

Microscopische en immunohistochemische karakterisatie van canine mastceltumoren

Sofie Baeten

promotor :
Prof. dr. Ivo LAMBRICHTS

co-promotor :
dr. T. HENDRICKX

Inhoudsopgave

Lijst met afkortingen	
Voorwoord	
Samenvatting	
1 Inleiding	1
1.1 Etiologie en pathogenese	2
1.2 Mastcellen	3
1.2.1 Ontwikkeling	3
1.2.2 Granula en mediators	3
1.2.3 Functie	4
1.2.4 Morfologie	5
1.3 Tumor morfologie	6
1.4 Diagnose	6
1.5 Gradering en stadiëring	7
1.6 Prognose	8
1.6.1 Ki67/PCNA/AgNOR proliferatiemarkers	9
1.6.2 MCM proliferatiemarkers	10
1.6.3 C-Kit	11
1.7 Behandeling	12
1.8 Doelstellingen	13
2 Materialen en methoden	14
2.1 Dieren	14
2.2 Lichtmicroscopie	14
2.2.1 Histochemische kleuringen	15
2.2.2 Immunokleuringen	16
2.3 Elektronenmicroscopie	17
2.4 Kwantificering en statistiek	18
2.4.1 Kwantificering van cellulaire componenten en bindweefsel in MCTen	18
2.4.2 Kwantificering van ultrastructureel waarneembare morfometrische parameters....	18
2.4.3 Kwantificering van de Ki67 en MCM7 expressie	19
2.4.4 Statistiek	19
3 Resultaten	20
3.1 Karakterisatie van de MCT stalen	20

3.2 LM analyse van MCTen.....	24
3.2.1 Morfologie van mastcellen binnen MCTen	25
3.2.2 Eosinofielen in MCTen	26
3.2.3 Cellulariteit binnen MCTen: mastcellen versus eosinofielen	27
3.2.4 Collageeninhoud en fibroblasten in MCTen	28
3.2.5 Metachromasie van neoplastische mastcellen.....	30
3.3 Ultrastructuur van MCTen	31
3.3.1 Types mastcellen in graad I MCTen	32
3.3.2 Types mastcellen in graad I/II MCTen na LM analyse.....	34
3.3.3 Morfologie van graad III mastcellen.....	35
3.3.4 Morfometrie van mastcellen: graad I versus graad III	36
3.3.5 Granula morfologie in graad I en III MCTen.....	38
3.3.6 Bijzondere waarnemingen in neoplastische mastcellen	40
3.4 Proliferatie binnen MCTen: Ki67 versus MCM7	42
3.5 c-KIT expressie in neoplastische mastcellen	47
4 Discussie.....	48
Referenties.....	60

Lijst met afkortingen (alfabetisch)

- **n°** nummer
- **#** aantal
- **AgNORs** ‘agyrophylic nucleolar organizer regions’
- **AJC systeem** ‘American Joint Committee’ systeem
- **C3a** complement 3a
- **C5a** complement 5a
- **C3aR** complement 3a receptor
- **C5aR** complement 5a receptor
- **Cdc6/18** ‘cell division cycle 6/18’
- **CDK** ‘cyclin-dependent kinases’
- **Cdt1** ‘Cdc10-dependent transcript 1’
- **CLCs** ‘Charcot-Leyden crystals’
- **DAB** diaminobenzidine
- **dsRNA** ‘double-stranded RNA’
- **ECF** eosinofiel chemotaxis factor
- **EM** elektronenmicroscopie/elektronenmicroscopisch
- **FNA** ‘fine needle aspiration’
- **GM-CSF** ‘granulocyte-macrophage colony-stimulating factor’
- **IgE** immunoglobuline E
- **IgG** immunoglobuline G
- **IGF** insuline groeifactor
- **IHC** immunohistochemie/immunohistochemisch
- **IL-3** interleukine 3
- **IL-4** interleukine 4
- **IL-5** interleukine 5
- **LM** lichtmicroscopie/lichtmicroscopisch
- **LPR** ‘late phase reaction’
- **LTC₄** leukotriene C₄
- **LTD₄** leukotriene D₄
- **LTE₄** leukotriene E₄
- **MCM eiwitten** ‘minichromosome maintenance’ eiwitten

- **MCTen** mastceltumoren
- **MI** mitose index
- **MVD** ‘microvessel density’
- **NGF** ‘neural growth factor’
- **ORC** ‘origin recognition complex’
- **PCNA** ‘proliferate cell nuclear antigen’
- **PGD₂** prostaglandine D₂
- **Post-RC** post-replicatieve complex
- **Pre-RC** pre-replicatieve complex
- **SCF** stamcel factor
- **TEM** transmissie elektronenmicroscop
- **T_H2** T-helper 2
- **TLR3** toll-like receptor 3
- **TNF- α** tumor necrosis facor alfa
- **TNM systeem** ‘tumor-node-metastasis’ systeem

Voorwoord

Wat zijn die vier jaren voorbij gevlogen! Opeens was het zover . . . de afstudeerstage. Vol goede moed ben ik eraan begonnen. Er waren momenten van euforie maar ook van teleurstelling, zeker als die ene kleuring weer niet wilde werken. Over het algemeen kan ik zeker en vast terugkijken op een zeer aangename en leerrijke periode op de afdeling van morfologie. Maar zonder de hulp van een aantal mensen was ik er nooit in geslaagd om dit tot een goed einde te brengen. Daarom wil ik deze mensen graag één voor één overlopen om een woordje van dank uit te spreken.

Om te beginnen wil ik mijn promotor en copromotor graag bedanken. Professor Ivo Lambrichts en dierenarts Tom Hendrickx, bedankt om mij op ieder moment met jullie raad en daad te hebben bijgestaan, alsook voor de vele uren werk die jullie in dit werk gestoken hebben. Ook wil ik jullie bedanken dat jullie mij de kans hebben gegeven om mijn thesis rond dit onderwerp te kunnen maken. Tom, bedankt voor de klinische uitleg, je enthousiasme in mijn werk en voor de kennismaking met het echte leven in een dierenkliniek.

Vervolgens wil ik de lieve mensen van het histologielab graag enorm bedanken voor het geduld, de zeer vele uren werk en de ongelooflijk toffe sfeer. Mark, Marie-Josée en Jeanine, bedankt voor de praktische hulp en de begeleiding! Jullie hebben ervoor gezorgd dat ik iedere dag met veel plezier aan dit project heb gewerkt. De koffiepauzes met taart en koekjes, de kaartpartijen en de leuke gesprekken hebben hier zeker ook aan bijgedragen! Ook Olga, bedankt voor de vele uren tijd die je met mij hebt doorgebracht achter de microscoop en de computer.

Dan zijn mijn collega-studenten aan de beurt: Gitte, Esther, Anouk en Ann. Zowel in goede als in slechte tijden kon ik op jullie rekenen. Samen plezier maken, samen frustraties ondergaan (hé Gitte); jullie hebben ervoor gezorgd dat ik nooit het gevoel heb gehad dat ik er alleen voor stond. De zonnige middagjes aan de garagepoort, de ijsjes, de picknick, ...dit zal ik echt nooit vergeten. Jullie zijn er altijd voor mij geweest en daarom wil ik jullie héél erg bedanken.

Last but not least een woordje van dank aan mijn familie en vrienden. Mama en papa, toen jullie mij vertelden dat het wel goed zou komen, geloofde ik dat niet altijd. Toch bleven jullie in mij geloven en mij steunen, bedankt! Lieve vrienden, jullie mag ik natuurlijk niet overslaan. Bedankt voor de nodige momenten van ontspanning, waardoor ik voldoende energie kreeg om mij achter dit werk te zetten.

Samenvatting

Inleiding: Mastceltumoren (MCTen) behoren tot de meest voorkomende neoplasma's bij de hond en vertonen een zeer divers biologisch gedrag, wat het maken van een correcte prognose vaak bemoeilijkt. In de praktijk is de prognose gebaseerd op een histopathologisch graderingssysteem (Patnaik). Dit heeft echter een aantal beperkingen. Om deze reden werd de laatste jaren veel onderzoek verricht naar meer objectieve methoden voor het voorspellen van het biologische gedrag van MCTen. In deze studie werden canine MCTen microscopisch en immunohistochemisch (IHC) gekarakteriseerd, waarna de bevindingen gekoppeld werden aan de tumorgraad met als doel het aangeven van (nieuwe) potentiële prognostische indicatoren.

Materialen en methoden: Stalen van MCTen werden behandeld voor lichtmicroscopische (LM), elektronenmicroscopische (EM) en IHC analyse. Wat betreft LM, werden de stalen gekleurd met trichroom van Masson en met toluidine blauw. IHC werd uitgevoerd met primaire antilichamen tegen Ki67, MCM7 en c-KIT.

Resultaten: De resultaten tonen aan dat het aantal mastcellen en hun morfologie gerelateerd zijn aan de tumorgraad. Daarnaast is de hoeveelheid collageen en het aantal fibroblasten eveneens tumorgraad-afhankelijk. Ultrastructureel kunnen er in graad I MCTen twee types mastcellen onderscheiden worden, die morfologisch sterk van elkaar verschillen. Ook lichtmicroscopisch zijn er in graad I en II MCTen twee types mastcellen waarneembaar. Graad III mastcellen vertonen over het algemeen een lage differentiegraad en verschillen morfometrisch sterk van graad I mastcellen. EM analyse toont de aanwezigheid van drie types granula aan, die voorkomen in graad I en III MCTen. Graad III MCTen worden daarnaast gekenmerkt door de aanwezigheid van bijzondere granula in hun cytoplasma. Verder worden de neoplastische mastcellen ultrastructureel gekenmerkt door cytoplasmatische uitstulpingen, alsook door microfilamenten in hun cytoplasma. Dit is voornamelijk uitgesproken in goed gedifferentieerde MCTen. IHC analyse toont tumorgraad-gerelateerde stijgende trends aan wat betreft de Ki67 en MCM7 expressie in het tumorweefsel. In graad II en III MCTen is de expressie van MCM7 significant hoger dan deze van Ki67. IHC voor c-KIT toont een cytoplasmatisch expressiepatroon aan in alle tumorgraden.

Conclusie: Deze bevindingen tonen aan dat een aantal LM en EM kenmerken mogelijk prognostische indicatoren zijn voor canine MCTen. Verder indiceren de IHC resultaten dat MCM7 een hogere sensitiviteit heeft als proliferatiemarker vergeleken met Ki67. Om de prognostische waarde te verhogen, moeten de parameters geanalyseerd worden in een groter aantal stalen waarvoor klinisch relevante informatie beschikbaar is.

1 Inleiding

Mastceltumoren (MCTen) of mastocytoma's zijn de meest frequent voorkomende neoplasma's bij de hond met een beschreven incidentie van 129 nieuwe gevallen per 100 000 honden [1] (**Figuur 1**). MCTen maken 7 tot 21% uit van alle cutane tumoren en 11 tot 27% van alle kwaadaardige cutane tumoren in de hond [2]. In andere zoogdieren, waaronder de mens, is deze aandoening veel minder frequent aanwezig [3]. De tumoren komen meestal voor ter hoogte van de huid, maar kunnen ook ontwikkelen in en metastaseren naar andere, vaak viscerale, organen [4]. Hoewel MCTen in de meeste honden solitair zijn, vertoont 6% van de honden multipale tumoren. MCTen komen gewoonlijk voor in oudere honden met een gemiddelde leeftijd van 9 jaar, hoewel er ook al tumoren geïdentificeerd zijn in dieren van enkele maanden oud [5]. Een belangrijk kenmerk van deze tumoren is dat ze een zeer variabel biologisch gedrag vertonen, wat het maken van een correcte prognose en bijgevolg het kiezen van de juiste therapeutische interventie vaak bemoeilijkt [6]. In de kliniek is de prognose van MCTen gebaseerd op histopathologie, waarbij de tumoren ingedeeld worden in drie verschillende graden op basis van de differentiatiestatus van de cellen. Het gebruik van dit graderingssysteem als een prognostische indicator wordt echter meer en meer als controversieel beschouwd. Verscheidene studies zijn reeds uitgevoerd waarbij getracht werd om meer objectieve methoden te vinden voor het voorspellen van het biologische gedrag van deze tumoren [7]. Immunohistochemie (IHC) van c-KIT en detectie van de proliferatiemarkers Ki67/PCNA/AgNOR zijn de belangrijkste [6,8]. 'Minichromosome Maintenance' (MCM) markers zijn een nieuwe set van proliferatiemarkers die mogelijk een belangrijke rol kunnen spelen in de typering van MCTen in de hond [9].



Figuur 1: Afbeeldingen van MCTen. Foto's van MCTen ter hoogte van de achterpoot (a), de thorax (b) en de neus (c). Deze afbeeldingen werden verkregen in samenwerking met de dierenartsenpraktijk St. Katharina te Hasselt.

1.1 Etiologie en pathogenese

De exacte etiologie van MCTen is niet gekend. Verschillende studies wijzen op een mogelijke betrokkenheid van virussen in het ontstaan van deze neoplasma's. Transmissie van tumorweefsel of tumorextracten van honden met MCTen naar vatbare proefhonden resulteerde in de ontwikkeling van mastocytoma's in deze proefhonden. Verder werden in het cytoplasma van neoplastische mastcellen inclusies aangetoond die sterke gelijkenissen vertoonden met virale partikels. Desondanks is men er nog niet in geslaagd om virussen te isoleren uit cutane mastocytoma laesies en is er eveneens nog geen bewijs voor een directe horizontale transmissie van MCTen [10].

Sommige studies verwijzen naar een genetische etiologie in het ontstaan van MCTen. Bepaalde rassen hebben een predispositie voor de ontwikkeling van deze neoplasma's. Zo hebben rassen die afkomstig zijn van de Bulldog (o.a. de Boston Terriër en de Boxer) een groter risico op tumorontwikkeling vergeleken met andere rassen [10].

Verder hebben studies aangetoond dat het proto-oncogen *c-kit* waarschijnlijk een kritieke rol speelt in de ontwikkeling van MCTen. *C-kit* codeert voor de transmembranaire c-KIT receptor. Dit is een tyrosine kinase receptor die tot expressie komt in vele weefsels waaronder glioblastoma cellen, placenta, hersenen, erytroïde precursors, melanocyten, basofielen en mastcellen. Deze c-KIT receptor bestaat uit een extracellulair domein van vijf immunoglobuline-achtige domeinen en een intracellulair tyrosine kinase domein met daaraan grenzend een juxtamembranair domein. Het ligand van deze c-KIT receptor is stamcel factor (SCF), ook wel mastcel groeifactor genoemd. Binding van SCF aan de c-KIT receptor induceert een signaaltransductie cascade, die verantwoordelijk is voor de ontwikkeling, maturatie, proliferatie en survival van vele cellijnen waaronder hematopoietische stamcellen, melanocyten en mastcellen [11]. Verschillende studies hebben *c-kit* mutaties geïdentificeerd in verscheidene canine cutane MCTen. Deze mutaties waren uitsluitend aanwezig in de DNA regio die codeert voor het juxtamembranaire domein, voornamelijk in exonen 11 en 12 [12]. Ma et al (1999) ontdekten puntmutaties en kleine deleties in drie van de zeven MCTen en een duplicatie in twee van de drie cellijnen [13]. London et al (1999) vonden duplicaties in vijf van de elf tumoren [14]. Beide studies tonen *c-kit* mutaties aan in ongeveer vijftig percent van de bestudeerde dieren. Het gevolg van *c-kit* mutaties is een c-KIT receptor die continu actief is, zelfs in afwezigheid van SCF. De uitkomst van deze mutatiegeïnduceerde continue activatie van c-KIT is de proliferatie en survival van mastcellen en bijgevolg de potentiële ontwikkeling van MCTen [12].

1.2 Mastcellen

Mastcellen zijn cellen van het aangeboren immuunsysteem, die zich voornamelijk bevinden in de bindweefsels die in contact staan met de buitenwereld. Ze zijn in grote concentraties aanwezig ter hoogte van de longen, de mucosa van de darm en de epitheliale oppervlakten van de huid, alsook in de nabijheid van bloedvaten. Het zijn voornamelijk studies in mensen en knaagdieren die hebben bijgedragen tot de huidige kennis van dit celtype en dit heeft geleid tot een beter begrip van klinische mastcelafwijkingen in huisdieren [15].

1.2.1 Ontwikkeling

Mastcellen zijn afkomstig van CD34⁺ hematopoietische precursors, zoals deze die aanwezig zijn in het adulte beenmerg [16]. Hun precursors circuleren in het bloed en ‘homen’ naar weefsels waar ze matureren onder invloed van SCF, dat geproduceerd wordt door stromacellen zoals fibroblasten en endotheelcellen [17]. Mastcellen hebben een lange levensduur en kunnen, ondanks hun maturiteit, in het weefsel prolifereren onder bepaalde omstandigheden [18].

1.2.2 Granula en mediators

Een belangrijk kenmerk van mature mastcellen is de aanwezigheid van granula (700 à 1000) in het cytoplasma. De secretoire granula bevatten mediators die onderverdeeld kunnen worden in voorgevormde mediators, nieuw gesynthetiseerde lipidenmediators en cytokines [17].

1.2.2.1 Voorgevormde mediators

De voorgevormde mediators worden verpakt in granula en enkele minuten na activatie van de mastcel vrijgezet. De belangrijkste zijn heparine, histamine, serine proteases en eosinofiel chemotaxis factor (ECF). Heparine heeft een anti-coagulatieve werking. De vrijzetting van heparine door mastcellen is een beschermingsmechanisme, dat de klontering en stasis van bloed en lymfe op plaatsen van inflammatie voorkomt [19]. Histamine wordt vrijgezet in het gebied waar schade is opgetreden of in het orgaan waar de allergische reactie plaatsgrijpt. Dit resulteert in bronchoconstrictie, vasodilatatie, een verhoogde vasculaire permeabiliteit en mucussecretie, alsook in de aantrekking van andere witte bloedcellen naar de plaats van de vrijzetting [20]. Het grootste aandeel van de eiwitten in de granula bestaat uit neutrale proteases: tryptase, chymase en carboxypeptidase. Deze enzymen verhogen de mucussecretie en de contractie van gladde spiercellen in de bronchi en klieven componenten van de

complement en kinine pathways, wat resulteert in inflammatie [20,21]. Daarnaast bevatten de secretoire granula ook collagenase, een enzym dat verantwoordelijk is voor de afbraak van collageen [10]. Eosinofielen worden via ECF aangetrokken naar de plaats van overvloedige histaminevrijzetting, met als doel het inactiveren van histamine en dus het temperen van de anafylactische reactie [19].

1.2.2.2 Nieuw gevormde lipidenmediatoren

De lipidenmediatoren omvatten het belangrijkste cyclo-oxygenase product prostaglandine D₂ (PGD₂), alsook lipoxygenase producten zoals leukotriene C₄ (LTC₄) en peptidolytische producten zoals leukotriene D₄ (LTD₄) en leukotriene E₄ (LTE₄). Al deze mediators zijn bronchoconstrictors. Verder stimuleren LTC₄, LTD₄ en LTE₄ de vasculaire permeabiliteit en is PGD₂ een chemoattractant voor neutrofielen [17].

1.2.2.3 Cytokines

TNF- α is een belangrijk cytokine dat onder meer door mastcellen geproduceerd wordt, met als functie de upregulatie van endotheliale en epitheliale adhesiemoleculen. Mastcellen produceren naast TNF- α ook andere cytokines: IL-4, dat geassocieerd is met T_H2 differentiatie en IgE synthese en IL-3, GM-CSF en IL-5, die belangrijk zijn voor de ontwikkeling en de overleving van eosinofielen [16].

1.2.3 Functie

Mastcellen spelen een centrale rol in verscheidene inflammatoire en immunologische reacties. Sheldon en Bauer (1960) omschreven de functie van de mastcel als het initiëren van een inflammatoire respons ter eerstelijns verdediging tegen schade [19]. De meest bekende rol van de mastcel is deze in de IgE-gemedieerde immuniteit. Mastcellen beschikken over zeer specifieke membraanreceptoren voor het Fc-gedeelte van IgE, de zogenaamde Fc ϵ RI receptoren. Blootstelling aan een allergeen resulteert in de productie van IgE antilichamen door plasmacellen, die vervolgens binden ter hoogte van de Fc ϵ RI receptoren. Een volgende blootstelling aan hetzelfde allergeen resulteert in crosslinking van het receptor-gebonden IgE, wat leidt tot een gewijzigde membraanpermeabiliteit voor calcium. Het gevolg is een snelle influx van calcium in de cel, waardoor het fysiologische metabolisme binnen de mastcel wijzigt en de mastcel geactiveerd wordt. Dit resulteert in degranulatie, het proces waarbij de inhoud van de granula (zie paragraaf 1.2.2) wordt vrijgezet [21]. Het resultaat is een type I hypersensitiviteitsreactie die gekenmerkt wordt door een variëteit aan fysiologische responsen

zoals een verhoogde vasculaire permeabiliteit en vasodilatatie (oedeem, shock), spasmen van gladde spiercellen (GI symptomen), anti-coagulatie, mucussecretie, weefseldestructie (ulceratie) en pruritus. Bovendien leidt degranulatie tot de ‘de novo synthese’ van lipidenmediatoren, alsook tot de vrijzetting van cytokines (o.a. chemokines) wat zorgt voor de infiltratie van leukocyten. Dit is de zogenaamde ‘late phase reaction’ (LPR) [22]. Mastcellen kunnen, naast de crosslinking van FcεRI-gebonden IgE, ook op andere manieren geactiveerd worden, onder andere door C3a en C5a via C3aR en C5aR (CD88), door neurale groeifactor (NGF) via TRKA, door IgG via FcγRI en door mechanische stimuli [23]. Verder kunnen sommige virale producten mastcellen activeren door te interageren met receptor-gebonden IgE. Ten slotte kunnen mastcellen een activatiesignaal krijgen via toll-like receptoren [24]. Naast hun rol in de IgE-gemedieerde immuniteit, kunnen mastcellen ook functioneren als fagocyterende cellen, antigen-presenterende cellen en costimulatoren (o.a. door de expressie van CD40 of CD40 ligand). Bovendien spelen ze een belangrijke rol in de afweer tegen parasitaire infecties en in de aangeboren immuniteit tegen bacteriële en virale infecties [16].

1.2.4 Morfologie

De mastcel is een grote ovale cel met een diameter van 12 – 15 µm die gekenmerkt wordt door de aanwezigheid van talrijke membraangebonden granula met een gemiddelde diameter van 1 µm. Deze cel vertoont een onregelmatig oppervlak dat gevormd wordt door talrijke uitstulpingen van het cytoplasma. De celkern is meestal rond of ovaal van vorm en centraal gelegen in het overvloedige cytoplasma. Normale mastcellen vertonen gewoonlijk geen prominente nucleoli [15]. Verder bevat het cytoplasma van de mastcel een matig ontwikkeld RER, een vrij uitgebreid Golgi complex, weinig mitochondria en vrije ribosomen, vesikels, glycogeen en microfilamenten [18,19].

De secretoire granula geven een diffuse paarsachtige kleur aan het cytoplasma in HE-paraffine coupes, tenzij metachromatische kleuringen (o.a. toluidine blauw) worden gebruikt voor het aantonen van de individuele granula. Metachromasie is de term die gebruikt wordt voor kleurreacties waarin het gekleurde materiaal een verschillende kleur aanneemt (rood-paars) dan deze van de gebruikte kleurstof (toluidine blauw). Deze metachromasie wordt veroorzaakt door gesulfateerde mucopolysacchariden, de fundamentele eenheden van heparine. Zowel normale als neoplastische mastcellen vertonen metachromatische granula in hun cytoplasma na toluidine blauw kleuring [16].

