraživanja (Reguera i sar., 2000) koja proučavaju odnos između intenziteta imunohistohemijskog bojenja koji ukazuje na stepen ekspresije KIT proteina i stepena maligniteta tumora, naša studija istražuje povezanost ekspresije aberantnih tipova KIT proteina i histopatološkog stepena mastocitoma. U ispitivanju koje smo sproveli, uočava se da kod svih mastocitoma niskog stepena maligniteta postoji isključivo membranski tip ekspresije KIT receptora, dok se kod mastocitoma visokog stepena maligniteta pored membranskog tipa ekspresije, javljaju i aberantni tipovi ekspresije KIT proteina. Iz naših rezultata se uočava da

kod mastocitoma niskog stepena maligniteta nema aberantne ekspresije KIT receptora. Naime, nijedan od aberantnih tipova ekspresije se ne izdvaja kao statistički značajan u odnosu na ostale aberantne tipove ekspresije KIT proteina. Međutim, jasna je povezanost aberantnih tipova ekspresije CD117 receptora i stepena maligniteta tumora. Pojedini autori navode da je KIT receptor transmembranski protein, i kao takav, imunoreaktivnost ovog proteina je lokalizovana na citoplazmatskoj membrani nepromenjenih mastocita. Rezultati ispitivanja potvrđuju da što mastocitomi pasa imaju agresivnije biološko ponašanje, to imaju i veću ekspresiju KIT proteina u citoplazmi mastocita (Kiupel i sar., 2004). Takođe, isti autori smatraju da mastocitomi pasa sa povećanom ekspresijom KIT proteina u citoplazmi neoplastičnih mastocita, imaju povećan rizik od lokalnog recidiva i kraće vreme preživljavanja. Neki autori naglašavaju da postoji jaka korelacija između citoplazmatske (aberantne) imunoekspresije KIT proteina i povećane ćelijske proliferacije, a samim tim i višeg stepena maligniteta, ali da nisu uočili značajne razlike između fokalne i difuzne citoplazmatske ekspresije CD117 receptora, što sugerise da fokalna i difuzna citoplazmatska ekspresija KIT proteina možda odražavaju slične ćelijske promene. Poznato je da se citoplazmatska ekspresija KIT receptora dovodi u vezu i sa nekrotičnim i ulceroznim promenama. Naime, citoplazmatska ekspresija KIT receptora je u vezi sa povećanom proliferacijom mastocita, a pojava nekroza u mastocitomu može biti

odraz povećane ćelijske proliferacije koju nije u mogućnosti da isprati odgovarajuća angiogeneza. S druge strane, korelacija između citoplazmatska ekspresije KIT receptora i pojave epidermalnih ulcera-

cija može biti posledica KIT – posredovanog oslobađanja histamina i serotonina, što uzrokuje intenzivan svrab (Gil da Costa i sar., 2007).

ZAKLJUČAK

U novije vreme kao najbitniji prediktivni faktori smatraju se prisustvo mutacija c-kit protoonkogeni i aberantna ekspresija KIT proteina. Međutim, pojedini radovi navode da se aberantna KIT ekspresija može uočiti i kod mastocitoma visokog stepena maligniteta kod ko-

jih nije detektovano prisustvo mutacija (Webster i sar., 2006, Vucicevic i sar., 2016). Stoga, bi određivanje ekspresije KIT proteina trebalo da bude deo rutinske dijagnostike i klasifikacije mastocitoma kod pasa.

LITERATURA

1. Bostock D.E., Crocker J., Harris K., Smith P (1989): Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *British Journal of Cancer* 59(6): 915–18.
2. El-Agamy D.S (2012): Targeting c-KIT in the therapy of mast cell disorders: current update. *European Journal of Pharmacology* 690(1-3): 1-3.
3. Gil da Costa R.M., Matos E., Rema A., Lopes C., Pires M.A., Gartner F (2007): CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Veterinary Research* 21(3): 19.
4. Gross T.L., Ihrke P., Walder E.J., Affolter V.K (2005): Mast cell tumors. *Skin Diseases of the Dog and Cat Clinical and Histopathologic Diagnosis*. 2nd edn. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd 853–65.
5. Halsey C.H.C., Thamm D.H., Weishaar K.M., Burton J.H., Charles J.B., Gustafson D.L., Avery A.C., Ehrhart E.J (2017): Expression of Phosphorylated KIT in Canine Mast Cell Tumor. *Veterinary Pathology* 54(3): 387-394.
6. Hendrick M.J., Mahaffey E.A., Moore F.M., Vos J.H., Walder E.J (1998): Mast cell tumors. In: *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, Histological Classification of Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues of Domestic Animals*. 2nd series, ed. Schulman FY, 28–29. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC.