1.3 Tumor morfologie

De gemiddelde diameter van tumor mastcellen varieert van 10,5µm tot 11,11µm wat betreft solitaire MCTs [25,26]. In multipole MCTs bedraagt de gemiddelde diameter 8,8µm. De vorm van neoplastische mastcellen is enorm gevarieerd van rond, ovaal en polygonaal tot spoelvormig, staafvormig en onregelmatig. Deze mastcellen hebben gewoonlijk één nucleus, maar er werden ook al mastcellen geïdentificeerd met twee of meerdere nucleï. De nucleus bevat gewoonlijk één of twee nucleoli en weinig chromatine dat voornamelijk perifeer gelokaliseerd is. De vorm van de nucleus is ofwel regelmatig (rond of ovaal) ofwel onregelmatig met diepe instulpingen. Het cytoplasma bevat een groot aantal metachromatische granula met een diameter van 0,6-0,7 µm [26]. De granula zijn voorzien van een membraan en worden ultrastructureel gekenmerkt door een centrale granulaire matrix, omgeven door een perifere heldere zone [25]. Daarnaast bevat het cytoplasma ook talrijke mitochondria, perifeer gelegen vacuolen, een perinucleair gelokaliseerd Golgi complex en microfilamenten [25,26].

Naast mastcellen zijn er in MCTen ook andere cellen aanwezig, zoals eosinofielen, neutrofielen, plasmacellen en fibroblasten. De meeste mastcellen zijn gelokaliseerd rond bloedvaten en tussen de cellen bevinden zich meestal grote hoeveelheden collageen [25,26]. Lao et al toonden 'Charcot-Leyden Crystals' (CLCs) aan in het tumorstroma van humane mastocytoma patiënten. Dit zijn bipyramidale, hexagonale structuren, die waargenomen worden in vele huidaandoeningen die gepaard gaan met eosinofiele inflammatoire reacties [27]. Tot heden werden deze structuren nog niet gedetecteerd in canine MCTen.

1.4 Diagnose

MCTen, melanoma's, histiocytoma's, lymfosarcoma's en overdraagbare venerische tumoren behoren tot de rondceltumoren. Deze neoplasma's bestaan uit afzonderlijke cellen die eerder rond of ovaal dan fusiform zijn. In praktijkomstandigheden gebeurt de eerste diagnostiek van MCTen middels cytologisch onderzoek na 'fine needle aspiration' (FNA). Als voornaamste kleuringen van cytologische preparaten worden Diff Quik® en Hemacolor® gebruikt. Goed gedifferentieerde MCTen zijn het eenvoudigst aan te tonen bij cytologisch onderzoek, wegens de grotere resolutie van de cytoplasmatische granula. Bij toenemende anaplasie wordt cytologische bevestiging echter moeilijk en blijft histologie de gouden standaard. De aanwezigheid van eosinofielen kan een belangrijke rol spelen in de diagnose van MCTen. Eosinofielen accumuleren ter hoogte van de tumor door de vrijzetting van ECF door mastcellen en kunnen cytologisch gemakkelijk geïdentificeerd worden. Dit is echter geen

absoluut criterium voor diagnose, aangezien sommige tumoren niet geïnfiltriseerd zijn door eosinofielen. Gemiddeld echter maken eosinofielen acht percent uit van de totale celpopulatie binnen de tumor [10].

1.5 Gradering en stadiëring

Na het maken van de diagnose van MCT, wordt aan de tumor een histologische graad toegekend op basis van histopathologie. In dit geval wordt een biopsie van de tumor genomen waarvan vervolgens H/E coupes worden gemaakt en geanalyseerd. Gradering van tumoren is van belang om een schatting te maken van het niveau van maligniteit van de tumor. Tumoren kunnen onderverdeeld worden in drie histologische groepen, gebaseerd op het aantal cytoplasmatische granula, de mitose index (MI) en de cellulaire karakteristieken van maligniteit. Dit zijn een goed gedifferentieerde of mature groep, een intermediair gedifferentieerde groep en een slecht tot niet gedifferentieerde of anaplastische groep [22]. Er is heel wat verwarring betreffende de graderingsschema's die gebruikt worden om MCTen te beschrijven. Zo beschreef een veel geciteerde studie van Bostock et al (1973) slecht gedifferentieerde MCTen als graad I tumoren, intermediair gedifferentieerde tumoren als graad II tumoren en goed gedifferentieerde tumoren als graad III tumoren [28]. Een daaropvolgende studie van Patnaik et al (1984) gebruikte een meer universeel aanvaard classificatiesysteem, waarin graad I tumoren de goed gedifferentieerde en graad III tumoren de slecht gedifferentieerde tumoren zijn (**Tabel 1**) [29].

Stadiëring van een tumor is het bepalen van de graad van lokale en systemische uitgebreidheid ervan. Er zijn twee methoden van stadiëring. Een eerste is het 'Tumor Node Metastasis' (TNM) systeem, waarbij T de grootte van de primaire tumor omschrijft (T1, T2, T3 en T4), N de betrokkenheid van lymfeknopen (N0, N1, N2, N3 en N4) en M de aan- of afwezigheid van metastasen (M0 en M1). Een tweede is het 'American Joint Committee' (AJC) systeem, waarbij de tumor verdeeld wordt in vier klassen (I, II, III en IV) op basis van de grootte van de primaire laesie, de betrokkenheid van lymfeknopen en de aanwezigheid van eventuele metastasen. Dit systeem is minder gedetailleerd dan het TNM systeem [30].

Na het stellen van een diagnose moeten MCTen klinisch gestadieerd worden, wat meestal gebeurt op basis van de criteria van de Wereldgezondheidsorganisatie (**Tabel 2**). Deze criteria zijn gebaseerd op het AJC stadiëringssysteem. Methoden voor het bepalen van de uitgebreidheid van het tumorproces zijn aspiratiecytologie of biopsie van beenmerg en lymfeknopen, ultrasonografie en radiografie [10].

Tabel 1: Histopathologische graderingscriteria volgens het Patnaik systeem [29].

Graad	Histopathologische graderingscriteria
I	- Goed gedifferentieerde mastcellen geschikt in rijen of in kleine groepen - Ronde, monomorfe cellen met overvloedig, begrensd cytoplasma - Medium granula, ronde nucleï, gecondenseerd chromatine, geen cellen in mitose
II	- Redelijk pleomorfe cellen geschikt in groepen - Ronde tot ovale cellen met verspreide spilvormige en giant cellen - Begrensd cytoplasma met kleine granula, soms grote hyperchromatische granula - Nucleï zijn rond tot geïnvagineerd met verspreid chromatine; soms dubbele nucleï, zelden cellen in mitose
III	- Pleomorfe (rond, ovaal of spoelvormig), medium cellen geschikt in dicht opeengepakte lagen - Onbegrensd cytoplasma met fijne granula - Geïnvagineerde tot ronde nucleï met één of meerdere nucleoli; vaak dubbele nucleï, cellen in mitose en giant cellen

Tabel 2: Klinische stadiëring van MCTen op basis van het systeem van de Wereldgezondheidsorganisatie [10].

Stadium*	Beschrijving
I	Eén tumor beperkt tot de dermis, zonder betrokkenheid van regionale lymfeknopen
II	Eén tumor beperkt tot de dermis, met betrokkenheid van regionale lymfeknopen
III	Meerdere dermale tumoren of grote infiltrerende tumoren, met of zonder betrokkenheid van regionale lymfeknopen
IV	Elke tumor met metastasen of terugval met metastasen
*	Substadium a: geen systemische symptomen aanwezig Substadium b: systemische symptomen aanwezig

1.6 Prognose

Het biologische gedrag van MCTen is zeer variabel wat een correcte prognose vaak bemoeilijkt. Op dit moment is het maken van een prognose voornamelijk gebaseerd op het Patnaik histopathologisch graderingssysteem. Zo heeft een studie aangetoond dat honden met graad I MCTen een gemiddelde overlevingstijd hadden van 51 weken, terwijl honden met graad II en graad III tumoren gemiddelde overlevingstijden hadden van respectievelijk 28 weken en 18 weken. In deze studie werden honden uitsluitend behandeld middels operatieve ingrepen [28]. Over het algemeen geldt dat graad I tumoren relatief goedaardig zijn en graad III tumoren meestal een zeer kwaadaardig klinisch verloop vertonen. Het grootste probleem bevindt zich echter bij de intermediair gedifferentieerde of graad II MCTen. Zo hebben vele graad II MCTen een goedaardig klinisch verloop, hoewel een deel gekenmerkt wordt door

lokale terugkeer van de tumor (5-11 %) en metastasen (5-22 %) [31,32]. De meeste MCTen zijn van het intermediair type (43 % versus 37 % graad I en 20 % graad III), waardoor het maken van een prognose en bijgevolg het kiezen van de juiste therapeutische strategie vaak zeer moeilijk is [29]. Verder is er een zeer grote variatie tussen pathologen wat betreft het graderen van tumoren, wat een bijkomende moeilijkheid met zich meebrengt [33]. Het doel van vele studies is dan ook het zoeken naar meer objectieve methoden om een uitspraak te kunnen doen over het biologische gedrag van de tumoren. Dit heeft geleid tot de ontdekking van enkele potentiële prognostische indicatoren.

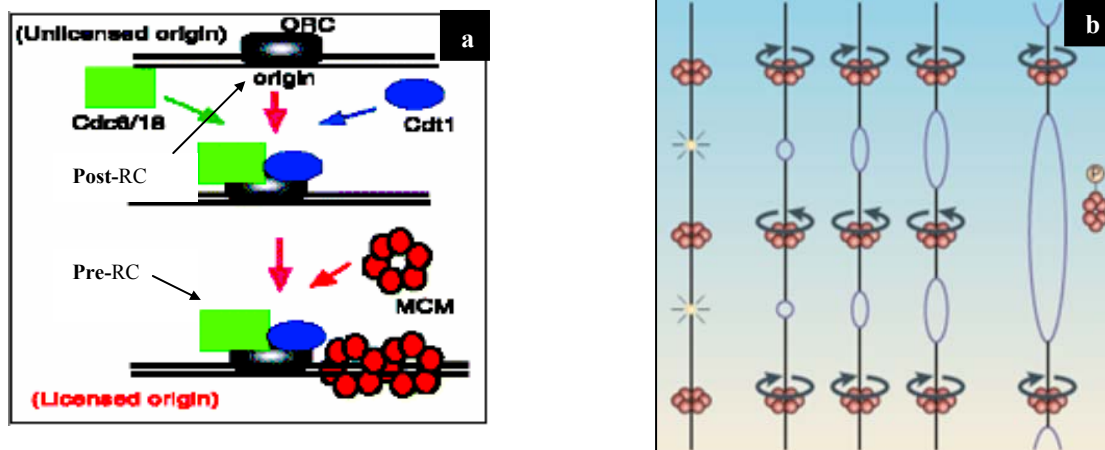
1.6.1 Ki67/PCNA/AgNOR proliferatiemarkers

De meeste studies betreffende de zoektocht naar objectieve prognostische indicatoren draaien rond markers voor cellulaire proliferatie, waarvan Ki67/PCNA/AgNOR de belangrijkste zijn. Deze proliferatiemarkers kunnen gebruikt worden om een schatting te maken van het aantal delende cellen. Dit blijkt nauwkeuriger te zijn dan enkel en alleen het tellen van mitotische figuren, aangezien deze markers niet enkel cellen in de M-fase, maar ook cellen in de S-fase identificeren. Daarnaast kunnen zeer kwaadaardige MCTen slechts een klein aantal mitotische figuren bevatten, waardoor het tellen van deze structuren vaak geen accurate maatstaf is voor het bepalen van het biologische gedrag van tumoren [7]. Verschillende studies hebben de prognostische waarde van deze markers in zowel mensen als dieren reeds aangetoond. Hierbij werden de beste resultaten verkregen met Ki67, een eiwit waarvan de precieze functie in de cel nog niet gekend is. De subcellulaire locatie en expressie van Ki67 worden nauw gereguleerd tijdens de celcyclus. Onderzoek heeft uitgewezen dat Ki67 noodzakelijk is voor de voortgang van de celcyclus, aangezien inhibitie van de Ki67 expressie met behulp van antisense nucleotiden resulteerde in een blokkade van de celproliferatie. Het monoklonale antilichaam MIB-1 wordt gebruikt voor de detectie van de Ki67 eiwitexpressie en werd reeds toegepast in zowel honden als mensen als een maat voor celproliferatie. Onderzoek in MCTen bij de hond heeft reeds aangetoond dat de Ki67 expressie significant geassocieerd is met de tumorprognose [6]. Ondanks het grootschalige gebruik van Ki67 als proliferatiemarker, is er bewijs dat dit grote nucleaire eiwit betrokken is in celcyclus-onafhankelijke cellulaire processen zoals de biosynthese van ribosomen. Daarnaast is het mogelijk dat nutritionele deprivatie kan leiden tot een verminderde Ki67 expressie in delende cellen [9].

1.6.2 MCM proliferatiemarkers

MCM eiwitten vertegenwoordigen een groep van tien geconserveerde factoren die een rol spelen in de replicatie van de genomen van archae en eukaryote organismen [34]. MCM proteïnen werden initieel geïsoleerd in een screen voor mutaties die resulteren in het verlies van minichromosomen in *S. Cerevisiae*, vandaar de benaming ‘Minichromosome Maintenance’ proteïnen [35]. In deze groep vormen zes MCM moleculen (MCM2-7) een aparte onderling gerelateerde familie van DNA helicases, die betrokken is bij de initiatiestap van de DNA synthese [34].

In eukaryote cellen vindt de initiatie van de DNA synthese plaats op welbepaalde plaatsen op de chromosomen, de zogenaamde ‘origins of replication’. Tijdens de celcyclus kunnen deze ‘origins’ twee statussen aannemen. De eerste status treedt op tijdens de G₁-fase vlak voor de replicatie, wanneer het pre-replicatieve complex (pre-RC) gevormd wordt ter hoogte van de ‘origins’. De essentiële eiwitten die deel uitmaken van dit complex zijn het ‘origin recognition complex’ (ORC), ‘cell division cycle 6/18’ (Cdc6/18), ‘Cdc10 dependent transcript 1’ (Cdt1) en het heterohexamere MCM2-7 complex [36]. ORC is waarschijnlijk gedurende de hele celcyclus aanwezig op het chromatine en dient als bindingsplaats voor Cdc6/18 en Cdt1, die op hun beurt zorgen voor het laden van het MCM complex op het chromatine (**Figuur 2a**). Het ORC-Cdc6/18 complex vormt een functioneel ATPase, terwijl Cdt1 van belang is voor het koppelen van dit ATPase aan het MCM2-7 complex, dat op zijn beurt assisteert in het ontwinden van het DNA (= helicase activiteit) (**Figuur 2b**). Wanneer al deze factoren gebonden zijn, kan de replicatie van het DNA van start gaan (= ‘licensed’ status) [9]. Na de replicatie initiatie is het van belang dat het pre-RC dissocieert om re-replicatie te voorkomen. Wanneer overgerepliceerd DNA in de M-fase terechtkomt, kan dit immers leiden tot celdood of ongecontroleerde celgroei. Een belangrijke rol hierin kan worden toegeschreven aan de familie van ‘cyclin-dependent kinases’ (CDKs). CDK-afhankelijke fosforylatie van enkele factoren van het pre-RC leidt ertoe dat deze niet meer aan het chromatine kunnen binden of dat ze gemerkt worden voor proteolyse of nucleair export. Tijdens deze tweede status (= ‘unlicensed’ status) wordt dus het pre-RC vervangen door het post-replicatieve complex (post-RC), waarbij enkel het ORC nog gebonden is aan de ‘origins’ (**Figuur 2a**). Deze status wordt aangehouden tot aan het einde van de M-fase, waarna de activiteit van de CDKs afneemt en er dus weer pre-RC kunnen gevormd worden voor een nieuwe ronde van replicatie [9,36].



Figuur 2: Rol van MCM eiwitten in de initiatie van het replicatieproces. ‘Licensing’ gebeurt door de associatie van ORC, Cdc6/18, Cdt1 en het MCM2-7 complex ter hoogte van het ‘origin’ DNA (= pre-RC). Na de replicatie initiatie leidt een toename in de CDK activiteit tot fosforylatie van onder meer het MCM complex, waardoor het pre-RC dissocieert en vervangen wordt door het post-RC waarbij enkel ORC nog gebonden is aan de origins (a). Het MCM2-7 complex bezit een intrinsieke helicase activiteit die bijdraagt aan het ontwinden van het chromatine. Gefosforyleerd MCM2-7 dissocieert van het chromatine (b) [9].

Vanwege hun functie in het DNA replicatieproces worden MCM eiwitten recent toegepast als markers voor de celcyclus status, wat wil zeggen dat ze in staat zijn om prolifererende cellen te onderscheiden van cellen in rust. De zes MCM moleculen (MCM2-7) worden tijdens alle fases van de celcyclus tot expressie gebracht, waarna ze bij het verlaten van de celcyclus gedownreguleerd worden. Dit leidt ertoe dat de MCM markers een hogere sensitiviteit hebben vergeleken met de bestaande proliferatiemarkers (Ki67/PCNA/AgNOR) wat betreft de detectie van delende cellen. Recente IHC studies hebben MCM moleculen geïdentificeerd als belangrijke voorspellers van de klinische uitkomst in verscheidene humane kankers [9]. Tot op het heden werden MCM markers nog niet toegepast in de veterinaire geneeskunde.

1.6.3 C-Kit

Er is reeds veel gekend over de expressie van de c-KIT receptor in MCTen, alsook over de detectie van deze receptor met behulp van IHC. Verschillende patronen van c-KIT expressie zijn reeds beschreven in zowel normale als neoplastische mastcellen. Normale mastcellen en sommige neoplastische mastcellen brengen c-KIT voornamelijk tot expressie op de celmembraan. In de meeste neoplastische mastcellen echter accumuleert de c-KIT receptor voornamelijk in het cytoplasma in de nabijheid van de nucleus [8]. Studies hebben reeds een correlatie aangetoond tussen de expressie van de receptor en de histologische graad van

MCTen, waarbij goed gedifferentieerde tumoren een zwakke c-KIT expressie en slecht gedifferentieerde tumoren een sterke c-KIT expressie vertonen [37]. Kiupel et al (2004) hebben aangetoond dat een verhoogde cytoplasmatische c-KIT kleuring significant geassocieerd is met een verhoogd risico op lokale relaps, alsook met een verminderde survival. Dit valt te verklaren door de rollen van c-KIT en SCF in de ontwikkeling van mastcellen zoals reeds werd vermeld (zie paragraaf 1.1). Het exacte mechanisme waarmee een verhoogde c-KIT expressie leidt tot een maligne transformatie is echter nog niet gekend [8].

1.7 Behandeling

Omwille van hun moeilijk te voorspellen biologische gedrag, stellen MCTen dierenartsen vaak voor moeilijke beslissingen wat betreft hun behandeling. Er zijn drie complementaire behandelingsmogelijkheden. Chirurgie is de hoeksteen van de behandeling, maar daarnaast hebben ook chemotherapie en radiotherapie hun indicaties.

Vooralsnog stuurt de histologische gradering in belangrijke mate de therapie. Voor graad I MCTen heeft brede chirurgie een gerapporteerde kans van 90% op tumorvrije overleving. Men neemt algemeen aan dat 3cm marges vereist zijn voor tumorvrije snijranden. Bij multiple cutane graad I mastocytoma's is herhaalde chirurgie op termijn vaak geen optie. Veel van deze patiënten reageren echter goed op behandeling met hormonale therapie onder de vorm van (*methyl*)prednisolone. In geval van graad II MCTen is de vraag of er naast initiële chirurgie, ook nood is aan adjuvante therapie onder de vorm van chemotherapie en hormonale therapie. Ongeveer de helft van de graad II MCTen zijn gemetastaseerd en hebben baat bij verdere behandeling. De chemotherapeutica met een goede werking op MCTen zijn *vinblastine* en *lomustine* (CCNu®), meestal in combinatie met *prednisolone*. In het geval van graad III MCTen is de prognose vaak zodanig slecht, dat chirurgie meestal geen optie is en dat palliatieve behandeling is aangewezen.

Verder reageren MCTen ook bijzonder goed op radiotherapie, maar bij gebrek aan radiotherapiefaciliteiten voor dieren in de Benelux is deze therapie voorlopig nog geen optie. Ten slotte is behandeling met histamine receptor blokkers (*cimetidine*) vaak aangewezen aangezien MCTen vaak maagulcera initiëren, met GI bloedverlies en braken als voornaamste symptomen [38].

1.8 Doelstellingen

In deze thesis worden een aantal morfologische en celbiologische aspecten van canine MCTen bestudeerd. Het morfologische aspect duidt hierbij enerzijds op een ultrastructurele analyse en anderzijds op een histochemische karakterisatie van de tumorweefsels. De ultrastructurele studie bestaat uit een morfologische typering van neoplastische mastcellen, een morfometrische analyse van deze mastcellen en een beschrijving van een aantal bijzondere waarnemingen. De histochemische karakterisatie van de MCTen is tweeledig. Een eerste deel omvat de kleuring van de tumorweefsels met de standaard trichroomkleuring van Masson, aan de hand waarvan de belangrijkste cellulaire componenten binnen de tumor gekwantificeerd worden en de hoeveelheid collageen op semi-kwantitatieve wijze bepaald wordt. Het tweede deel omvat de toluidine blauw kleuring die specifiek de mastcelgranula aankleurt.

Naast deze morfologische studie worden ook een aantal celbiologische aspecten van canine MCTen belicht. Hierbij wordt door middel van IHC in de tumoren gekeken naar proliferatie, een proces dat relevant is voor maligniteit. Er wordt initieel getest of het canine tumorweefsel aankleurt voor de nieuwe potentiële proliferatiemarker MCM7 en indien positief, wordt er een kwantitatieve vergelijking gemaakt tussen deze marker en de klassieke proliferatiemarker Ki67. Daarnaast wordt eveneens met behulp van IHC het expressiepatroon van c-KIT op het niveau van de neoplastische mastcellen bepaald.

Zowel voor het morfologische als voor het celbiologische aspect wordt getracht om de waarnemingen te koppelen aan de tumorgraad, om zo een idee te krijgen over de prognostische waarde ervan.

2 Materialen en methoden

De MCT stalen werden behandeld voor lichtmicroscopische (LM), immunohistochemische (IHC) en elektronenmicroscopische (EM) analyse.

2.1 Dieren

In samenwerking met de dierenartsenpraktijk St. Katharina in Hasselt werden tumorstalen van honden met MCTen verkregen. Op deze manier werden veertig tumorstalen uit de databank geselecteerd op basis van het inclusie criterium, zijnde het beschikken over voldoende weefsel om alle analyses te kunnen uitvoeren. Elektronenmicroscopie behoort niet tot deze analyses aangezien slechts vier van het totale aantal stalen hiervoor behandeld werden. De verschillende MCTen werden gegradeerd door patholoog Maenhout op basis van volgende criteria:

- aantal cellen met mitose figuren;
- anisocytose;
- anisokaryose;
- metachromasie van de mastcellen;
- voorkomen van bloedingen en necrose;
- mate van tumorinfiltratie.

2.2 Lichtmicroscopie

Voor LM analyse werden de tumorweefsels gefixeerd in Unifix ® (Klinipath, Turnhout). De gefixeerde weefsels werden gedehydrateerd in stijgende alcoholconcentraties, waarna alcohol vervangen werd door butanol, een organisch oplosmiddel dat mengbaar is met zowel alcohol als vloeibare paraffine. Vervolgens werden de tumorstalen ingebed in vloeibare paraffine en overnacht gehard. Hierna werden er door middel van een microtoom (Reichert-Jung) paraffinesecties gegenereerd met een dikte van 2-7µm. Deze secties werden aangebracht op draagglazjes die voorzien werden van een laagje poly-L-lysine dat zorgt voor een betere hechting van het weefsel. Voor histochemische kleuringen en immunokleuringen werden de secties vervolgens gedeparaffineerd en gehydrateerd met xylol, gevolgd door dalende concentraties alcohol en gedestilleerd water.

Er dient opgemerkt te worden dat een deel van de tumorstalen gefixeerd en ingebed zijn toegekomen aan het lab, waardoor de gebruikte methoden voor fixatie en inbedding voor deze

stalen niet gekend zijn. Deze stalen werden verder op dezelfde wijze behandeld als de door ons gefixeerde en ingebedde stalen.

2.2.1 Histochemische kleuringen

De coupes werden histochemisch gekleurd door de trichroomkleuring volgens Masson, alsook door de toluidine blauw kleuring.

2.2.1.1 Trichroomkleuring volgens Masson

De trichroomkleuring volgens Masson werd toegepast als overzichtskleuring en werkt zoals alle trichroomkleuringen volgens hetzelfde principe. De eerste stap is een kernkleuring door middel van ‘Mayer’s Hematoxylin’, dat de kernen een donkerrode kleur geeft. De tweede kleuring gebeurt door de gelijktijdige toediening van ponceau de xylidine, zure fuchsine en azophloxine, drie zure kleurstoffen die chemisch en fysisch van elkaar verschillen. Deze kleurstoffen geven een rode kleur aan het cytoplasma. Ten slotte wordt gekleurd met aniline blauw, waarbij het bindweefsel een blauwe kleur krijgt. Voor alle kleurstoffen wordt fosfomolybdeen zuur gebruikt als beits.

Protocol:

Na het deparaffineren en hydrateren werden de coupes voor acht minuten in ‘Mayer’s Hematoxylin’ geplaatst, waarna ze gedurende vijf minuten werden gespoeld onder stromend kraantjeswater. Vervolgens werden de stalen gedurende vijf minuten gekleurd met Ponceau-Fuchsine-Azophloxine, gespoeld in gedestilleerd water, gebeitst in 1% fosfomolybdeen zuur (twee minuten) en opnieuw gespoeld in gedestilleerd water. Hierna werden de coupes gedurende vijf minuten gekleurd met aniline blauw, gespoeld in gedestilleerd water, gebeitst in 1% fosfomolybdeen zuur (vijf minuten) en opnieuw gespoeld in gedestilleerd water. De gekleurde coupes werden vervolgens gedurende twee minuten in 1% azijnzuur gebracht om de overmaat aan blauwe kleurstof uit de cytoplasmatische structuren te verwijderen. Hierna werden ze gespoeld in gedestilleerd water en achtereenvolgens gedurende enkele seconden in 75% en 100% alcohol geplaatst om het uitspoelen van de kleurstof te voorkomen. Na het doorlopen van deze stijgende alcoholconcentraties, werden de stalen in xylol gebracht en vervolgens voorzien van dekglasjes door middel van DPX, een polymeer opgelost in xylol (VWR international, Leuven). De coupes werden geanalyseerd door een lichtmicroscop (Nikon Eclipse 80i, Japan) die voorzien is van een geautomatiseerde camera (Nikon Digital Sight DS-5M, Japan).

2.2.1.2 Toluïdine blauw

Sommige weefselbestanddelen krijgen in combinatie met een kleurstof een andere kleur dan de kleur van de originele kleurstof. Kleurstoffen die dit doen zijn metachromatisch. Dit is te wijten aan de wijziging van het absorptiespectrum van de kleurstof wanneer deze gebonden is aan bepaalde substanties. Toluïdine blauw is een voorbeeld van een metachromatische kleurstof. Substanties die de kleur van een metachromatische kleurstof kunnen veranderen zijn chromotroof. De granula van mastcellen zijn voorbeelden van chromotrope bestanddelen. Toluïdine blauw kleurt deze granula in schakeringen van rood en paars.

Protocol

Na het deparaffineren en hydrateren werden de secties gedurende twintig minuten in 1% Toluïdine blauw gebracht, waarna ze gespoeld werden in gedestilleerd water. Vervolgens werden de coupes gedehydrateerd met stijgende alcoholconcentraties gevolgd door xylol en door middel van DPX (VWR international, Leuven) voorzien van een dekglasje. De coupes werden geanalyseerd door een lichtmicroscop (Nikon Eclipse 80i, Japan) die voorzien is van een geautomatiseerde camera (Nikon Digital Sight DS-5M, Japan).

2.2.2 Immunokleuringen

Vóór het kleuren van de coupes werd de toegankelijkheid van de antigenen in de weefsels voor de antilichamen geoptimaliseerd, een proces dat ‘antigen retrieval’ wordt genoemd. Hiertoe werden de secties in een 10mM citraatbuffer (Dako, Heverlee) gebracht (pH 6) en gedurende vijftien minuten in de magnetron geplaatst. Vervolgens werd de endogene peroxidase activiteit geblokkeerd door toevoeging van 0,5% waterstofperoxide (H_2O_2) (VWR international, Leuven). Niet-specifieke bindingsplaatsen werden geblokkeerd met 3% NGS (Dako, Heverlee). Hierna werden de secties gedurende één uur geïncubeerd met primaire antilichamen tegen Ki67, MCM7 en c-KIT (Tabel 3). Vervolgens werden de coupes gedurende dertig minuten geïncubeerd met een peroxidase-gelabeld polymeer, gekoppeld aan ofwel een geit anti-muis ofwel een geit anti-konijn secundair antilichaam, afhankelijk van de species waarin de primaire antilichamen werden aangemaakt (Dako, Heverlee; Envision System ®). De immunoreactiviteit werd gevisualiseerd door blootstelling van de coupes aan het peroxidase substraat diaminobenzidine (DAB) (Dako, Heverlee; Envision System ®) gedurende 5-10 minuten. Vervolgens werden de secties tegengekleurd met ‘Mayer’s hematoxylin’ en meermaals gespoeld met kraantjeswater. Ten slotte werden de coupes gedehydrateerd met stijgende alcoholconcentraties, gevolgd door xylol en door middel van

DPX (VWR international, Leuven) voorzien van een dekglasje. De coupes werden geanalyseerd door een lichtmicroscoop (Nikon Eclipse 80i, Japan) die voorzien is van een geautomatiseerde camera (Nikon Digital Sight DS-5M, Japan).

Blanco stalen werden bij iedere kleuring voorzien. Deze stalen werden gedurende één uur geïncubeerd met buffer in plaats van met het primaire antilichaam. Verder werden deze stalen op identiek dezelfde manier behandeld als de andere specimens. Voor de proliferatiemarkers Ki67 en MCM7 werd daarnaast ook een interne positieve controle voorzien, namelijk de zeer proliferatieve basale epitheelcellaag in de huid.

Tabel 3: Overzicht van primaire antilichamen gebruikt voor IHC.

Antilichaam	Species	Verdunning	Antigen specificatie	Bron
Ki67	Mouse (Monoklonaal)	1/100	Proliferatiemarker	ImmunoSource (Halle-Zoersel, B)
MCM7	Mouse (Monoklonaal)	1/50	Proliferatiemarker	Abcam (Cambridge, UK)
c-KIT	Rabbit (Polyklonaal)	1/250	Membraanreceptor voor SCF, aanwezig in o.a. mastcellen	Santa Cruz (Santa Cruz, US)

2.3 Elektronenmicroscopie

Voor elektronenmicroscopie werden de tumorweefsels primair gefixeerd met 2% glutaraaldehyde (Laborimpex, Brussel) in een oplossing van 0,05M cacodylaatbuffer (pH 7,3) gedurende één uur bij 4°C. Vervolgens ondergingen de weefsels post-fixatie met 1% osmiumtetroxide (OsO₄) (Aurion, Wageningen) in een oplossing van 0,05M cacodylaatbuffer (pH 7,3) (Aurion, Wageningen) gedurende één uur bij 4°C. Daarna werden de tumorweefsels gedurende twintig minuten gekleurd met 2% uranyl acetaat in 10% aceton, gedehydrateerd in een reeks stijgende alcoholconcentraties en uiteindelijk ingebed in epoxy resin (Araldite) (Aurion, Wageningen). Ultradunne secties (0,04 - 0,06µm) werden verkregen door middel van de Ultracut E ultramicrotoom (Reichert-Jung) en vervolgens overgebracht op '50 mesh copper grids' (Aurion, Wageningen) gecoat met 0,7% formvar. Hierna werden de gegenereerde ultradunne secties gecontrasteerd met uranyl acetaat en loodcitraat. De stalen werden geanalyseerd door middel van een Philips EM 208 S transmissie elektronenmicroscoop (TEM) [39].

2.4 Kwantificering en statistiek

Om statistisch onderbouwde uitspraken te kunnen doen is kwantificering noodzakelijk. Hierbij worden waarden toegekend aan visueel waarneembare verschijnselen, die vervolgens met behulp van statistische tools vergeleken kunnen worden.

2.4.1 Kwantificering van cellulaire componenten en bindweefsel in MCTen

Om na te gaan of er een verschil is in de cellulaire samenstelling betreffende MCTen van verschillende graden, werden per tumor (zes tumoren per tumorgraad) tien foto's gemaakt op 100x vergroting. Twee onafhankelijke beoordelaars telden het aantal mastcellen, eosinofielen en fibroblasten op deze foto's en berekenden vervolgens gemiddelde waarden per tumor, alsook per tumorgraad. Daarnaast werd ook de gemiddelde verhouding van het aantal mastcellen en eosinofielen per tumor bepaald.

Naast deze cellulaire componenten, werd ook het bindweefsel binnen iedere tumor gekwantificeerd. Hiertoe werd van iedere MCT een afbeelding gemaakt op 10x vergroting in het tumorgebied met de grootste hoeveelheid collageen. Vervolgens werd het collageen op iedere foto gekwantificeerd door twee onafhankelijke beoordelaars. Deze kwantificering gebeurde op semi-kwantitatieve wijze, waarbij de tumor met de grootste hoeveelheid collageen vier kruisjes (+ + + +) kreeg, terwijl de tumor met de kleinste hoeveelheid collageen één kruisje (+) toegewezen kreeg. Op basis hiervan werd aan de overige tumoren een aantal kruisjes (+, ++, +++ of +++) toegekend op basis van de hoeveelheid collageen. Vervolgens werden de gemiddelde waarden per tumor en per tumorgraad berekend. Hierbij komt een streepje (-) overeen met de helft van een kruisje.

2.4.2 Kwantificering van ultrastructureel waarneembare morfometrische parameters

Om te bepalen of er een verschil is in een aantal parameters (celdiameter, celvolume, kerndiameter, kernvolume, aantal granula, diameter van granula, aantal mitochondria en diameter van mitochondria) tussen verschillende celtypes, werden per celttype dertig foto's gemaakt. Per foto werden vervolgens alle parameters gemeten met behulp van gespecialiseerde software (ITEM FEI). Per cel werden willekeurig vijf granula en vijf mitochondria geselecteerd, waarvan de diameter bepaald werd. Ten slotte werden gemiddelde waarden per cel (betreffende de diameter van granula en mitochondria) en per celttype bepaald.

2.4.3 Kwantificering van de Ki67 en MCM7 expressie

Om een idee te krijgen van de Ki67 en MCM7 expressie, werden per tumor en voor iedere marker (na IHC voor betreffende marker) vijf foto's gemaakt in het tumorgebied met de hoogste expressie. Vervolgens werden twee methoden gehanteerd om de immunopositiviteit per foto te bepalen. De eerste methode was het bepalen van het percentage bruine (bruine, bruin-blauwe en bruin-grijze) pixels per afbeelding met behulp van gespecialiseerde software (Image J). De tweede methode omvatte het bepalen van het aantal immunopositieve (bruine) mastcellen per afbeelding. Na deze kwantificering werden gemiddelde waarden per tumor en per tumorgraad berekend voor beide methodes.

2.4.4 Statistiek

De bekomen gemiddelde waarden werden vergeleken door middel van de student t-test, waarbij getest werd of er al dan niet sprake is van significante verschillen.

3 Resultaten

Na de karakterisatie van de verschillende stalen, worden de MCT weefsels lichtmicroscopisch (LM), elektronenmicroscopisch (EM) en immunohistochemisch (IHC) onderzocht.

3.1 Karakterisatie van de MCT stalen

Veertig honden met MCTen, die voldeden aan het inclusiecriterium, werden geïdentificeerd en geselecteerd uit de database van de dierenartsenpraktijk St. Katharina. Gradering van de tumoren resulteerde in 26 graad I, 6 graad II en 6 graad III MCTen, wat overeenkomt met respectievelijk 68 %, 16 % en 16 %. Van twee tumoren werd de graad niet bepaald (Tabel 4).

Onder de getroffen dieren zijn verschillende rassen aanwezig: zes Labrador Retrievers, twee Berner Sennenhonden, twee Golden Retrievers, twee Bulldogs, twee West Highland Terriërs en twee Setters. Andere rashonden (16) zijn vertegenwoordigd door één enkel dier. Eén hond is een bastaard (gemengd ras). Van de overige zeven honden is het ras niet gekend (Tabel 4).

De gemiddelde leeftijd op het tijdstip van de diagnose bedraagt acht jaar en 6 maanden. De jongste leeftijd waarop een MCT gediagnosticeerd werd, is drie maanden; de oudste leeftijd bedraagt veertien jaren. Van acht dieren is de exacte leeftijd onbekend (Tabel 4).

De anatomische locaties waar deze MCTen het meest frequent voorkomen zijn de achterpoot (10/32; 31,2 %), de flank (5/32; 15,6 %), de voorpoot (4/32; 12,5 %), de thorax (4/32; 12,5 %), de lies (2/32; 6,3 %), de rug (2/32; 6,3 %) en de hoofd/nek regio (2/32; 6,3 %). Locaties die eenmaal voorkomen zijn de staart (3,1 %), het scrotum (3,1 %) en de maag (3,1 %). Van zeven honden is de anatomische locatie van de MCT niet gekend (Tabel 4).

De honden met MCTen werden op verschillende manieren behandeld. Eén hond werd uitsluitend behandeld met *prednisolone* (1/33). De andere dieren (32/33) werden behandeld middels chirurgische excisie van de tumor. Voor zover de anatomische locatie en de uitgebreidheid van de tumor het toelieten, werden tijdens de operatieve ingreep zo breed mogelijke tumorvrije randen bekomen (30/32). Sommige honden die operatief behandeld werden, kregen bijkomstig *prednisolone* toegediend (4/32) of een combinatie van *prednisolone* en chemotherapie onder de vorm van *vinblastine* (2/32). Eén dier onderging euthanasie tijdens de operatie (1/32) (Tabel 4).

Wat betreft de huidige status van de dieren kan gesteld worden dat 17/40 dieren (42,5 %) nog in leven zijn terwijl 10/40 dieren (25 %) overleden zijn. Van de overige 13 dieren (32,5 %) is deze status onbekend. Alle levende dieren (17/17; 100 %) hebben een graad I MCT. Tussen de overleden dieren bevinden zich vijf honden met graad I MCTen, drie honden met graad II MCTen en één hond met een graad III MCT. Van één overleden dier is de graad onbekend (**Tabel 4**).

De overlevingstijd is gekend voor acht van de tien overleden dieren. De gemiddelde overlevingstijd van deze dieren, gerekend vanaf het tijdstip van de diagnose tot aan het tijdstip van overlijden, bedraagt tien maanden, variërend van 0 maanden (graad III) tot 25 maanden (graad I). De gemiddelde overlevingstijd van overleden dieren met graad I, II en III tumoren bedraagt respectievelijk 18 maanden, 6 maanden en 0 maanden (**Tabel 4**).

Betreffende de groep van overleden dieren, kan er vastgesteld worden dat 4/10 honden overleden zijn tengevolge van hun MCT, terwijl dit in 3/10 dieren niet het geval is. Andere doodsoorzaken in deze dieren zijn nierfalen en dermale metastasen van een hemangiosarcoma. De drie dieren die niet gestorven zijn tengevolge van hun MCT, hadden een graad I MCT. De doodsoorzaak van de overige 3/10 overleden dieren is onbekend (**Tabel 4**).

Wanneer er gezocht wordt naar correlaties tussen het overlijden van dieren en de andere kenmerken, kan er opgemerkt worden dat 7/10 overleden dieren enkel behandeld zijn met een operatieve ingreep. Daarnaast bedraagt de gemiddelde leeftijd van de gestorven honden op het tijdstip van diagnose elf jaar. Wat betreft de anatomische locatie kan waargenomen worden dat 3/10 overleden dieren een MCT vertoonden ter hoogte van de achterpoot, 2/10 honden ter hoogte van de voorpoot en 2/10 dieren ter hoogte van de flank. De overige overleden honden hadden MCTen ter hoogte van de staart, de thorax en de maag. Ten slotte kan er vastgesteld worden dat er tien rassen vertegenwoordigd zijn in die tien overleden dieren (**Tabel 4**).

Wegens tijdsgebrek en het laattijdig in het bezit krijgen van een groot aantal stalen, worden verdere analyses uitgevoerd op achttien stalen waarin van iedere graad zes willekeurige stalen vertegenwoordigd zijn (*zie vetgedrukte nummers in tabel 4*).

Tabel 4: Karakteristieken van de verschillende MCTen.

tumor n°	Ras	Leeftijd	Gradering	Locatie	Behandeling	Status (Survival tijd)	Overleden door MCT?
1	Canis Vulgaris	11	1	Thorax	Chirurgie	Levend	-
2	West Highland White Terrier	11	2	Achterpoot	Chirurgie	Dood (7 maanden)	Ja
3	Springer Spaniel	12	1	Flank	Chirurgie <i>Prednisolone</i>	Dood (25 maanden)	Ja
4	Engelse Setter	6	1	Achterpoot	Chirurgie	Levend	-
5	Teckel Langhaar	14	1	Thorax	Chirurgie	Levend	-
6	Mechelse Herder	12	3	Abdominaal	Euthanasie	Dood (0 maanden)	Ja
7	Malteser	11	Onbekend	Voorpoot	<i>Prednisolone</i>	Dood (onbekend)	Ja
8	Labrador Retriever	13	1	Flank	Chirurgie	Levend	-
9	Briard	11	1	Flank	Chirurgie	Dood (18 maanden)	Onbekend
10	Sint-Bernardhond	3	1	Lies	Chirurgie	Levend	-
11	Boxer	4	1	Achterpoot	Chirurgie	Onbekend	Onbekend
12	Labrador Retriever	10	2	Serotum	Chirurgie	Onbekend	Onbekend
13	Berner Sennenhond	8	1	Achterpoot	Chirurgie	Dood (onbekend)	Neen Oorzaak: nierfalen
14	Berner Sennenhond	5	1	Voorpoot	Chirurgie	Levend	-
15	Labrador Retriever	11	1	Achterpoot	Chirurgie	Dood (19 maanden)	Neen Oorzaak: hemangiosarcoma
16	Golden Retriever	3	1	Flank	Chirurgie	Levend	-
17	Rottweiler	10	1	Staart	Chirurgie	Dood (10 maanden)	Neen Oorzaak: onbekend
18	Hovawart	9	2	Thorax	Chirurgie <i>Vinblastine/Prednisolone</i>	Dood (7 maanden)	Onbekend

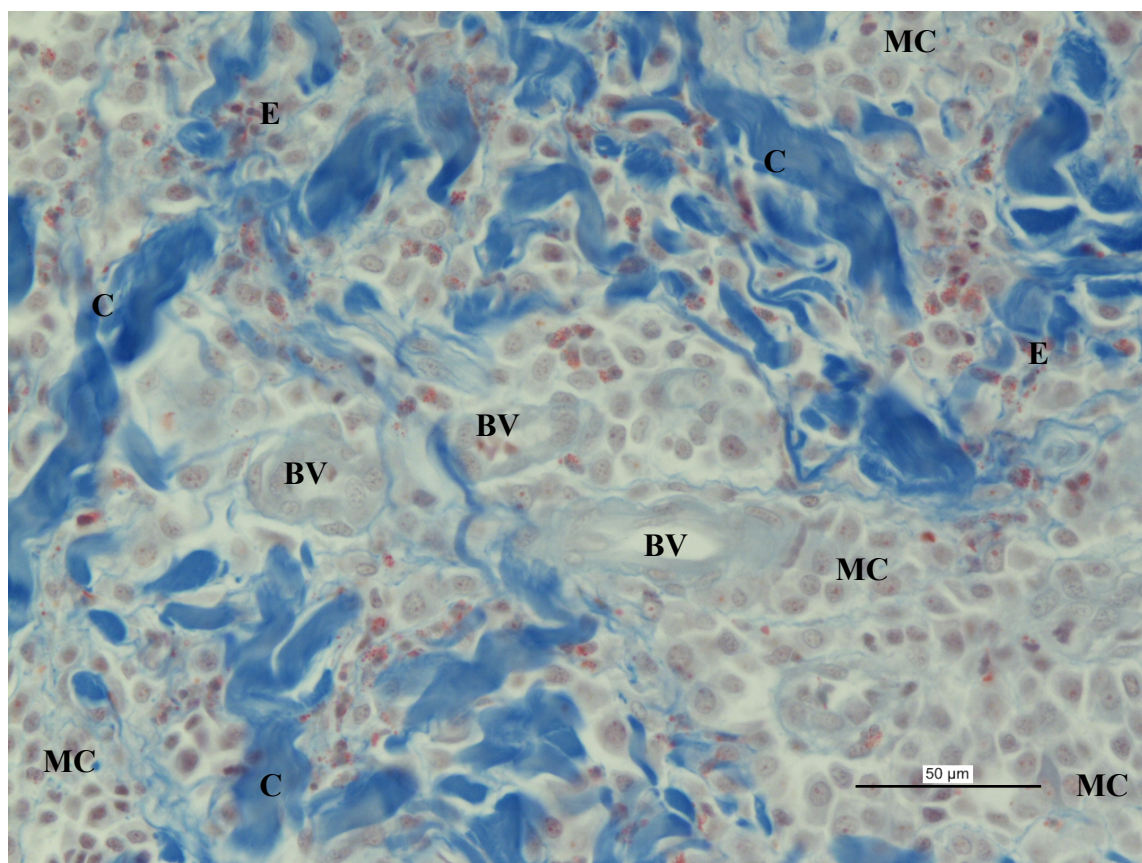
19	Golden Retriever	2	1	Hoofd en nek	<i>Prednisolone</i> Chirurgie	Levend	-
20	Mopshond	5	1	Achterpoot	Chirurgie	Levend	-
21	Bastaard Fox	8	1	Rug	Chirurgie	Levend	-
22	Labrador Retriever	Onbekend	Onbekend	Hoofd en nek	Chirurgie	Onbekend	Onbekend
23	Bordeau Dog	5	1	Voorpoot	Chirurgie <i>Vinblastine/Prednisolone</i>	Levend	-
24	Dwergpinscher	6	1	Achterpoot	Chirurgie	Onbekend	Onbekend
25	Bouvier		1	Achterpoot	Chirurgie <i>Prednisolone</i>	Onbekend	Onbekend
26	West Highland White Terrier	14	1	Achterpoot	Chirurgie	Onbekend	Onbekend
27	Ierse Setter	14	2	Voorpoot	Chirurgie	Dood (3 maanden)	Onbekend
28	Franse Bulldog	3 maanden	1	Achterpoot	Chirurgie	Levend	-
29	Labrador Retriever	10	1	Rug	Chirurgie	Levend	-
30	Keeshond	12	1	Flank	Chirurgie	Levend	-
31	Lhasa Apso	5	1	Thorax	Chirurgie	Levend	-
32	Labrador Retriever	10	1	Lies	Chirurgie <i>Prednisolone</i>	Levend	-
33	Jack Russell Terriër	8	1	Rug	Chirurgie	Levend	-
34	Onbekend		3			Onbekend	
35			3				
36			3				
37			3				
38			3				
39			2				
40			2				

De vetgedrukte nummers vertegenwoordigen de stalen die gebruikt zijn voor verdere analyses. Dit zijn 18/40 stalen waarin zes stalen van iedere graad aanwezig zijn.

3.2 LM analyse van MCTen

De achttien geselecteerde MCT stalen (tumor n° 2, 3, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 23, 27, 28, 34, 35, 36, 37, 38, 39 en 40; Tabel 4) werden behandeld voor LM analyse en gekleurd met de trichroomkleuring volgens Masson en met Toluïdine blauw om een idee te krijgen van de cellulaire samenstelling, de collageeninhoud, de aanwezigheid van bloedvaten en het voorkomen van de neoplastische mastcellen (o.a. metachromasie).