7. Jovanović M., Aleksić-Kovačević S., Knežević M (2012): Specijalna veterinarska patologija, Makarije d.o.o., Beograd.
8. Jubb, Kennedy, Palmer (2007): Pathology of Domestic Animals, Saunders Elsevier, 5th edition, 771-73.
9. Kiupel M., Webster J.D., Kaneene J.B., Miller R., Yuzbasiyan-Gurkan V (2004): The use of kit and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors Vet Pathol 41(4): 371-77.
10. Kiupel M., Webster J.D., Bailey K.L., Best S., DeLay J., Detrisac C.J. i sar. (2011): Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. Veterinary Pathology 48(1): 147-55.
11. London C.A., Seguin B (2003): Mast cell tumors in the dog. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice 33(3): 473-89.
12. Misdorp W (2004): Mast cells and canine mast cell tumours: a review. Veterinary Quarterly 26(4): 156-69.
13. Morris J., Dobson J (2001): Small Animal Oncology. Blackwell Science 59-62.
14. O'Connell K., Thomson M (2011): Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. Veterinary and Comparative Oncology 11(1): 51-62.
15. Oliveira F.N., Elliott J.W., Lewis B.C., Mathews G.G., Brown R.M., Treadway C.M., Langohr I.M (2013): Cutaneous Mast Cell Tumor With Epitheliotropism in 3 Dogs. Veterinary Pathology 50(2): 234-37.
16. Patnaik A.K., Ehler W.J., MacEwen E.G (1984): Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. Veterinary Pathology 21(5): 469-74.
17. Reguera M.J., Rabanal R.M., Puigdemont A., Ferrer L (2000): Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. Am J Dermatopathol 22(1): 49-54.
18. Romansik E.M., Reilly C.M., Kass P.H., Moore P.F., London C.A (2007): Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. Vet Pathol 44(3): 335-41.
19. Sabattini S., Scarpa F., Berlato D., Bettini G (2014): Histologic grading of canine mast cell tumor: Is 2 better than 3?. Vet. Pathol 52(1): 70-3
20. Seguin B., Besancon M.F., McCallan J.L. I sar. (2006): Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002). J Vet Intern Med 20: 933-940.

21. Stern W.A (2012): Histologic Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Is There a Good System?. *J Vet Sci Med Diagn* 1: 1.
22. Strefezzi R.F., Kleeb S.R., Xavier J.G., Catao-Dias J.L (2009): Prognostic indicators for mast cell tumors. *Bray J Vet Pathol* 2: 110-21.
23. Takeuchi Y., Fujino Y., Watanabe M., Nakagawa T., Ohno K., Sasaki N., Sugano S., Tsujimoto H (2010): Aberrant autophosphorylation of c-KIT receptor in canine mast cell tumor cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol* 137(3-4): 208-16.
24. Thamm D.H., Vail D.M: Mast cell tumors, In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors (2007): *Small Animal Clinical Oncology*, Saunders, Philadelphia.
25. Thompson J.J (2012): *Canine Mast Cell Tumours: Characterization of Subcutaneous Tumours and Receptor Tyrosine Kinase Profiling*. PhD Thesis, Guelph, Ontario, Canada.
26. Vučićević, I., Marinković, D., Kukolj, V., Nešić, S., Aničić, M., Aleksić-Kovačević, S (2016): Kit receptor expression in canine cutaneous mast cell tumours (CMCTS) without c-kit mutation. *Acta Veterinaria-Beograd* 66 (2): 222-233
27. Vučićević I., Marinković D., Kukolj V., Nesić S., Aničić M., Aleksić-Kovačević S (2018): Mast cell tumor within a lipoma in a white toy poodle. *Veterinarski Glasnik*, 72 (1): 64-67.
28. Webster J.D., Kiupel M., Kaneene J.B., Miller R., Yuzbasiyan-Gurkan V (2004): The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 41(4): 371-7.
29. Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Kaneene J.B., Miller R., Resau J.H., Kiupel M., (2006): The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 8(2): 104-11.
30. Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Miller R.A., Kaneene J.B., Kiupel M (2007): Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary Pathology* 44(3): 298-308.
31. Welle M.M., Rohrer C.B., Howard J., Rüfenacht S (2008): Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology* 19(6): 321-39.

Rad primljen: 30.04.2018.

Rad prihvaćen: 11.10.2018.