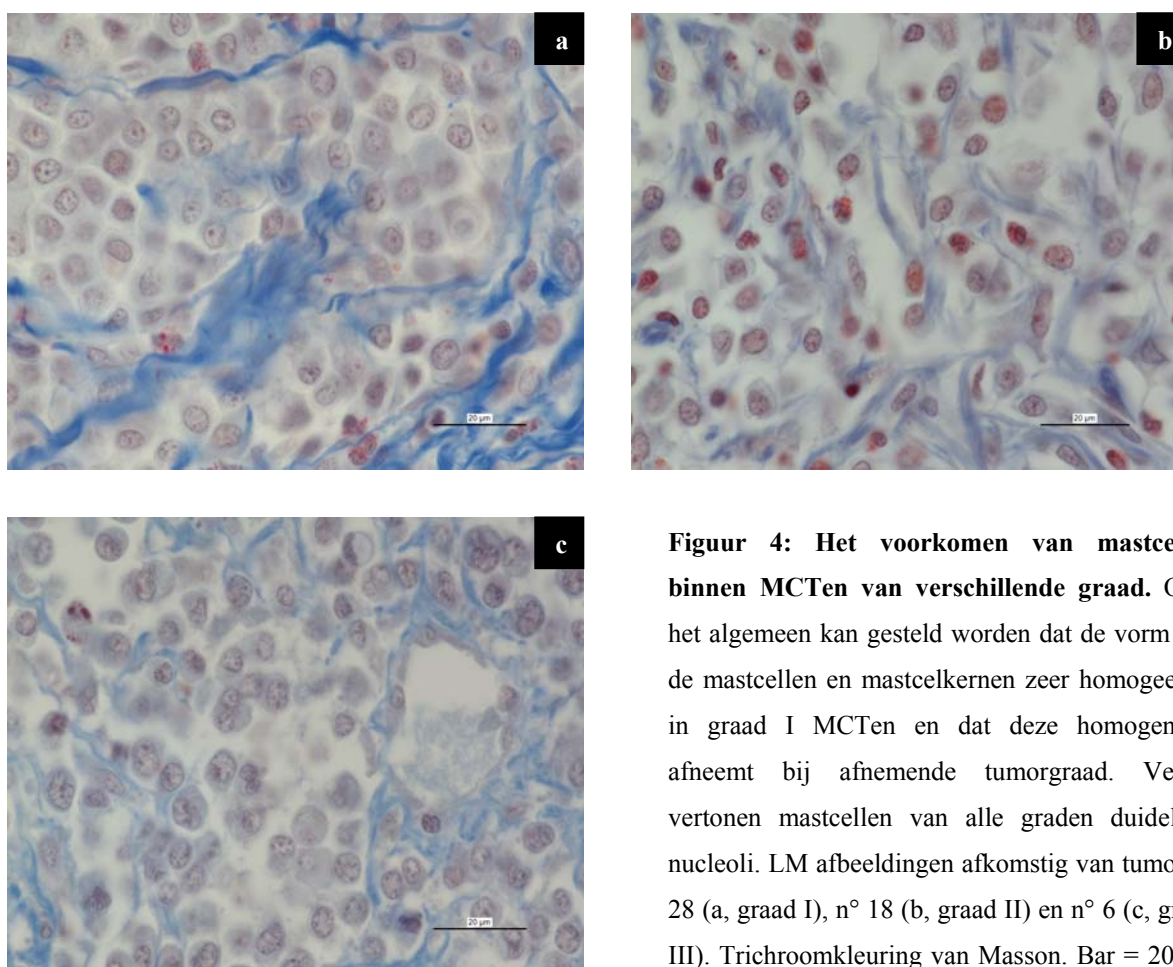
Over het algemeen kan waargenomen worden dat MCTen gekenmerkt worden door de aanwezigheid van neoplastische mastcellen, eosinofielen, grote hoeveelheden collageen en bloedvaten (Figuur 3).



Figuur 3: Algemene samenstelling van canine MCTen. MCTen zijn opgebouwd uit neoplastische mastcellen (MC), eosinofielen die gekenmerkt worden door een rood gekorrelt cytoplasma (E), grote hoeveelheden collageen (C) en veel bloedvaten (BV). LM afbeelding afkomstig van tumor n° 28 (graad I). Trichroomkleuring van Masson. Bar = 50µm. Vergroting: 40x.

3.2.1 Morfologie van mastcellen binnen MCTen

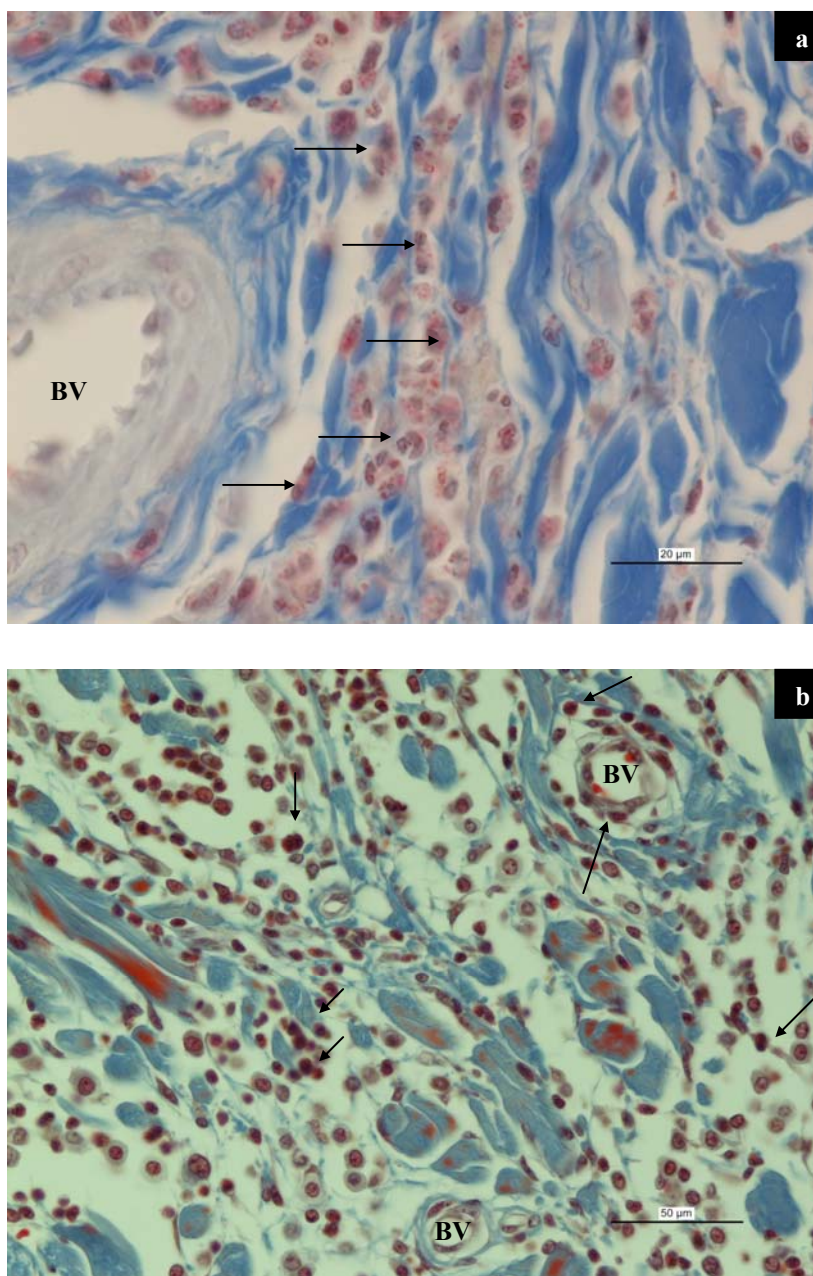
Wat betreft het voorkomen van mastcellen binnen MCTen, kan een onderscheid gemaakt worden op basis van de tumorgraad. Figuur 4 toont beelden van een graad I (a), een graad II (b) en een graad III (c) MCT. Graad I mastcellen worden gekenmerkt door een groot niveau van gelijkvormigheid. De kernen zijn rond of ovaal en ongeveer van dezelfde grootte. De mastcellen vertonen meestal één of twee duidelijke nucleoli (Figuur 4a). Graad III mastcellen daarentegen vertonen een veel grotere variatie in vorm en grootte. Ook de kernen van deze cellen zijn wat betreft vorm zeer verschillend, gaande van rond en ovaal tot spoelvormig en onregelmatig. Net zoals graad I mastcelkernen vertonen de nuclei van graad III mastcellen gewoonlijk één, twee of meerdere zeer duidelijke nucleoli. MCTen van de derde graad zijn over het algemeen veel minder gestructureerd en georganiseerd vergeleken met graad I mastocytoma's (Figuur 4c). De mastcellen van graad II tumoren nemen een intermediaire positie in tussen graad I en graad III mastcellen wat betreft vorm, organisatieniveau en voorkomen van de kern. Ook de kernen van graad II mastcellen vertonen duidelijk zichtbare nucleoli (Figuur 4b).



Figuur 4: Het voorkomen van mastcellen binnen MCTen van verschillende graad. Over het algemeen kan gesteld worden dat de vorm van de mastcellen en mastcelkernen zeer homogeen is in graad I MCTen en dat deze homogeniteit afneemt bij afnemende tumorgraad. Verder vertonen mastcellen van alle graden duidelijke nucleoli. LM afbeeldingen afkomstig van tumor n° 28 (a, graad I), n° 18 (b, graad II) en n° 6 (c, graad III). Trichroomkleuring van Masson. Bar = 20µm. Vergroting: 100x.

3.2.2 Eosinofielen in MCTen

Naast mastcellen zijn eosinofielen de belangrijkste cellulaire componenten binnen de meeste MCTen. Deze cellen worden gekenmerkt door een zogenaamde brilkern, bestaande uit twee lobben. Verder bevat het cytoplasma van deze cellen zeer duidelijk zichtbare rode korrels. Meestal komen de eosinofielen voor in nauw contact met het collageen en de bloedvaten binnen de tumor (**Figuur 5**). In sommige tumoren zijn deze eosinofielen gegroepeerd in bepaalde regio's en bijgevolg afgezonderd van de mastcellen (**Figuur 5a**). Andere tumoren worden gekenmerkt door eosinofielen die verspreid tussen de neoplastische mastcellen gelokaliseerd zijn (**Figuur 5b**). Ook in deze laatste groep blijven eosinofielen nauw geassocieerd met het collageen.

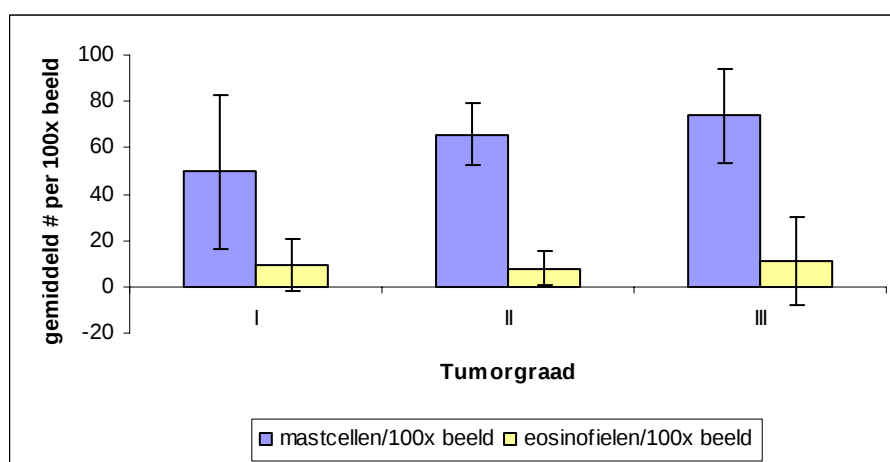


Figuur 5: Het voorkomen van eosinofielen binnen MCTen.

Eosinofielen vormen naast mastcellen de belangrijkste cellulaire componenten binnen MCTen. Ze worden gekenmerkt door een brilkern en rode korrels in het cytoplasma. Ze kunnen op twee manieren voorkomen binnen tumoren: ofwel gegroepeerd en afgezonderd van mastcellen (**a**) ofwel verspreid tussen tumor mastcellen (**b**) (pijlen). In beide gevallen is er een sterke associatie zichtbaar tussen eosinofielen enerzijds en collageen/bloedvaten anderzijds (**a+b**). LM foto's afkomstig van tumor n° 16 (a, graad I) en n° 14 (b, graad I). Trichroomkleuring van Masson. Bar = 20µm (a), 50µm (b). Vergroting: 100x (a), 40x (b).

3.2.3 Cellulariteit binnen MCTen: mastcellen versus eosinofielen

Om een idee te krijgen van het aantal mastcellen en eosinofielen per oppervlaktegebied (100x) en om na te gaan of deze aantallen gerelateerd zijn aan de tumorgraad, werden deze celtypen in alle tumorstalen gekwantificeerd. Figuur 6 toont een grafische voorstelling van het gemiddelde aantal mastcellen en eosinofielen per 100x vergroting (**Tabel 4**) voor iedere tumorgraad. Wanneer de mastcellen beschouwd worden, is er een stijgende trend waarneembaar waarbij het gemiddelde aantal mastcellen per oppervlaktegebied toeneemt met toenemende tumorgraad. De gemiddelde waarden zijn 49,6 (SD $\pm$ 33,3), 65,8 (SD $\pm$ 13,35) en 73,88 (SD $\pm$ 20,39) voor respectievelijk graad I, II en III MCTen. Ondanks het optreden van een duidelijke trend, is er geen sprake van een significante toename in het aantal mastcellen met stijgende tumorgraad [$p(\text{graad I versus graad 2}) = 0,31$; $p(\text{graad II versus graad III}) = 0,44$ en $p(\text{graad I versus graad III}) = 0,16$] (**Figuur 6**). Deze grafiek toont verder aan dat er geen significant verschil is in het gemiddelde aantal eosinofielen per 100x vergroting tussen de verschillende tumorgraden [$p(\text{graad I versus graad 2}) = 0,78$; $p(\text{graad II versus graad III}) = 0,71$ en $p(\text{graad I versus graad III}) = 0,85$]. Graad I, II en III MCTen hebben voor deze parameter gemiddelde waarden van respectievelijk 9,57 (SD $\pm$ 11,42), 8 (SD $\pm$ 7,2) en 11,28 (SD $\pm$ 19) (**Figuur 6**).



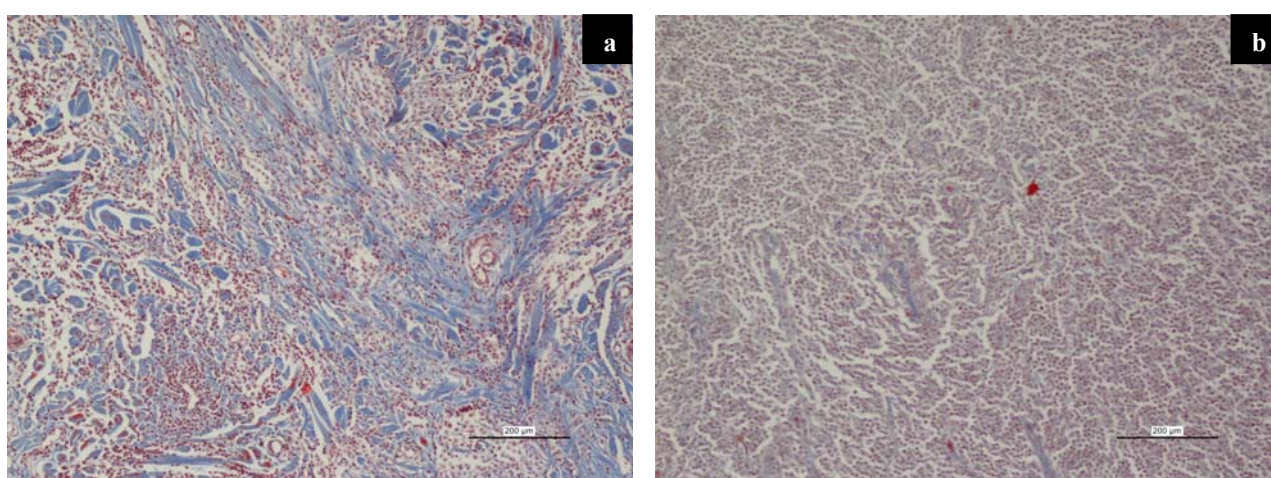
Figuur 6: Vergelijking van het aantal mastcellen en eosinofielen tussen de verschillende MCT graden. Per tumorgraad werden zes tumoren geanalyseerd door het tellen van het aantal mastcellen en eosinofielen per 100x vergroting (n = 10/tumor).

P-waarden voor het gemiddelde aantal mastcellen/100x beeld: $p(\text{I-II}) = 0,31$; $p(\text{II-III}) = 0,44$ en $p(\text{I-III}) = 0,16$.

P-waarden voor het gemiddelde aantal eosinofielen/100x beeld: $p(\text{I-II}) = 0,78$; $p(\text{II-III}) = 0,71$ en $p(\text{I-III}) = 0,85$.

3.2.4 Collageeninhoud en fibroblasten in MCTen

Het gebruik van de trichroomkleuring volgens Masson laat toe om het collageen in de MCTen duidelijk zichtbaar te maken. Op deze manier kan de hoeveelheid collageen binnen iedere tumor bepaald worden op semi-kwantitatieve wijze waarbij (++++), overeenkomt met de grootste hoeveelheid collageen (**Figuur 7a**) en (+) met de kleinste hoeveelheid collageen (**Figuur 7b**). Tabel 5 toont dat de gemiddelde hoeveelheid collageen in graad I MCTen het grootst is (++++), gevolgd door de graad II (++) en graad III (+-) tumoren. Er kan dus vastgesteld worden dat de hoeveelheid collageen afneemt bij een toenemende tumorgraad (**Tabel 5**).



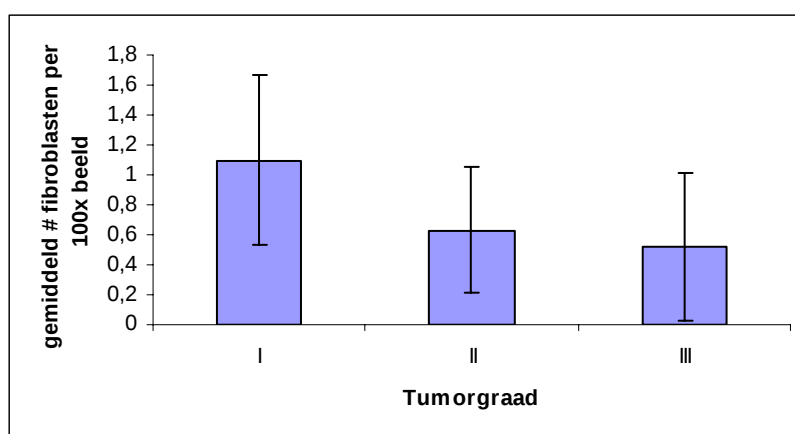
Figuur 7: Collageeninhoud van MCTen. In sommige tumoren (**a**) is veel meer collageen aanwezig (++++), dan in andere tumoren (+) (**b**). LM afbeeldingen afkomstig van tumor n° 14 (a, graad I) en n° 35 (b, graad III). Trichroomkleuring van Masson. Bar = 200µm. Vergroting: 10x.

Tabel 5: Semi-kwantitatieve vergelijking van de hoeveelheid collageen tussen de verschillende tumorgraden.

Tumorgraad	Collageen
I	++++
II	++
III	+-

De aanduiding ‘-’ komt overeen met de helft van ‘+’. Per tumorgraad werd in zes tumoren ($n = 6$) de collageeninhoud door twee onafhankelijke beoordelaars op semi-kwantitatieve wijze geschat.

Om na te gaan of de hoeveelheid collageen samenhangt met het aantal fibroblasten, de cellen die verantwoordelijk zijn voor de productie van het bindweefsel, werd in iedere MCT het gemiddelde aantal fibroblasten per 100x vergroting bepaald (**Figuur 8**). Gemiddelde waarden voor het aantal fibroblasten per oppervlaktegebied voor graad I, II en III tumoren zijn respectievelijk 1,1 (SD $\pm$ 0,6), 0,63 (SD $\pm$ 0,43) en 0,52 (SD $\pm$ 0,5). Ondanks een trend, waarbij het aantal fibroblasten afneemt met toenemende tumorgraad, is er geen significant verschil in het gemiddelde aantal fibroblasten tussen de verschillende tumorgraden [p(graad I versus graad 2) = 0,14; p(graad II versus graad III) = 0,67 en p(graad I versus graad III) = 0,09] (**Figuur 8**).

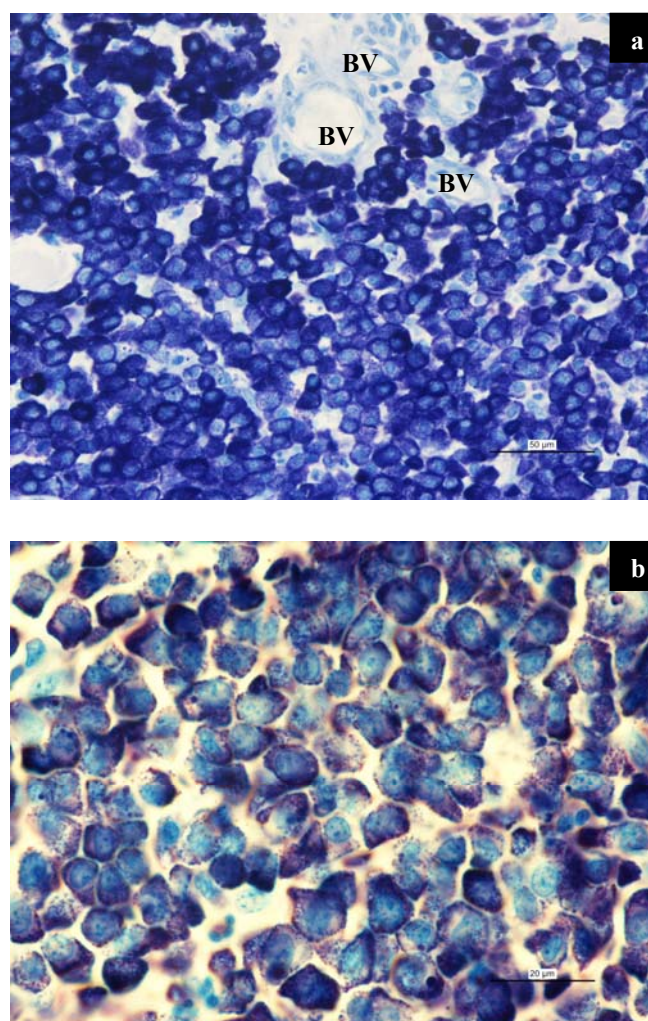


Figuur 8: Vergelijking van het gemiddelde aantal fibroblasten per 100x vergroting tussen de verschillende tumorgraden. Per tumorgraad werden zes tumoren geanalyseerd door het kwantificeren van het gemiddelde aantal fibroblasten per 100x vergroting (n = 10/tumor).

P-waarden voor het gemiddelde aantal fibroblasten/100x vergroting: p(I-II)= 0,14; p(II-III)= 0,67 en p(I-III)= 0,09.

3.2.5 Metachromasie van neoplastische mastcellen

MCT stalen werden gekleurd met toluïdine blauw om een idee te krijgen van de mastcelgranula, die niet zichtbaar worden gemaakt met een trichroomkleuring volgens Masson (**Figuur 9a+b**). Deze metachromatische kleuring kleurt de granula in schakeringen van rood en paars (**Figuur 9b**). De kernen van de mastcellen en de andere cellen in de tumor, onder andere endotheelcellen en eosinofielen, krijgen een zachtblauwe kleur van de toluïdine blauw kleurstof (**Figuur 9**). Ondanks de aanwezigheid van metachromatische granula in alle tumorgraden, is deze metachromasie toch het meest uitgesproken in graad I MCTen (*hier: graad I MCT; resultaten voor graad II en III MCTen niet weergegeven*).

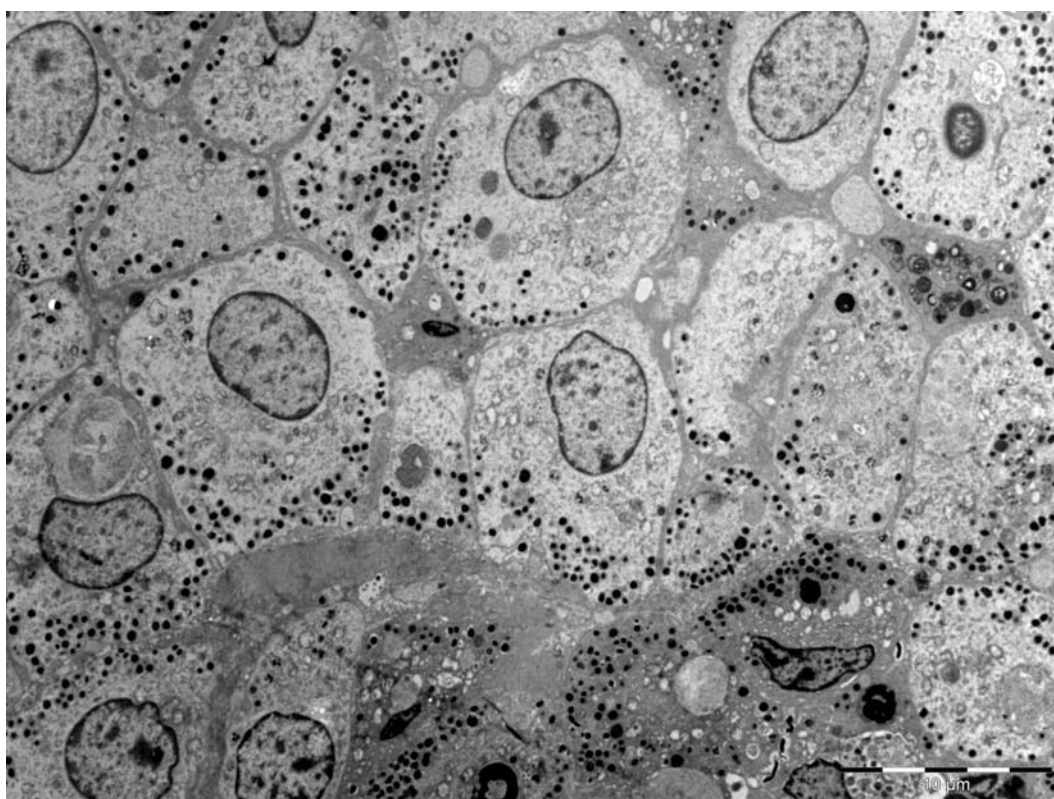


Figuur 9: Toluïdine blauw kleuring van graad I MCT. De metachromatische toluïdine blauw kleuring kleurt specifiek de mastcelgranula in tinten van rood en paars, terwijl andere cellulaire componenten een lichte blauwe kleur krijgen (**a+b**). Foto a toont naast een groep mastcellen ook een aantal bloedvaten (BV). Foto b toont duidelijk mastcellen met een lichtblauwe kern omgeven door metachromatische granula in het cytoplasma. LM afbeeldingen afkomstig van tumor n° 24 (graad I). Toluïdine blauw. Bar = 50µm (a), 20µm (b). Vergroting: 40x (a), 100x (b).

3.3 Ultrastructuur van MCTen

Om de ultrastructuur van MCTen te bestuderen werden vier tumorstalen (tumor n° 6, 8, 16 en 24; Tabel 4) behandeld voor EM analyse. Dit zijn drie graad I MCTen (n° 8, 16 en 24) en één graad III MCT (n° 6). De andere tumorstalen werden niet op de juiste manier gefixeerd om EM analyse toe te laten.

Een eerste EM observatie van de tumoren toont aan dat de mastcellen en de andere celtypen goed geconserveerd blijven tijdens de toegepaste fixatie- en inbedprocedures. Onderstaande figuur toont mastcellen die voornamelijk gekenmerkt worden door donkere perifeer gelegen granula in hun cytoplasma. Er kunnen duidelijk twee types onderscheiden worden (Figuur 10). De morfologische en morfometrische verschillen tussen deze types worden verder toegelicht in de volgende paragraaf (zie paragraaf 3.3.1).



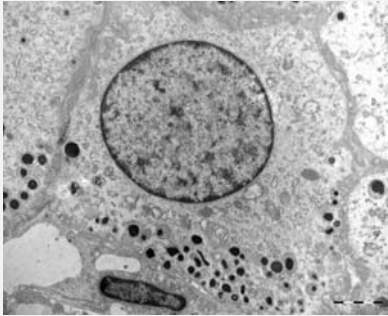
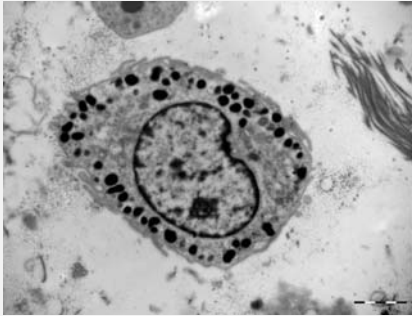
Figuur 10: EM overzichtsbeld van MCT. De mastcellen zijn duidelijk zichtbaar door de aanwezigheid van donkere granula in hun cytoplasma. EM afbeelding afkomstig van tumor n° 24 (graad I). Bar = 10µm. Vergroting: 2200x.

3.3.1 Types mastcellen in graad I MCTen

Zoals reeds aangegeven in de vorige paragraaf (zie paragraaf 3.3) vertonen graad I MCTen twee types mastcellen die ongeveer in gelijke hoeveelheden voorkomen en die op basis van een aantal morfologische kenmerken van elkaar onderscheiden kunnen worden. Type I mastcellen vertonen over het algemeen een zeer licht cytoplasma, terwijl type II mastcellen gekenmerkt worden door een iets donkerder cytoplasma. Het cytoplasma van beide types mastcellen bevat een groot aantal perifeer gelokaliseerde granula. Het verschil is dat deze bij type 1 cellen geconcentreerd zijn ter hoogte van één celpool, terwijl deze bij type 2 cellen verspreid zijn over de hele cel. Ook de kernen zijn duidelijk verschillend tussen beide types. De nucleï van type 1 mastcellen zijn over het algemeen rond of ovaal, terwijl deze van type 2 mastcellen een eerder onregelmatige vorm vertonen. Verder vertonen type 1 kernen een gekorrelde chromatine patroon in tegenstelling tot de type 2 kernen, die gekarakteriseerd worden door chromatine dat gewoonlijk ter hoogte van de kernmembraan gecondenseerd is (**Tabel 6, morfologie**).

Naast deze morfologische kenmerken werden voor deze twee types mastcellen ook een aantal morfometrische karakteristieken bepaald. Van beide celtypes werden dertig verschillende cellen gezocht en gefotografeerd. Vervolgens werden van deze cellen een aantal kenmerken gemeten en gekwantificeerd, waarna gemiddelde waarden berekend werden (**Tabel 6, morfometrie**). Als eerste werden de diameters van de cel en de celkern bepaald. Dit leverde geen significant verschil op tussen beide celtypes met gemiddelde waarden van 11602,63nm (SD $\pm$ 2227,87) en 11194,78nm (SD $\pm$ 1915,07) voor de celdiameter ($p = 0,45$), en 5028,28nm (SD $\pm$ 1188,66) en 4635,68nm (SD $\pm$ 803,32) voor de kerndiameter ($p = 0,14$) (**Figuur 13a**). Ook wat betreft de kern/cytoplasma verhouding, wordt er geen significant verschil waargenomen tussen de celtypes ($0,21 \pm 0,007$ versus $0,18 \pm 0,06$; $p = 0,07$) (**Figuur 13b**). Verder werden ook het aantal granula en de diameter ervan bepaald voor iedere cel. Hierbij is het gemiddelde aantal granula significant groter in type 2 mastcellen ($69,77/\text{celprofiel} \pm 21,57$) in vergelijking met type 1 mastcellen ($9,77/\text{celprofiel} \pm 21,57$) ($p = 0,04$) (**Figuur 13c**). Wat betreft de diameter van de granula, wordt er geen significant verschil waargenomen tussen celtype 1 ($443 \text{ nm} \pm 123$) en celtype 2 ($444,69 \text{ nm} \pm 132,22$) ($p = 0,91$) (**Figuur 13d**). Ten slotte werden ook de mitochondria geteld en gemeten. Dit leverde geen significant verschil op tussen beide celtypes. Gemiddelde waarden hiervan zijn $13,97/\text{celprofiel}$ (SD $\pm$ 7,62) en $13,03/\text{celprofiel}$ (SD $\pm$ 6,74) betreffende het aantal mitochondria ($p = 0,62$) (**Figuur 13c**) en $525,74\text{nm}$ (SD $\pm$ 159,83) en $522,11\text{nm}$ (SD $\pm$ 162,87) betreffende de diameter van de mitochondria ($p = 0,85$) (**Figuur 13d**). Deze morfometrische gegevens staan weergegeven in tabel 6.

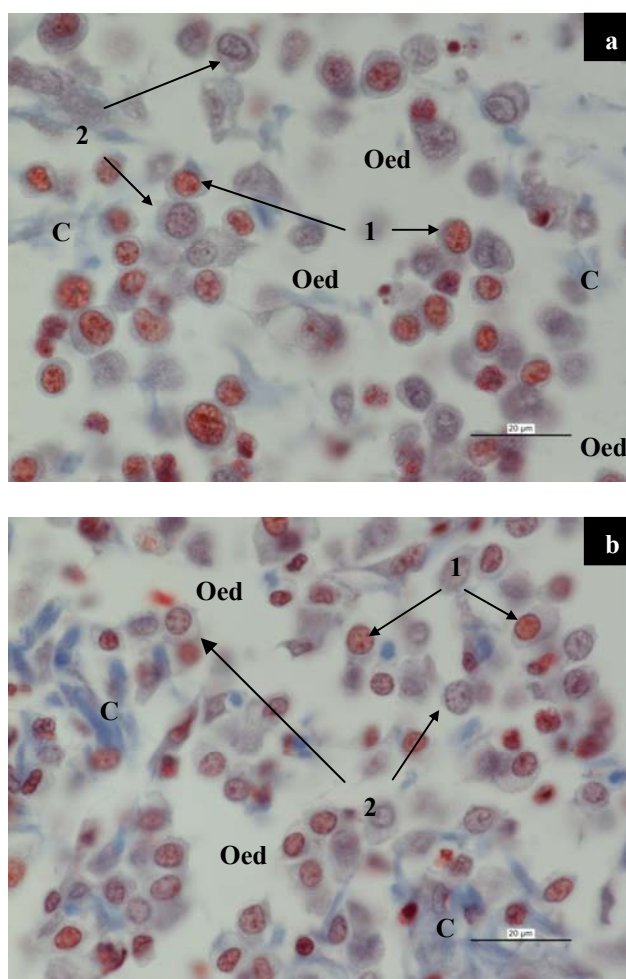
Tabel 6: Morfologie en morfometrie van type 1 en type 2 mastcellen, afkomstig van graad I MCTen.

	Type 1 mastcel (graad I)	Type 2 mastcel (graad I)
Morfologie - cytoplasma - kern	 (EM afbeelding, afkomstig van tumor n° 28, bar = 2µm, vergroting: 7100 x) - licht (kleine elektronendichtheid) - perifeer gelokaliseerde granula - granula aan één pool - rond of ovaal - gekorrelde chromatine patroon	 (EM afbeelding, afkomstig van tumor n° 16, bar = 2µm, vergroting: 7100 x) - donker (grote elektronendichtheid) - perifeer gelokaliseerde granula - granula verspreid over hele cel - onregelmatige vorm - gecondenseerd chromatine
Morfometrie - # cellen gemeten (n) - gemiddelde d_{cel} - gemiddelde d_{kern} - gemiddelde kern/cytopl. - gemiddeld # granula - gemiddelde $d_{granula}$ - gemiddeld # mitochondria - gemiddelde $d_{mitochondria}$	- 30 - 11602,63nm ± 2227,87 - 5028,28nm ± 1188,66 - 0,21nm ± 0,07 - 55,53/celprofiel ± 30,62 - 443nm ± 123 - 13,97/celprofiel ± 7,62 - 525,74nm ± 159,83	- 30 - 11194,78nm ± 1915,07 - 4635,68nm ± 803,32 - 0,18nm ± 0,06 - 69,77/celprofiel ± 21,57 - 444,69nm ± 132,22 - 13,03/celprofiel ± 6,74 - 522,11nm ± 162,87

d = diameter; cytopl. = cytoplasma; # = aantal. Elke gemiddelde waarde is aangevuld met $\pm$ SD. Voor alle morfometrische kenmerken werden voor beide celtypes dertig cellen ($n = 30$) gemeten. De diameters van de cellen, de kernen, de granula en de mitochondria werden automatisch (ITEM FEI software) bepaald op basis van de perimeter. Voor het bepalen van de gemiddelde diameter van de granula en mitochondria, werden per cel willekeurig vijf exemplaren van elke structuur gemeten. Dit werd gedaan voor alle dertig cellen van beide celtypes om zo tot één gemiddelde waarde per celtype te komen.

3.3.2 Types mastcellen in graad I/II MCTen na LM analyse

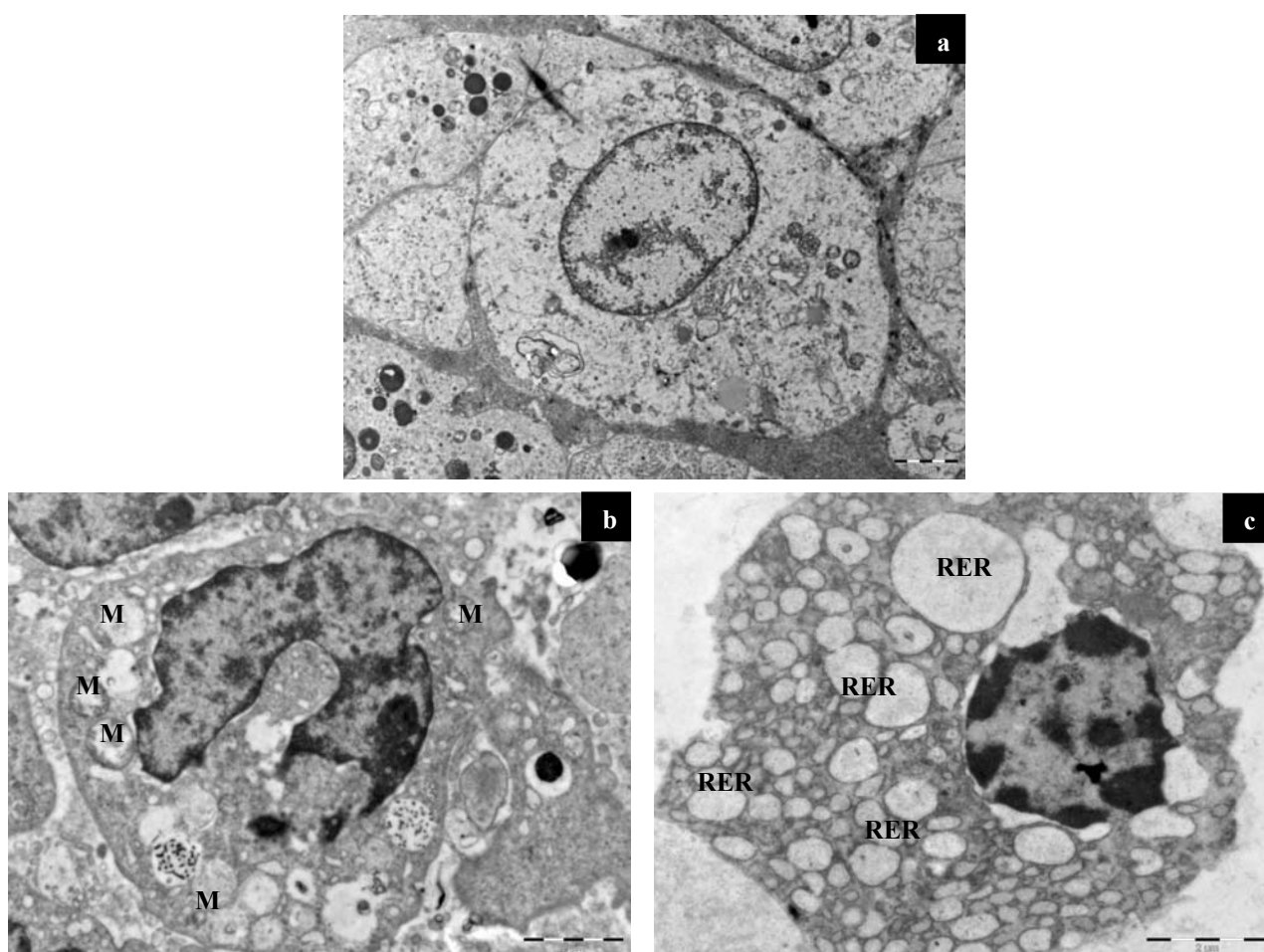
Na kleuring van de graad I (Figuur 11a) en II (Figuur 11b) tumorweefsels met de trichroomkleuring volgens Masson, kunnen eveneens twee types mastcellen onderscheiden worden. Een eerste type (1) vertoont een zeer rode kern met overduidelijke nucleoli. Het cytoplasma van deze cellen is eerder bleek. Het andere type (2) vertoont over het algemeen redelijk bleke kernen met minder duidelijke nucleoli. Ook het cytoplasma van deze cellen is eerder bleek (Figuur 11). Wat betreft de frequentie en het voorkomen is er in zowel graad I als graad II MCTen een mix aanwezig van beide celtypes, waarbij geen type overheerst. In graad III MCTen kunnen deze twee types niet waargenomen worden.



Figuur 11: Lichtmicroscopisch zijn twee types mastcellen onderscheidbaar in graad I en II tumoren. Deze figuren tonen twee types mastcellen aan in graad I (a) en graad II (b) MCTen. Een eerste (1) wordt gekenmerkt door een felrode kern met duidelijke nucleoli en een bleek cytoplasma. Een tweede wordt gekarakteriseerd door zowel een bleke kern als een bleek cytoplasma; de nucleoli zijn in dit type minder duidelijk aanwezig. Tussen de cellen bevindt zich veel oedeem (Oed), alsook een kleine hoeveelheid collageen (C). LM foto's afkomstig van tumor n° 3 (a, graad I) en n° 18 (b, graad II). Trichroomkleuring van Masson. Bar = 20µm (a + b). Vergroting = 100x (a + b).

3.3.3 Morfologie van graad III mastcellen

In tegenstelling tot mastcellen van graad I en graad II MCTen, die goed tot zeer goed gedifferentieerd zijn, vertonen mastcellen van graad III tumoren over het algemeen een zeer lage graad van differentiatie (**Figuur 12a**). Het cytoplasma van deze cellen bevat weinig verschillende organellen vergeleken met goed gedifferentieerde cellen. Wel opvallend is de aanwezigheid van grote hoeveelheden gedilateerd RER (**Figuur 12b**) en grote mitochondria (**Figuur 12c**). Daarnaast vertonen deze mastcellen heel bijzondere granula (zie paragraaf, 3.2.3) (**Figuur 12c**). Graad III mastcellen en hun kernen worden gekenmerkt door zeer uiteenlopende vormen, gaande van rond en ovaal tot zeer onregelmatig (**Figuur 12a-c**). De kern omvat duidelijke nucleoli en wordt meestal gekenmerkt door sterk gecondenseerd chromatine (**Figuren 12b + c**).



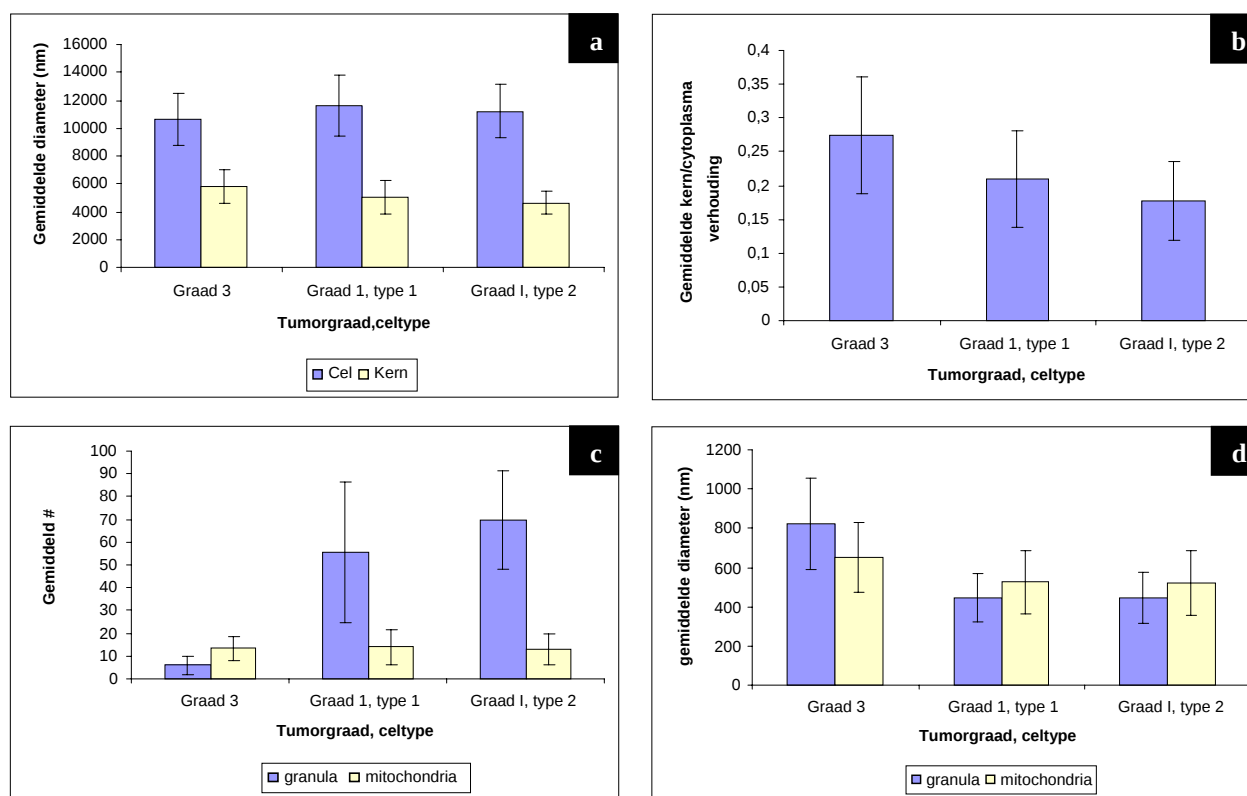
Figuur 12: Morfologie van graad III mastcellen. Graad III mastcellen zijn slecht gedifferentieerd (**a**) en vertonen grote hoeveelheden RER (**b**) en mitochondria (M) (**c**) in hun cytoplasma. Deze mastcellen en hun kernen zijn zeer pleomorf. EM foto's afkomstig van tumor n° 6 (graad III). Bar = 2µm. Vergroting: 5600x (a), 11000x (b), 8900x (c).

3.3.4 Morfometrie van mastcellen: graad I versus graad III

Naast morfologische verschillen, kunnen er ook een groot aantal morfometrische verschillen waargenomen worden tussen graad III mastcellen enerzijds en beide types graad I mastcellen anderzijds. Hiertoe werden voor dertig graad III mastcellen dezelfde parameters gemeten als deze die reeds gemeten werden bij beide types graad I mastcellen (Tabel 6).

Figuur 13 toont grafisch de resultaten van alle parameters voor zowel graad I als graad III mastcellen. Zo wordt er aangetoond dat er geen significant verschil is in de gemiddelde diameter van graad III mastcellen ($10635,34 \text{ nm} \pm 1832,12$) vergeleken met deze van beide types graad I mastcellen [$p(\text{graad 3 versus graad 1, type 1}) = 0,10$; $p(\text{graad 3 versus graad 1, type 2}) = 0,30$] (Figuur 13a). Wat betreft de gemiddelde kerndiameter wordt er wel een significant verschil bekomen tussen graad III mastcellen en beide types graad I mastcellen met een gemiddelde waarde voor graad III mastcelkernen van $5805,43 \text{ nm}$ ($\text{SD} \pm 1246,57$) [$p(\text{graad 3 versus graad 1, type 1}) = 0,03$; $p(\text{graad 3 versus graad 1, type 2}) < 0,005$] (Figuur 13a). Voor andere parameters werden eveneens significante verschillen aangetoond. Zo is de gemiddelde kern/cytoplasma verhouding significant groter voor graad III mastcellen vergeleken met beide types graad I mastcellen ($0,27 \pm 0,08$) [$p(\text{graad 3 versus graad 1, type 1}) = 0,01$; $p(\text{graad 3 versus graad 1, type 2}) < 0,005$] (Figuur 13b). Verder is het gemiddelde aantal granula in graad III mastcellen ($5,9 \pm 3,97$) significant kleiner dan in type 1 en type 2 graad I mastcellen [$p(\text{graad 3 versus graad 1, type 1}) < 0,005$; $p(\text{graad 3 versus graad 1, type 2}) < 0,005$] (Figuur 13c). Dit is niet het geval voor het gemiddelde aantal mitochondria, met gemiddelde waarden tussen 10-15/celprofiel voor alle groepen [$p(\text{graad 3 versus graad 1, type 1}) = 0,74$; $p(\text{graad 3 versus graad 1, type 2}) = 0,85$] (Figuur 13c). In tegenstelling tot het gemiddelde aantal granula dat kleiner is in graad III mastcellen dan in graad I mastcellen, is de gemiddelde diameter van deze graad III granula ($822,63 \text{ nm} \pm 232,02$) significant groter vergeleken met deze van beide types graad I mastcellen [$p(\text{graad 3 versus graad 1, type 1}) < 0,005$; $p(\text{graad 3 versus graad 1, type 2}) < 0,005$] (Figuur 13d). Ten slotte toont figuur 13d eveneens aan dat de gemiddelde diameter van de mitochondria in graad III mastcellen ($652,03 \text{ nm} \pm 178,42$) significant groter is vergeleken met type 1 en type 2 graad I mastcellen [$p(\text{graad 3 versus graad 1, type 1}) < 0,005$; $p(\text{graad 3 versus graad 1, type 2}) < 0,005$].

De gemiddelde waarden van beide types graad I mastcellen staan weergegeven in tabel 6 en worden hier niet meer vermeld.



Figuur 13: Morfometrische vergelijking van graad III mastcellen met type 1 en type 2 graad I mastcellen.

De morfometrische kenmerken werden net zoals bij beide types graad I mastcellen gemeten voor dertig cellen ($n = 30$). De diameters van de cellen, de kernen, de granula en de mitochondria werden automatisch (ITEM FEI software) bepaald op basis van de perimeter. Voor het bepalen van de gemiddelde diameter van de granula en mitochondria, werden per cel willekeurig vijf exemplaren van elke structuur gemeten. Dit werd gedaan voor alle dertig cellen van beide celtypes om zo tot één gemiddelde waarde per celtype te komen. Figuur c toont het gemiddelde aantal granula en mitochondria per celprofiel.

P-waarden voor de gemiddelde celdiameter: $p(I, \text{type 1 vs I, type 2}) = 0,45$; $p(III \text{ vs I, type 1}) = 0,10$ en $p(III \text{ vs I, type 2}) = 0,30$.

P-waarden voor de gemiddelde kerndiameter: $p(I, \text{type 1 vs I, type 2}) = 0,14$; $p(III \text{ vs I, type 1}) = 0,03$ en $p(III \text{ vs I, type 2}) < 0,005$.

P-waarden voor de gemiddelde kern/cytoplasma: $p(I, \text{type 1 vs I, type 2}) = 0,07$; $p(III \text{ vs I, type 1}) = 0,01$ en $p(III \text{ vs I, type 2}) < 0,005$.

P-waarden voor het gemiddelde # granula: $p(I, \text{type 1 vs I, type 2}) = 0,04$; $p(III \text{ vs I, type 1}) < 0,005$ en $p(III \text{ vs I, type 2}) < 0,005$.

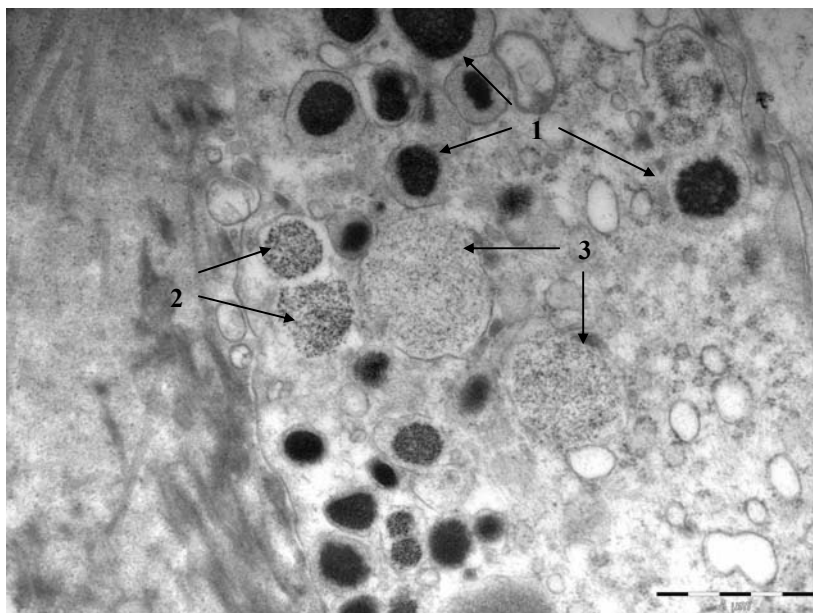
P-waarden voor het gemiddelde # mitochondria: $p(I, \text{type 1 vs I, type 2}) = 0,62$; $p(III \text{ vs I, type 1}) = 0,74$ en $p(III \text{ vs I, type 2}) = 0,85$.

P-waarden voor de gemiddelde d_{granula} : $p(I, \text{type 1 vs I, type 2}) = 0,91$; $p(III \text{ vs I, type 1}) < 0,005$ en $p(III \text{ vs I, type 2}) < 0,005$.

P-waarden voor de gemiddelde $d_{\text{mitochondria}}$: $p(I, \text{type 1 vs I, type 2}) = 0,85$; $p(III \text{ vs I, type 1}) < 0,005$ en $p(III \text{ vs I, type 2}) < 0,005$.

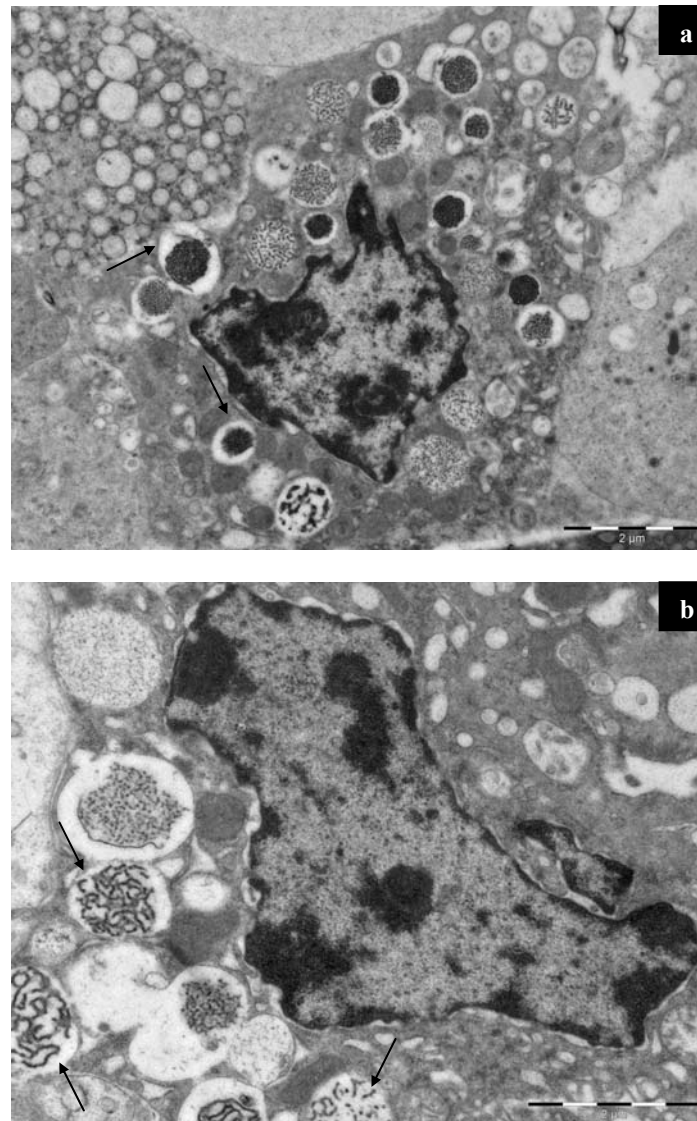
3.3.5 Granula morfologie in graad I en III MCTen

Ultrastructureel worden graad I MCTen gekenmerkt door drie types granula die allen voorzien zijn van een begrenzend membraan. Een eerste type (1) bestaat uit een zeer dense matrix die omgeven is door een perifere halo. Een tweede type (2) wordt gekenmerkt door een granulaire matrix die een veel lagere elektronendensiteit vertoont vergeleken met de matrix van type 1 granula. Ook de matrix van dit granula type wordt omgeven door een lichte perifere band. Ten slotte zijn er nog de super granula (3), die veel groter zijn dan type 1 en type 2 granula. Ultrastructureel bestaat de matrix van deze super granula uit een granulaire substantie, gelijkend op deze van type 2 granula. Dit type wordt eveneens gekenmerkt door een perifere halo, hoewel deze veel minder duidelijk observeerbaar is vergeleken met type 1 en type 2 granula (**Figuur 14**).



Figuur 14: Morfologie van de drie types granula in graad I MCTen. Graad I MCTen worden gekenmerkt door de aanwezigheid van drie types membraangebonden granula: 1) granula met een elektronendense matrix en een uitgesproken perifere halo, 2) granula met een granulaire matrix en een uitgesproken perifere halo, 3) super granula met een granulaire matrix en een minder duidelijke halo. EM afbeelding afkomstig van tumor n° 24 (graad I). Bar = 2µm . Vergroting: 22000x.

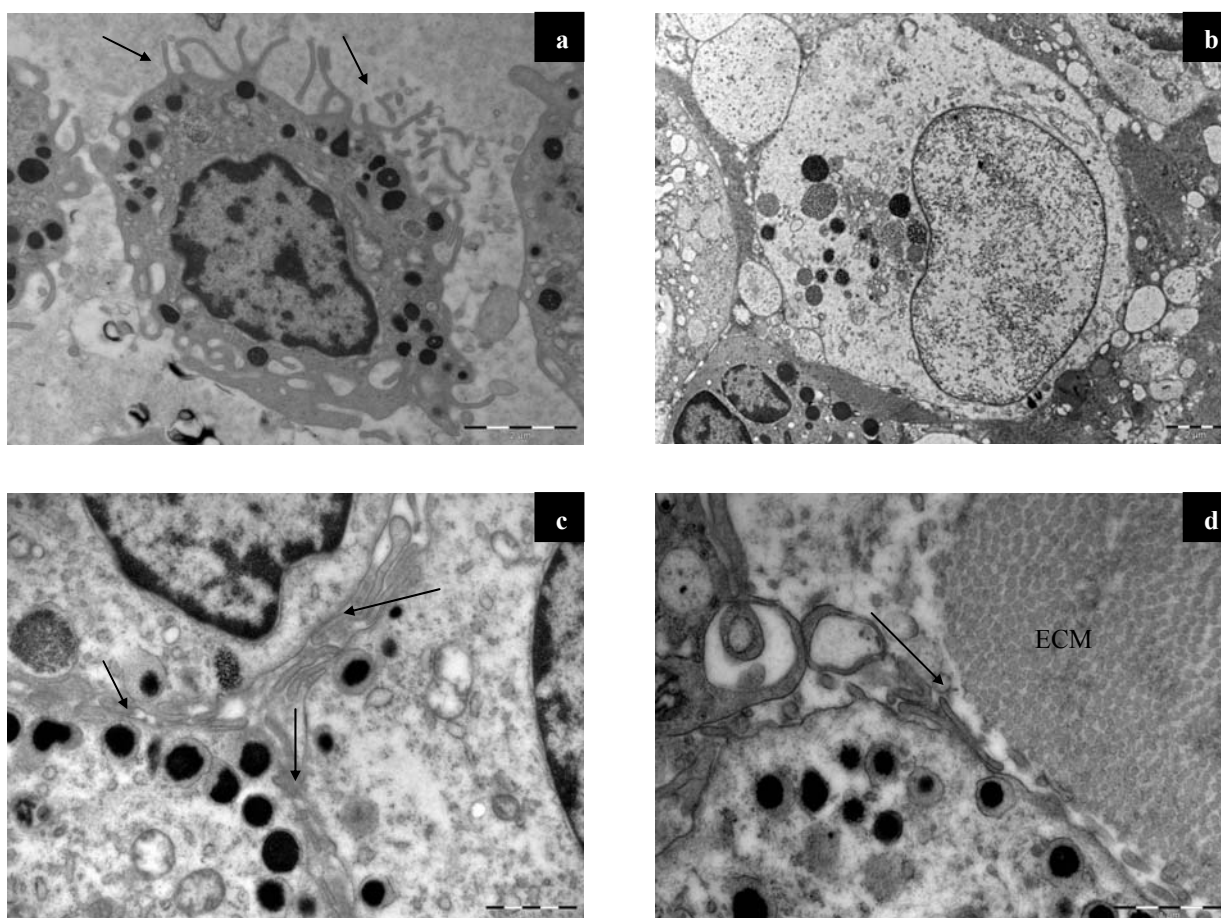
Mastcellen van graad III MCTen vertonen eveneens deze drie types granula. Een verschil echter is de aanwezigheid van een veel grotere en meer heldere, perifere halo rond de matrix van deze granula (**Figuur 15a**). Naast deze drie types bevatten graad III mastcellen ook granula met een zeer bijzondere morfologie. Deze granula worden gekenmerkt door de aanwezigheid van draadvormige patronen in hun matrix (**Figuur 15b**).



Figuur 15: Morfologie van granula in graad III MCTen. De drie algemene types granula, zoals beschreven voor graad I MCTen, zijn ook aanwezig in graad III MCTen, maar worden hier gekenmerkt door een grotere en meer heldere perifere halo (**a**). Daarnaast bevatten graad III mastcellen ook granula met een bijzonder morfologie waarbij draadvormige patronen geobserveerd worden in de matrix (**b**). EM afbeeldingen afkomstig van tumor n° 6 (graad III). Bar = 2µm. Vergroting: 11000x (a), 14000 (b).

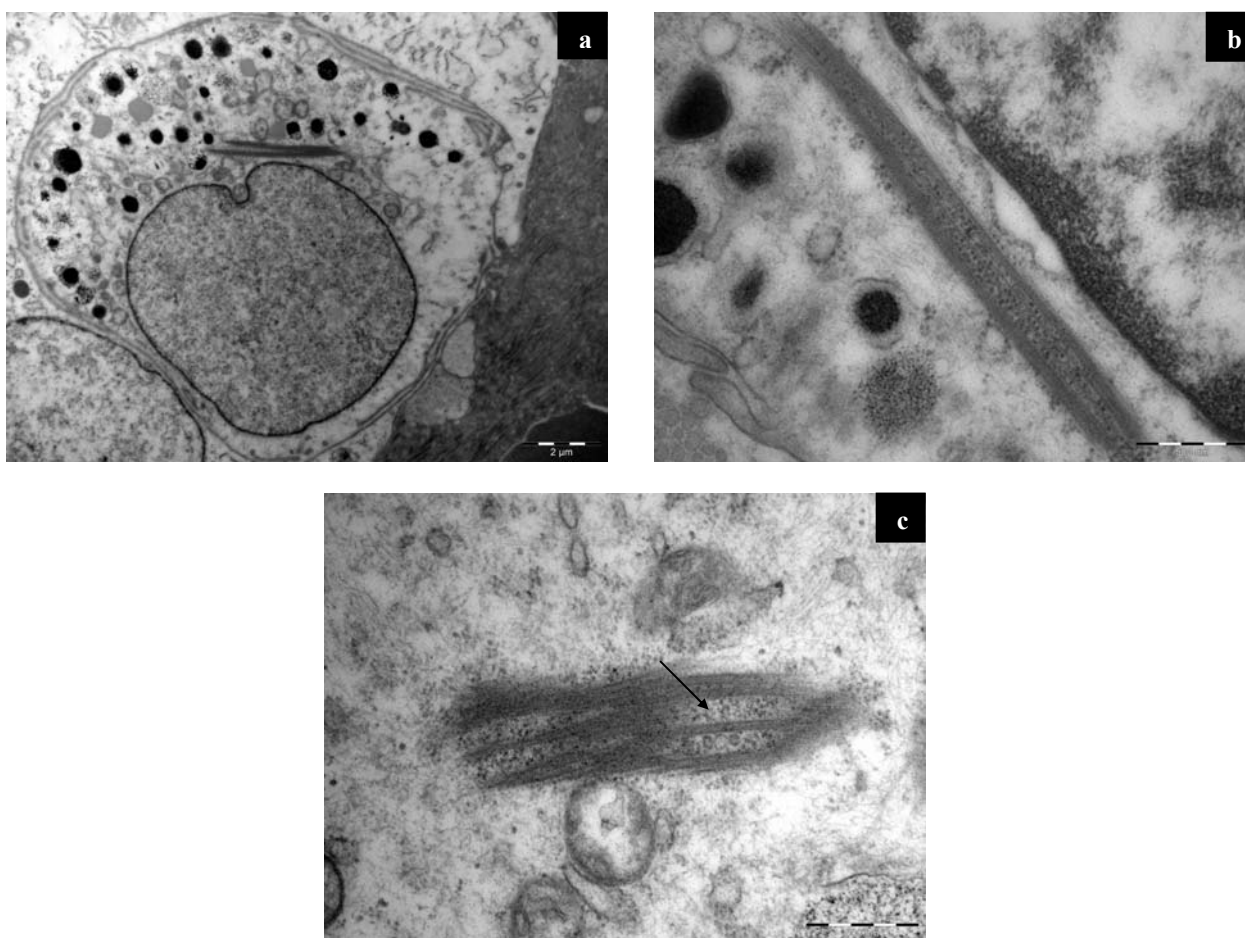
3.3.6 Bijzondere waarnemingen in neoplastische mastcellen

Net zoals normale mastcellen die aanwezig zijn in de huid, vertonen mastcellen afkomstig van MCTen een onregelmatig celoppervlak dat gekenmerkt wordt door talrijke uitstulpingen van het cytoplasma. Deze cytoplasmatische projecties ter hoogte van het cellulaire oppervlak zijn voornamelijk aanwezig in mastcellen van graad I MCTen (**Figuur 16a**). In graad III mastcellen zijn deze uitstulpingen veel minder uitgesproken (**Figuur 16b**). Met behulp van deze projecties maken de mastcellen contact met andere mastcellen (**Figuur 16c**) of met de extracellulaire matrix (ECM) (**Figuur 16d**).



Figuur 16: Cytoplasmatische projecties ter hoogte van het celoppervlak maken interacties mogelijk met andere mastcellen of ECM componenten. Graad I mastcellen (**a**), en in mindere mate graad III mastcellen (**b**), vertonen projecties van het cytoplasma ter hoogte van hun oppervlak die interacties mogelijk maken met andere mastcellen (**c**), alsook met de ECM (**d**), hier bestaande uit collageenvezels in dwarsdoorsnede. EM afbeeldingen afkomstig van tumor n° 28 (a, c en d; graad I) en n° 6 (b, graad III). Bar = 2µm (a,b), 1µm (c,d). Vergroting: 11000x (a), 5600x (b), 18000x (c), 22000x (d).

Een andere bijzondere waarneming is de aanwezigheid van microfilamenten in het cytoplasma van sommige neoplastische mastcellen. Ook dit verschijnsel wordt voornamelijk waargenomen in graad I mastcellen en is minder uitgesproken in mastcellen afkomstig van graad III MCTen. Deze microfilamenten vormen bundels en bevinden zich gewoonlijk in de nabijheid van de kern, vaak parallel ten opzichte van de plasmamembraan (**Figuur 17a**). Toch zijn deze microfilamenten niet in één enkel vlak gelegen. Vaak zijn er verschillende bundels aanwezig die in verschillende richtingen georiënteerd zijn. Zo tonen figuur 18b en c bundels aan die loodrecht op elkaar gepositioneerd zijn. Meestal komen deze bundels microfilamenten alleen voor (**Figuur 17b**), maar soms worden ze ook waargenomen in combinatie met tubuli (**Figuur 17c**).

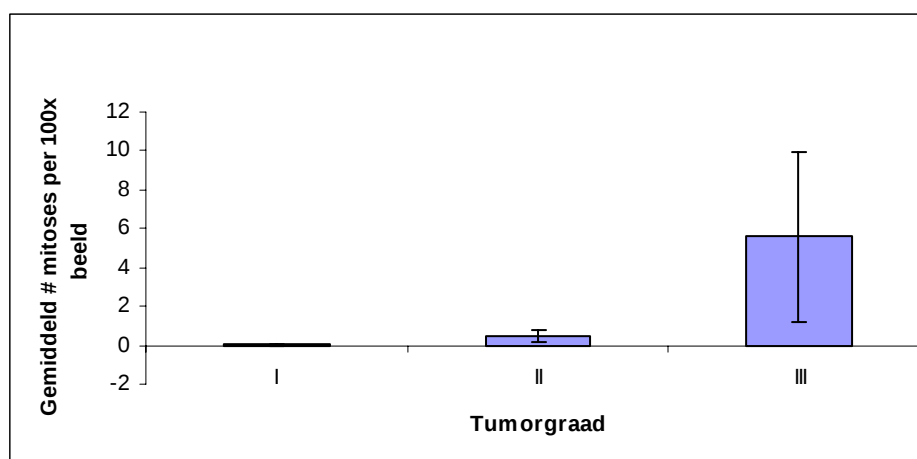


Figuur 17: Sommige neoplastische mastcellen vertonen microfilamenten in hun cytoplasma. In sommige graad I mastcellen (en in mindere mate graad III mastcellen) zijn bundels microfilamenten aanwezig in de nabijheid van de kern (**a**). Deze bundels zijn in verschillende richtingen georiënteerd en komen alleen voor (**b**) of in combinatie met tubuli, die hier aanwezig zijn in dwarsdoorsnede, loodrecht op de bundel microfilamenten (pijl) (**c**). EM afbeeldingen afkomstig van tumor n° 8 (a, graad I) en n° 28 (b+c, graad I). Bar = 2μm (a), 500nm (b+c). Vergroting: 7100x (a), 44000x (b+c).

3.4 Proliferatie binnen MCTen: Ki67 versus MCM7

Om de mate van proliferatie binnen de verschillende MCT graden na te gaan, werden enerzijds de mitose figuren binnen iedere tumor (zes tumoren per tumorgraad; Tabel 4) geteld (Figuur 18) en anderzijds de proliferatiemarkers Ki67 en MCM7 in elk van deze MCTen gedetecteerd door middel van IHC (Figuur 19+20).

Figuur 18 toont de resultaten van de mitose telling. Hieruit blijkt dat het gemiddelde aantal mitoses significant toeneemt met stijgende tumorgraad [$p(\text{graad I versus graad II}) = 0,01$; $p(\text{graad II versus graad III}) = 0,03$ en $p(\text{graad I versus graad III}) = 0,03$]. Gemiddelde waarden zijn 0,03 (SD $\pm$ 0,05), 0,48 (SD $\pm$ 0,27) en 5,58 (SD $\pm$ 4,36) voor respectievelijk graad I, II en III MCTen (Figuur 18).



Figuur 18: Vergelijking van het gemiddelde aantal mitoses per 100x vergroting tussen de verschillende tumorgraden. Per tumorgraad werden zes tumoren geanalyseerd door het tellen van het aantal mitoses per 100x vergroting ($n = 10/\text{tumor}$).

P-waarden voor het gemiddeld # mitoses per 100x vergroting: $p(\text{I-II}) = 0,01$; $p(\text{II-III}) = 0,03$ en $p(\text{I-III}) = 0,03$.

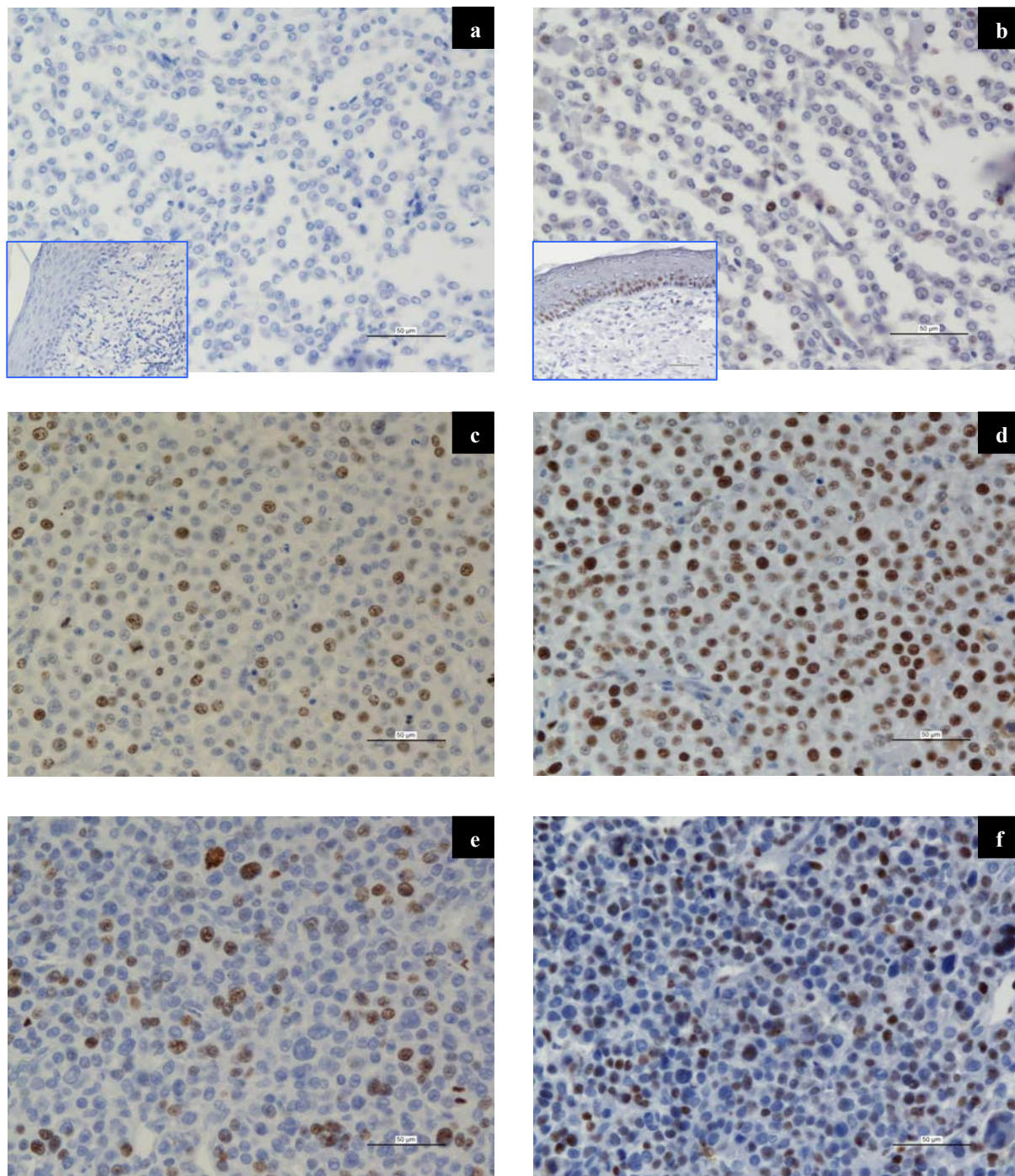
Figuren 19 en 20 tonen de IHC resultaten waarbij enerzijds de expressie van de proliferatiemarkers Ki67 en MCM7 binnen de verschillende tumorgraden wordt nagegaan en anderzijds de vergelijking wordt gemaakt tussen Ki67 en MCM7 betreffende hun mogelijkheid om proliferatie aan te tonen binnen de MCTen.

Een zuiver visuele observatie van de immunoreactiviteit voor Ki67 en MCM7 binnen de verschillende MCT graden levert volgende resultaten op (**Figuur 19**).

Figuren 19a en 19b tonen IHC resultaten voor respectievelijk Ki67 en MCM7 in één van de graad I MCTen. Deze figuren tonen aan dat er geen Ki67 expressie is (**Figuur 19a**), terwijl de nucleï van sommige cellen binnen deze graad I tumor wel positief zijn voor MCM7 (**Figuur 19b**). Als interne positieve controle werd het epitheel onderzocht naar immunoreactiviteit ter hoogte van de epitheelcellen in de basale lamina. Deze bleek afwezig te zijn voor Ki67 (**Figuur 19a, inset**), maar aanwezig voor MCM7 (**Figuur 19b, inset**). In totaal werd er voor drie van de zes graad I MCTen geen expressie van Ki67 waargenomen. In elk geval van afwezige Ki67 immunoreactiviteit, was de interne positieve controle eveneens negatief. Alle graad I MCTen waren positief voor MCM7 (**Resultaten niet weergegeven**).

De Ki67 en MCM7 IHC kleuringen van één van de graad II MCTen worden weergegeven door respectievelijk figuren 19c en 19d. Voor beide markers is hier sprake van immunoreactiviteit. Toch is deze reactiviteit meer uitgesproken voor MCM7 (**Figuur 19d**) dan voor Ki67 (**Figuur 19c**). Analyse van de interne positieve controle toonde voor beide proliferatiemarkers een gelijkaardig positief signaal aan (**Resultaten niet weergegeven**). Alle graad II MCTen vertoonden expressie van beide proliferatiemarkers (MCM7 > Ki67) (**Resultaten niet weergegeven**).

Figuren 19e en 19f tonen ten slotte respectievelijk de Ki67 en MCM7 IHC resultaten in één van de graad III MCTen. Deze graad III MCT is positief voor zowel Ki67 als voor MCM7, hoewel de immunoreactiviteit voor MCM7 (**Figuur 19e**) meer uitgesproken is dan deze voor Ki67 (**Figuur 19f**). Ook hier leverden beide proliferatiemarkers een positief resultaat op betreffende de interne positieve controles (**Resultaten niet weergegeven**). Deze waarnemingen konden geobserveerd worden in alle graad III tumoren (**Resultaten niet weergegeven**).



Figuur 19: Visuele vergelijking van Ki67 en MCM7 immunoreactiviteit binnen de verschillende MCT graden. Graad I (a, Ki67 + b, MCM7), II (c, Ki67 + d, MCM7) en III (e, Ki67 + f, MCM7) MCTen zijn weergegeven. De immunoreactiviteit/expressie is zichtbaar door de bruinkleuring, afkomstig van DAB. De insets in figuren a en b tonen de expressie binnen de interne positieve controle. LM afbeeldingen afkomstig van tumor n° 23 (a+b, graad I), n° 39 (c+d, graad II) en n° 35 (e+f, graad III). Bar = 50µm. Vergroting: 40x.

Om een statistisch correcte uitspraak te kunnen doen over de expressie van beide proliferatiemarkers in de MCTen, wordt er op objectieve wijze een maat geplakt op de immunoreactiviteit. Dit wordt gedaan op twee verschillende manieren: het bepalen van het

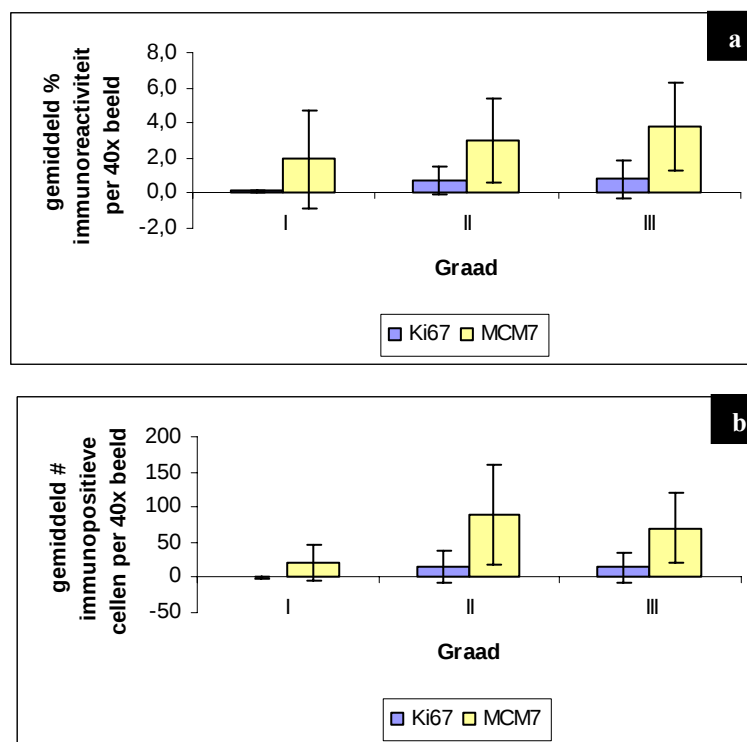
gemiddelde percentage immunoreactiviteit per tumorgebied met behulp van gespecialiseerde software (**Figuur 20a**) en het bepalen van het gemiddelde aantal positieve cellen per tumorgebied (**Figuur 20b**).

Wanneer de eerste methode beschouwd wordt, is er een duidelijke trend zichtbaar waarbij zowel de Ki67 immunoreactiviteit als de MCM7 immunoreactiviteit toeneemt met toenemende tumorgraad (**Figuur 20a**). De gemiddelde percentages immunoreactiviteit voor Ki67 zijn 0,15 (SD $\pm$ 0,06), 0,71 (SD $\pm$ 0,83) en 0,80 (SD $\pm$ 1,07) voor respectievelijk graad I, II en III MCTen. Wat betreft MCM7, zijn deze gemiddelde waarden respectievelijk 1,92 (SD $\pm$ 2,76), 2,96 (SD $\pm$ 2,38) en 3,82 (SD $\pm$ 2,48). De toename in het percentage immunoreactiviteit met toenemende tumorgraad is echter niet significant, noch voor Ki67 [p(graad I versus graad II) = 0,16; p(graad II versus graad III) = 0,89 en p(graad I versus graad III) = 0,20] noch voor MCM7 [p(graad I versus graad II) = 0,50; p(graad II versus graad III) = 0,55 en p(graad I versus graad III) = 0,24]. Wanneer de tweede methode beschouwd wordt, is er voor zowel Ki67 als voor MCM7 eveneens een stijgende tendens zichtbaar. Deze stijgende trend is echter enkel aanwezig ter hoogte van de overgang van graad I naar graad II en van graad I naar graad III, waarbij een duidelijke toename zichtbaar is in het gemiddelde aantal positieve mastcellen per tumorgebied (**Figuur 20b**). Ondanks de aanwezigheid van een duidelijke trend, is er geen sprake van een significante toename [Ki67: p(graad I versus graad II) = 0,21 en p(graad I versus graad III) = 0,19; MCM7: p(graad I versus graad II) = 0,07 en p(graad I versus graad III) = 0,07]. Bij de overgang van graad II naar graad III, is er eerder een gelijkblijvende of dalende trend waarneembaar (**Figuur 20b**). Het verschil in het gemiddelde aantal positieve mastcellen tussen graad II en graad III MCTen is niet significant, noch voor Ki67 [p(graad II versus graad III) = 0,99] noch voor MCM7 [p(graad II versus graad III) = 0,99]. Gemiddelde waarden betreffende het aantal positieve mastcellen per 40x vergroting voor respectievelijk graad I, II en III MCTen zijn 0,97 (SD $\pm$ 1,28), 17,5 (SD $\pm$ 22,75) en 14,47 (SD $\pm$ 21,56) wat betreft Ki67 en 21,17 (SD $\pm$ 26,14), 89,23 (SD $\pm$ 71,02) en 70,5 (SD $\pm$ 50,01) wat betreft MCM7.

Tot zover een vergelijking van beide proliferatiemarkers tussen de verschillende tumorgraden. Een volgende stap is het vergelijken van Ki67 en MCM7 in hun potentie als markers voor proliferatie in de verschillende tumorgraden. Gemiddelde waarden van het percentage immunoreactiviteit (methode 1) en van het aantal positieve cellen (methode 2) zijn reeds vermeld en worden hierna niet meer aangegeven.

Wanneer de eerste methode beschouwd wordt, is het gemiddelde percentage immunoreactiviteit voor MCM7 hoger dan voor Ki67. Dit is echter enkel significant voor graad III MCTen [$p(\text{Ki67 versus MCM7}) = 0,03$]. In graad I en II MCTen is dit slechts een trend die niet als significant beschouwd kan worden [$p(\text{Ki67 versus MCM7, graad I}) = 0,18$ en $p(\text{Ki67 versus MCM7, graad II}) = 0,07$] (**Figuur 20a**).

Na het toepassen van de tweede methode kan eveneens waargenomen worden dat het gemiddelde aantal positieve mastcellen groter is na MCM7 IHC dan na Ki67 IHC. Dit is enkel significant voor graad II en III MCTen [$p(\text{Ki67 versus MCM7, graad II}) = 0,04$ en $p(\text{Ki67 versus MCM7, graad III}) = 0,05$]. In graad I MCTen is dit verschil niet significant [$p(\text{Ki67 versus MCM7}) = 0,12$] (**Figuur 20b**).



Figuur 20: Kwantificering van de Ki67 en MCM7 immunopositiviteit in de verschillende tumorgraden. Per tumorgraad werden zes tumoren beschouwd. Per tumor werden vijf beelden gemaakt op 40x vergroting in het tumorgebied met de grootste immunopositiviteit. Vervolgens werd op ieder beeld het percentage immunoreactiviteit en het aantal immunopositieve cellen bepaald, waarna gemiddelde waarden per tumorgraad berekend werden.

P-waarden voor het gemiddeld % immunoreactiviteit voor Ki67: $p(\text{I-II}) = 0,16$; $p(\text{II-III}) = 0,89$ en $p(\text{I-III}) = 0,20$.

P-waarden voor het gemiddeld % immunoreactiviteit voor MCM7: $p(\text{I-II}) = 0,50$; $p(\text{II-III}) = 0,55$ en $p(\text{I-III}) = 0,24$.

P-waarden voor het gemiddeld # positieve cellen voor Ki67: $p(\text{I-II}) = 0,21$; $p(\text{II-III}) = 0,99$ en $p(\text{I-III}) = 0,19$.

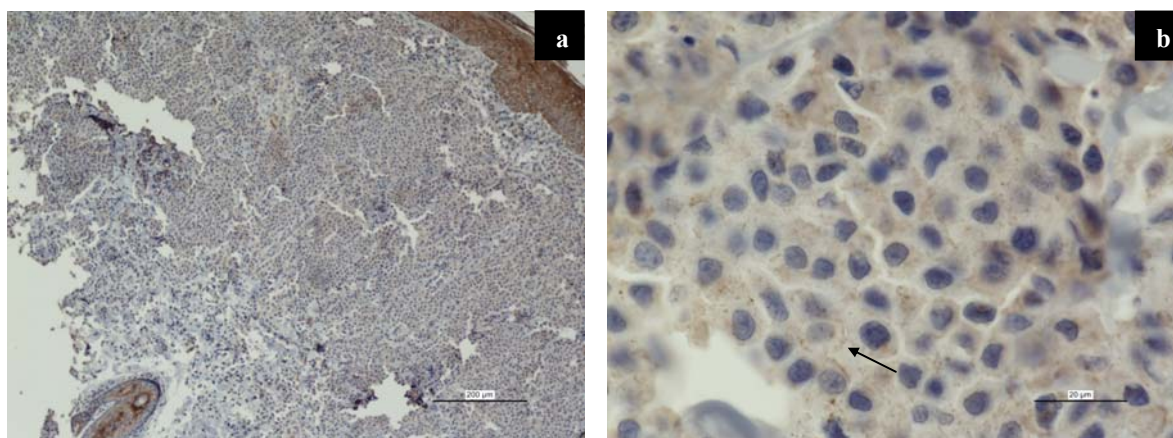
P-waarden voor het gemiddeld # positieve cellen voor MCM7: $p(\text{I-II}) = 0,07$; $p(\text{II-III}) = 0,99$ en $p(\text{I-III}) = 0,07$.

P-waarden voor het gemiddeld % immunoreactiviteit voor Ki67 vs MCM7 in de 3 graden: $p(\text{I}) = 0,18$; $p(\text{II}) = 0,07$ en $p(\text{III}) = 0,03$.

P-waarden voor het gemiddeld # positieve cellen voor Ki67 vs MCM7 in de 3 graden: $p(\text{I}) = 0,12$; $p(\text{II}) = 0,04$ en $p(\text{III}) = 0,04$.

3.5 c-KIT expressie in neoplastische mastcellen

Om een idee te krijgen van het expressiepatroon van c-KIT in MCTen, werd een beperkte willekeurige subset van MCTen (tumor n° 28 [graad I], 35 [graad III] en 40 [graad II]; **Tabel 4**) behandeld voor IHC analyse (c-KIT) met als doel het bepalen van de locatie van dit eiwit binnen de tumoren. Figuur 21 toont de resultaten van deze immunokleuring voor c-KIT in de graad I MCT. De resultaten van de andere tumoren zijn hiermee vergelijkbaar. Een eerste duidelijke waarneming is het positief aankleuren van de epitheelcellaag, alsook de aanwezigheid van enige immunoreactiviteit in de tumor (**Figuur 21a**). Een sterkere vergroting bevestigt dat de meeste tumorcellen inderdaad positief zijn voor c-KIT (**Figuur 21b**). Deze immunoreactiviteit is voornamelijk gesitueerd in het cytoplasma, hoewel sommige cellen ook positief zijn ter hoogte van de cytoplasmamembraan. Het expressiepatroon van c-KIT in het cytoplasma is niet focaal, maar eerder verspreid (**Figuur 21b**).



Figuur 21: C-KIT expressie in MCTen. De epitheelcellaag toont een zeer sterke immunoreactiviteit voor c-KIT. Daarnaast is c-KIT ook aanwezig in het tumorgebied (**a**). De expressie van c-KIT is voornamelijk gelokaliseerd ter hoogte van het cytoplasma (verspreid patroon) van de mastcellen hoewel sommige mastcellen c-KIT ook tot expressie brengen op hun plasmamembraan (pijl) (**b**). LM foto's afkomstig van tumor n° 28 (graad I). Bar = 200µm (a), 20µm (b). Vergroting: 10x (a), 100x (b).

4 Discussie

In dit onderzoek werden een aantal aspecten van canine MCTen beschouwd, die mogelijk een prognostische waarde hebben wat betreft deze pathologie. Het is immers geweten dat deze tumoren een zeer variabel biologisch gedrag vertonen, wat het maken van een correcte prognose en bijgevolg het kiezen van de juiste therapeutische interventie vaak bemoeilijkt [6]. Het doel van deze studie was het karakteriseren van een aantal klinische, lichtmicroscopische, elektronenmicroscopische en immunohistochemische eigenschappen van MCTen en vervolgens het linken van deze eigenschappen aan de tumorgraad. Enerzijds is het linken aan de tumorgraad relevant, aangezien studies reeds hebben aangetoond dat de histologische graad van MCTen significant geassocieerd is met de prognose [28,29]. Anderzijds heeft de histologische gradering van MCTen enkele onoverkomelijke beperkingen. Zo vormen graad II MCTen een zeer heterogene groep, waarin de tumoren zowel een goedaardig als een kwaadaardig klinisch verloop kunnen vertonen [40]. Een bijkomend probleem is de zeer grote inter-patholoog variatie wat betreft het graderen van MCTen, ondanks de beschikbaarheid van een universeel aanvaard graderingssysteem (Patnaik) [33]. De resultaten zouden bijgevolg een grotere prognostische waarde hebben indien de geobserveerde eigenschappen gekoppeld zouden worden aan de klinische uitkomst van de dieren in plaats van aan de tumorgraad. Dit vereist echter de kennis van klinische follow-up informatie van een groot aantal stalen, wat in onze studie niet het geval was. Bovendien kwam het grootste deel van onze stalen, waarvoor deze klinische follow-up informatie beschikbaar is, pas laattijdig in ons bezit. Aangezien de tumorgraad wel van ieder staal gekend is, werd er besloten om de resultaten hieraan te koppelen. De reële prognostische waarde is in dit geval minder, maar zeker niet onbestaande. Dit onderzoek zal bijgevolg indicaties geven betreffende verder onderzoek naar mogelijke prognostische parameters in een stalenpopulatie met uitgebreide klinische follow-up informatie.

Een eerste deel van de studie omvatte de karakterisering van enkele klinische parameters in de beschikbare stalen. Wat betreft het ras, zijn de Retrievers (Labrador Retrievers en Golden Retrievers) het meest vertegenwoordigd in onze stalenpopulatie. Dit ras komt niet voor in het lijstje van Ogilvie et al (2007), waarop de rassen staan die een vier- tot achtmaal hogere kans hebben op de ontwikkeling van MCTen vergeleken met de algemene populatie. Andere rassen die wel op dat lijstje teruggevonden kunnen worden, zoals mopshonden, boxers en terriërs, komen in onze populatie weinig of niet voor [5]. Dit valt te verklaren door de kleine

beschikbare stalenpopulatie, waardoor deze niet representatief is voor de totale populatie honden met MCTen. Deze uitleg geldt eveneens voor de andere parameters die niet overeenkomen met de bevindingen in grotere studies. Zo bedraagt het percentage graad I, II en III MCTen in deze studie respectievelijk 68%, 16% en 16%, hetgeen sterk afwijkt van de percentages die Patnaik et al (1984) beschreven in hun studie (37%, 42% en 20% voor respectievelijk graad I, II en III MCTen) [29]. Een andere mogelijke verklaring is de grote inter-patholoog variatie wat betreft het graderen van MCTen, aangezien onze stalen slechts door één patholoog gegradeerd werden. Een beter alternatief zou zijn om de gradering door meerdere pathologen te laten uitvoeren, om vervolgens na te gaan in hoeverre er onderling akkoord is in de toegekende gradering. Op deze manier zou er minder twijfel zijn betreffende de objectiviteit van de toegekende tumorgraden. Het zeer grote percentage graad I tumoren, vastgesteld door onze patholoog, kan verklaard worden door het toekennen van een lage graad aan MCTen met subcutane infiltratie, alsook aan tumoren die gekenmerkt worden door mitose figuren [33].

De anatomische locaties waar de MCTen van onze stalenpopulatie het meeste voorkomen, zijn de achterpoot (31%), de flank (15,6%), de voorpoot (12,5%) en de thorax (12,5%). Dit komt niet volledig overeen met de bevindingen van Tams et al (1981). Deze groep beschreef de thorax en de buikregio als de meest voorkomende locaties (50%), gevolgd door de extremiteiten (50%) en de hoofd/nek regio (10%) [41].

Wanneer de overlevingstijd beschouwd wordt, kan er vastgesteld worden dat deze afhankelijk is van de tumorgraad. Zo bedraagt de gemiddelde overlevingstijd voor graad I, II en III MCTen respectievelijk 18 maanden, 6 maanden en 0 maanden. Ook deze waarden komen niet helemaal overeen met de bevindingen uit een studie van Bostock et al (1973). Zij rapporteerden gemiddelde overlevingstijden van 357 dagen (± 12 maanden), 196 dagen ($\pm 6,5$ maanden) en 126 dagen (± 4 maanden) voor respectievelijk graad I, II en III MCTen [28]. Deze afwijkende bevindingen kunnen eveneens verklaard worden door de kleine stalenpopulatie. Een andere mogelijke verklaring zijn de therapeutische interventies. De MCTen in de studie van Bostock et al (1973) werden uitsluitend behandeld door middel van operatieve ingrepen [28]. In onze populatie daarentegen werd de operatieve interventie in sommige gevallen gecombineerd met hormonale therapie (*prednisolone*) en/of chemotherapie (*vinblastine*), wat een invloed kan hebben op de klinische uitkomst en dus op de overlevingstijd van de dieren.

De gemiddelde leeftijd van de dieren met MCTen bedraagt acht en een half jaar, wat min of meer overeenkomt met de gemiddelde leeftijd van negen jaar die door de meeste studies

vastgesteld wordt [5,29]. Wanneer enkel de overleden dieren beschouwd worden, dan kan er vastgesteld worden dat de gemiddelde leeftijd toeneemt tot elf jaar. Dit geeft een indicatie dat oudere dieren een slechtere prognose hebben na het diagnosticeren van een MCT. Deze bevindingen komen min of meer overeen met de studieresultaten van Sfiligoi et al (2005), waaruit blijkt dat leeftijd een prognostische waarde heeft. Zij toonden in hun studie immers aan dat honden ouder dan 8 jaar, na behandeling, een bijna driemaal hogere kans hebben op overlijden aan de gevolgen van hun ziekte [42].

In onze stalenpopulatie onderging één dier euthanasie op de operatietafel. In dit geval was het laten inslapen van het dier een beslissing van de dierenarts als gevolg van MCT complicaties. Euthanasie op verzoek van de eigenaar kan echter de beoordeling en het onderzoek bemoeilijken. Het is op dat moment immers een subjectieve inschatting of het dier wordt ingeslapen omwille van de MCT klachten of om een andere reden, bijvoorbeeld het niet bereid zijn om een operatie te financieren.

Na de karakterisatie van de belangrijkste klinische parameters, werden de tumoren op microscopisch niveau verder geanalyseerd. Een eerste bevinding hierbij was de aanwezigheid van zowel cellulaire (mastcellen, eosinofielen, fibroblasten, enz...) als non-cellulaire componenten (collageen en bloedvaten) in het tumorweefsel. Zowel LM als EM analyses tonen zeer duidelijke nucleoli aan in de meeste neoplastische mastcellen, zowel in graad I en II als in graad III MCTen. Dit is in tegenspraak met de LM bevindingen van Patnaik et al (1984), die enkel nucleoli aantoonde in de mastcellen van graad III tumoren, maar niet in deze van goed (graad I) en intermediair (graad II) gedifferentieerde MCTen [29]. Onze bevindingen bevestigen daartegenover wel de EM resultaten van Madewell et al (1984) en Nishizumi et al (2000), die wel nucleoli aantoonde in het grootste deel van de neoplastische mastcellen [25,43]. Deze variërende bevindingen kunnen verklaard worden door het feit dat nucleoli over het algemeen elektronenmicroscopisch beter en duidelijker waarneembaar zijn dan lichtmicroscopisch.

Verder werd er lichtmicroscopisch waargenomen dat de mastcellen in graad I MCTen zeer monomorf zijn vergeleken met de uitgesproken pleomorfismen in de niet of slecht gedifferentieerde graad III tumoren. Dit is een bevestiging van de studieresultaten van Patnaik et al (1984). Zij vonden eveneens ronde, monomorfe graad I mastcellen, gematigd pleomorfe graad II mastcellen en zeer pleomorfe graad III mastcellen [29]. Bloom et al (1956) daarentegen vonden geen pleomorfe mastcellen in hun MCT stalenpopulatie [44]. Deze groep bestudeerde echter slechts drie MCT casussen met onbekende graad. Het is dus mogelijk dat

het hier ging om drie graad I tumoren, wat de afwezigheid van de pleomorfe mastcellen zou verklaren. Naast de morfologische verschillen werden er ook verschillen betreffende het aantal mastcellen gedetecteerd tussen de verschillende tumorgraden. Hierbij is een stijgende trend zichtbaar, waarbij het aantal mastcellen per oppervlakte toeneemt met toenemende tumorgraad. Ondanks een duidelijke trend, kan deze toename niet als significant beschouwd worden. Dit is te wijten aan de grote variatie betreffende de cellulariteit in de verschillende tumoren van dezelfde tumorgraad. Deze variatie zou mogelijk gereduceerd kunnen worden door het toepassen van deze tellingen op een grotere stalenpopulatie. Ondanks het gebrek aan statistisch significante verschillen, kon er dus wel een trend worden waargenomen, waarbij het aantal mastcellen per oppervlakte toeneemt met stijgende tumorgraad. Deze tumorgraad-gerelateerde wijzigingen in de cellulariteit werden ook geobserveerd door Patnaik et al (1984) [29]. Verdere waarnemingen tonen aan dat deze tumorgraad-afhankelijke toename in cellulariteit gepaard gaat met een afname in de hoeveelheid collageen, alsook met een dalende trend in het aantal fibroblasten. Dit kan mogelijk verklaard worden door de werking van collagenase, een enzym dat aanwezig is in de mastcelgranula. Als de hoeveelheid mastcellen per oppervlakte toeneemt, neemt de hoeveelheid beschikbaar collagenase ter hoogte van de tumor immers ook toe. Het collageen moet bij wijze van spreken plaatsmaken voor de tumorcellen. Xu et al (2004) toonden bovendien aan dat mastcellen een rol spelen in de regulatie van de collageenproductie door fibroblasten, alsook in de controle van de fibroblast proliferatie. Uit hun onderzoek bleek dat mastcellen zorgen voor een verminderde collageensynthese en voor de contractie van bestaande collageenvezels. Zij beschreven een rol voor TNF- α , een cytokine dat aanwezig is in de mastcelgranula, in het verminderen van de collageenproductie. Daarnaast toonden zij ook aan dat eosinofielen een rol kunnen spelen in de regulatie van de collageenproductie door fibroblasten [45]. In onze studie werd een eosinofiel infiltraat aangetoond in de meeste MCTen, waarbij geen significante verschillen werden waargenomen in het gemiddelde aantal eosinofielen tussen de verschillende tumorgraden. Een mogelijke verklaring hiervoor is de beperkte aanwezigheid van eosinofielen in het bloed ($\pm$ vijf procent), waardoor de infiltratie van deze cellen in MCTen verzaadigbaar is [18]. De aanwezigheid van dit eosinofiel infiltraat in MCTen wordt door de meeste studies beschreven. Calónico et al (1985) toonden aan dat eosinofielen gemiddeld acht procent uitmaken van de totale celpopulatie binnen deze tumoren. Uitzonderlijk kunnen MCTen voorkomen waarin het eosinofiel infiltraat dertig procent uitmaakt van alle cellulaire componenten [46]. Onze resultaten tonen verder aan dat eosinofielen vaak aanwezig zijn in de nabijheid van collageen en bloedvaten. Dit verschijnsel werd nog niet gerapporteerd door

andere studies. Eosinofielen worden vermoedelijk uit de bloedstroom aangetrokken naar de plaats van de MCT, tengevolge van de vrijzetting van ECF door de neoplastische mastcellen. Daar treden ze uit het bloedvat om vervolgens het tumorweefsel te betreden [19]. Dit is een mogelijke verklaring voor de sterke associatie van eosinofielen met de bloedvaten in de tumor. De associatie van eosinofielen met het collageen is minder duidelijk en dient verder onderzocht te worden.

Om de metachromasie van de mastcelgranula na te gaan in de verschillende tumorgraden, werden de MCT specimens gekleurd met toluidine blauw. Onze resultaten tonen de aanwezigheid van deze metachromatische granula aan in alle tumorgraden, hoewel dit het meest uitgesproken is in graad I MCTen. Dean PW et al (1988) rapporteerden hetzelfde verschijnsel en verklaarden dit door een verminderd aantal granula in anaplastische MCTen vergeleken met goed gedifferentieerde tumoren [10]. De aanwezigheid van minder granula leidt immers automatisch tot een minder uitgesproken metachromasie.

Voor EM analyses beschikten we slechts over vier MCT stalen, waarvan drie graad I en één graad III. Hierdoor was het dus enkel mogelijk om een ultrastructurele vergelijking te maken tussen enerzijds goed gedifferentieerde en anderzijds slecht of niet gedifferentieerde mastcellen. Een eerste belangrijke waarneming was het voorkomen van twee morfologisch verschillende types mastcellen in graad I MCTen. Op morfometrisch vlak verschilden deze types enkel van elkaar betreffende het aantal granula. Lichtmicroscopisch konden eveneens twee morfologisch verschillende mastceltypes worden waargenomen, zowel in graad I als in graad II tumoren. Tot op heden werd dit verschijnsel door geen enkele studie gerapporteerd. Uit dit onderzoek kan niet afgeleid worden of het hier elektronenmicroscopisch en lichtmicroscopisch om dezelfde twee types mastcellen gaat. Dit verschijnsel dient verder onderzocht te worden. Het is mogelijk dat de twee types mastcellen verschillen in hun activiteit. Zo kan het ene type een groter proliferatief en synthetisch vermogen vertonen dan het andere type. Wijzigingen in activiteit worden immers gereflecteerd door een gewijzigde morfologie. Een andere mogelijkheid is dat de twee types mastcellen zowel normale als neoplastische mastcellen vertegenwoordigen. Om na te gaan wat de precieze rol is van ieder celtype, alsook wat het verschil is tussen beide morfologisch verschillende mastcellen, is verder onderzoek nodig. Biochemische studies voor het bepalen van de celactiviteit of mutatie-analyses voor het bepalen van de aard van de mastcel (normaal versus neoplastisch) zijn hierbij mogelijke opties die gehanteerd kunnen worden.

Wanneer deze graad I mastcellen vervolgens vergeleken werden met graad III mastcellen, konden heel wat morfologische en morfometrische verschillen waargenomen worden. Een eerste belangrijk verschil betreft de granula. Onze resultaten tonen aan dat graad III mastcellen minder, maar grotere granula bevatten vergeleken met goed gedifferentieerde graad I mastcellen. Zoals vermeld in de vorige paragraaf, werd dit verschijnsel eveneens waargenomen door Dean et al (1988) [10]. Een tweede verschil is de grotere kern/cytoplasma verhouding, die wordt geobserveerd in graad III mastcellen vergeleken met graad I cellen. Dit hangt samen met een grotere kerndiameter, aangezien de celdiameter niet significant verschillend is tussen beide cellen. Dit is een bevestiging van de resultaten van Madewell et al (1984) [25]. Zij toonden eveneens aan dat zowel de kerndiameter als de kern/cytoplasma verhouding groter is in mastcellen afkomstig van slecht gedifferentieerde tumoren vergeleken met mastcellen afkomstig van intermediair of goed gedifferentieerde tumoren. In tegenstelling tot ons onderzoek, vonden zij echter ook een toename in de celdiameter in graad III mastcellen vergeleken met graad I mastcellen. Ten slotte wijzen onze morfometrische resultaten uit dat er geen verschil is in het aantal mitochondria tussen graad I en graad III mastcellen, met in beide groepen een gemiddelde van 10 – 15 mitochondria per celprofiel. Deze bevindingen komen niet overeen met de studieresultaten van Madewell et al (1984). Deze groep toonde aan dat het aantal mitochondria afhankelijk is van de differentiatiestatus van de tumor. Zij vonden waarden van ongeveer 10-15/celprofiel en 50/celprofiel voor respectievelijk goed gedifferentieerde en slecht gedifferentieerde tumoren. Onze bevindingen tonen echter wel verschillen aan in de grootte van de mitochondria, waarbij slecht gedifferentieerde mastcellen grotere mitochondria bevatten vergeleken met goed gedifferentieerde mastcellen. Madewell et al (1984) observeerden geen tumorgraad-afhankelijk verschil in de diameter van de mitochondria [25]. Wat betreft de gemiddelde diameter van mitochondria in neoplastische mastcellen, rapporteerden Bloom et al (1956) een waarde van 1 – 1,5µm [26]. Wij observeerden veel kleinere mitochondria, met gemiddelde diameters van 525,74nm, 522,11nm en 652,03nm voor respectievelijk graad I (type 1), graad I (type 2) en graad III mastcellen. De resultaten van dit onderzoek tonen dus aan dat graad III mastcellen minder granula en grotere mitochondria bevatten vergeleken met graad I mastcellen. Daarnaast werden er in graad III mastcellen enorm grote hoeveelheden gedilateerd RER waargenomen, wat wijst op een synthetisch en/of proliferatief fenotype. Dit proliferatief fenotype van graad III mastcellen werd eveneens geobserveerd door Nishizumi et al (2000). Zij toonden aan dat granula-arme mastcellen (herinner: graad III mastcellen hebben minder

granula in hun cytoplasma vergeleken met graad I mastcellen) vaak gekenmerkt worden door de aanwezigheid van mitose figuren [43].

Vervolgens werd de ultrastructurele morfologie van de granula bestudeerd. Over het algemeen werden de meeste granula gekenmerkt door een elektronendense matrix die omgeven is door een perifere halo. Dit is een typische karakteristiek van secretoire granula [47]. Ondanks dit gemeenschappelijke kenmerk, werden er toch morfologische verschillen waargenomen tussen de verschillende granula. Onze resultaten tonen aan dat de granula in graad I MCTen kunnen ingedeeld worden in drie klassen op basis van hun morfologie. Graad III MCTen vertonen naast deze drie klassen ook nog andere granula, die gekenmerkt worden door het voorkomen van draadvormige patronen in hun matrix. Madewell et al (1984) observeerden eveneens deze bijzondere granula met lamellaire patronen in het cytoplasma van neoplastische mastcellen. Ook de super granula, één van de drie granula klassen, werden door deze groep gerapporteerd [25]. De heterogeniteit betreffende de morfologie van de granula werd eveneens waargenomen in andere studies [26,48]. We kunnen uit onze resultaten niet afleiden of deze diversiteit te wijten is aan fysiologische omstandigheden of aan de toegepaste fixatie- en/of inbedmethoden. Een mogelijke verklaring werd reeds gegeven door Taichman NS et al (1970). Zij hebben in een aantal diersoorten aangetoond dat de variatie betreffende het morfologische voorkomen van mastcelgranula eerder een reflectie is van verschillende fases in de maturatie van deze organellen, dan van afzonderlijke populaties van granula [49]. Dit werd echter nog niet aangetoond voor de hond. Verder onderzoek is nodig om de precieze oorsprong van deze morfologische diversiteit aan granula na te gaan. Uit onze studie blijkt dat de granula heterogeniteit toeneemt met stijgende tumorgraad. Dit verschijnsel werd eveneens waargenomen door Madewell et al (1984), die aantoonde dat de granula heterogeniteit rechtstreeks gerelateerd bleek te zijn aan de mate van cellulaire differentiatie [25]. Deze tumorgraad-gerelateerde verschillen in de granula diversiteit dienen in de toekomst verder gekarakteriseerd te worden.

Ten slotte werden elektronenmicroscopisch enkele bijzondere waarnemingen gedaan in de neoplastische mastcellen. Een eerste was de aanwezigheid van cytoplasmatische projecties ter hoogte van het celoppervlak. Aangezien deze uitstulpingen rechtstreeks contact maken met ofwel andere tumorcellen ofwel collageen, spelen ze waarschijnlijk een belangrijke rol in cel-cel en cel-matrix interacties. Deze cellulaire projecties zijn in feite ankers waarmee de cel zich kan vasthechten. In graad III mastcellen zijn deze uitstulpingen minder uitgesproken. Dit zou één van de redenen kunnen zijn waarom graad III mastcellen vaker metastaseren vergeleken met graad I mastcellen. Bloom et al (1956) en Madewell et al (1984) beschreven reeds het

voorkomen van complexe interdigities tussen de cytoplasmatische uitstulpingen van aaneengrenzende mastcellen [25,26]. In een studie van Goto N et al (1974) daarentegen werden er geen interacties waargenomen tussen deze cellulaire projecties van nabijgelegen mastcellen [50]. Onze bevindingen komen ook niet overeen met de studieresultaten van Nishizumi et al (2000), die neoplastische mastcellen observeerden met een glad oppervlak, zonder uitstulpingen ter hoogte van het celoppervlak [43]. Deze laatste twee studies werden echter uitgevoerd in respectievelijk katten en hamsters. Het verschil in deze resultaten kan verklaard worden door het feit dat mastcellen in verschillende species, alsook in verschillende lichaamsdelen van dezelfde species, verschillende morfologische, biochemische en functionele eigenschappen kunnen hebben [22]. Een tweede bijzondere waarneming in deze studie was de aanwezigheid van bundels microfilamenten, alleen of in combinatie met tubuli, in het cytoplasma van sommige neoplastische mastcellen. Deze microfilamenten waren minder frequent aanwezig in het cytoplasma van graad III mastcellen. Deze bevindingen komen niet overeen met deze van Madewell et al (1984). Zij vonden deze microfilamenten voornamelijk terug in intermediair en slecht gedifferentieerde MCTen. Daarnaast werd de gelijktijdige aanwezigheid van microfilamenten en tubuli in het cytoplasma niet beschreven door deze groep. Zij vonden deze structuren enkel afzonderlijk terug in sommige neoplastische mastcellen [25]. De aard van deze filamenten is tot het heden nog niet geweten.

Het kwantificeren van proliferatie binnen tumoren is een belangrijke prognostische indicator. In deze studie werden hiertoe het aantal mitose figuren geteld en gerelateerd aan de tumorgraad. Hieruit bleek dat het aantal mitose figuren significant toeneemt met toenemende tumorgraad. Deze bevindingen bevestigen de studieresultaten van Romansik et al (2007), die aantoonde dat de mitose index (MI) rechtstreeks gecorreleerd is met de tumorgraad. Deze onderzoeksgroep rapporteerde eveneens dat de MI een belangrijke voorspeller is van de overleving, onafhankelijk van de tumorgraad [51]. De MI index is echter niet de meest nauwkeurige maat voor proliferatie, aangezien het enkel de cellen in de M-fase van de celcyclus in rekenschap brengt [7]. Om deze reden werd in deze studie een tweede manier gebruikt voor het kwantificeren van de proliferatie, namelijk IHC voor de proliferatiemarkers Ki67 en MCM7. Ki67 is een klassieke proliferatiemarker die frequent wordt toegepast in zowel de humane als de veterinaire diagnostiek. Deze marker detecteert cellen in zowel de M-fase als de S-fase en geeft om deze reden een betere schatting van de mate van proliferatie binnen MCTen vergeleken met de MI [7]. MCM7 is een proliferatiemarker die tot expressie komt in alle fases van de celcyclus (G₁-, S-, G₂- en M-fase) en die bijgevolg mogelijk een

betere maat is voor proliferatie vergeleken met de klassieke proliferatiemarkers zoals Ki67. Dit werd reeds aangetoond voor verschillende humane kankers [9]. Ondanks deze veelbelovende resultaten in humane studies, werden deze MCM moleculen tot het heden nog niet toegepast als proliferatiemarkers in de veterinaire geneeskunde. Om deze reden werd in deze studie de expressie van zowel Ki67 als MCM7 bepaald in de verschillende tumorgraden via IHC. De expressie van beide markers werd gekwantificeerd via twee methoden: het bepalen van het percentage immunoreactiviteit (1) en het tellen het aantal immunopositieve cellen per oppervlakte (2). Een voordeel van de eerste methode is dat deze grotendeels geautomatiseerd is. Een nadeel ervan is echter dat ook niet-relevante bruine pixels in rekenschap worden gebracht. De tweede methode daarentegen gebeurt manueel en wordt bijgevolg volledig gecontroleerd door de onderzoeker. Het gevolg is echter een grotere inter-onderzoeker variatie vergeleken met de eerste methode. De tweede methode wordt het meest toegepast in IHC studies. Onze resultaten tonen bij beide methodes, zowel voor Ki67 als MCM7, stijgende trends aan met toenemende tumorgraad. Significante verschillen werden echter enkel gevonden voor MCM7 tussen graad I en graad II/III MCTen. Dit was enkel het geval wanneer de tweede methode gehanteerd werd. In de toekomst dienen deze experimenten herhaald te worden op een grotere stalenpopulatie om de bevindingen statistisch betrouwbaarder te maken. Pas dan kan er met zekerheid gesteld worden dat expressie van de proliferatiemarkers al dan niet gerelateerd is aan de tumorgraad. Wat betreft Ki67, komen onze bevindingen overeen met deze van Sakai et al (2002), die aantoonde dat de Ki67 expressie gecorreleerd is met de tumorgraad. Deze groep vond echter niet enkel een stijgende tendens, maar ook significante verschillen in de Ki67 expressie tussen graad I en II en tussen graad II en III MCTen [52]. Ook Abadie et al (1999) beschreven deze relatie tussen de Ki67 expressie en de tumorgraad [53]. Zoals reeds vermeld werden er nog geen veterinaire studies uitgevoerd met de althans beloftevolle MCM proliferatiemarkers. Vervolgens werden in onze studie Ki67 en MCM7 onderling vergeleken als markers voor proliferatie. Onze resultaten tonen aan dat de MCM7 expressie significant hoger is dan de Ki67 expressie in graad II en III MCTen, onafhankelijk van de toegepaste methode. In graad I MCTen bereikte dezelfde trend het significantieniveau niet. Deze bevindingen indiceren dat MCM7 mogelijk een hogere sensitiviteit heeft als marker voor proliferatie vergeleken met Ki67. Yang et al (2006) hebben een gelijkaardig fenomeen beschreven in humane longkanker. Zij toonden aan dat een verhoogde expressie van MCM markers significant geassocieerd is met een slechte prognose in patiënten met longkanker. Dit was niet het geval voor de Ki67 expressie [54]. Er dient opgemerkt te worden dat de interne positieve controle in sommige stalen negatief was voor

Ki67 en niet voor MCM7, waardoor bovenstaande resultaten niet volledig correct zijn. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat het anti-Ki67 antilichaam gericht is tegen humane weefsels terwijl het anti-MCM7 antilichaam reageert met weefsels van de hond. Dit verklaart echter niet waarom de interne positieve controles van sommige stalen wel positief kleurden voor Ki67. Een andere mogelijke oorzaak zijn de gebruikte fixatie- en inbedprocedures. Sommige stalen zijn ingebed in ons bezit gekomen, waardoor de gebruikte fixatie- en inbedmethodes niet gekend zijn. Om deze reden is het mogelijk dat het anti-Ki67 antilichaam niet met alle weefsels reageert, afhankelijk van de behandelingsmethoden. Ten slotte moet er ook rekening gehouden worden met het tijdstip van behandeling. Sommige weefsels zijn reeds jaren geleden ingebed, terwijl andere onlangs zijn gefixeerd en ingebed. Deze tijdsduur kan mogelijk effecten hebben op de antigeniciteit van de weefsels. Bij de toekomstige herhaling van deze experimenten dient de Ki67 kleuring op hondenweefsel geoptimaliseerd te worden vooraleer een vergelijking te maken tussen beide proliferatiemarkers. Het is hierbij aangeraden om een anti-Ki67 antilichaam te gebruiken dat specifiek gericht is tegen hondenweefsel, alsook om enkel IHC uit te voeren op stalen waarvan de precieze fixatie- en inbedprocedures gekend zijn.

Aangezien de c-KIT receptor een belangrijke rol speelt in allerlei mastcel-gerelateerde processen, werd ten slotte het expressiepatroon van dit eiwit bepaald in de verschillende tumorgraden. Onze resultaten tonen aan dat c-KIT voornamelijk tot expressie komt in het cytoplasma, hoewel sommige mastcellen ook expressie van deze receptor vertonen ter hoogte van hun celmembraan. Dit is in tegenstelling tot normale mastcellen die c-KIT meestal enkel tot expressie brengen ter hoogte van hun celmembraan. Deze bevindingen waren vergelijkbaar voor alle tumorgraden. Onze resultaten komen overeen met de bevindingen van Kiupel et al (2004), die aantoonde dat neoplastische mastcellen voornamelijk een cytoplasma-geassocieerd expressiepatroon van c-KIT vertonen, met slechts een beperkte expressie ter hoogte van de celmembraan [8]. Reguera et al (2000) toonden aan dat het expressiepatroon van c-KIT gerelateerd is aan de differentiatiestatus van de cel en dus aan de tumorgraad [37]. Bij ons echter werd hetzelfde expressiepatroon waargenomen in alle tumorgraden. Er dient wel opgemerkt te worden dat in deze studie slechts één tumor per tumorgraad geanalyseerd werd. Om een correcte uitspraak te kunnen doen over een mogelijke relatie tussen het c-KIT expressiepatroon en de tumorgraad, moeten deze experimenten uitgevoerd worden op een grotere stalenpopulatie. Als er bovendien klinische follow-up informatie voor ieder staal beschikbaar is, kunnen de expressiepatronen gerelateerd worden

aan de overlevingstijden. Op deze manier kan er dan een uitspraak gedaan worden over de prognostische waarde van het c-KIT expressiepatroon voor MCTen, onafhankelijk van de tumorgraad. Nu is de vraag of de gewijzigde c-KIT expressie in neoplastische mastcellen gerelateerd is aan het frequente voorkomen van *c-kit* mutaties in deze pathologie. Webster et al (2006) toonden aan dat *c-kit* mutaties significant geassocieerd zijn met het gewijzigde c-KIT expressiepatroon in MCTen [40]. De precieze link tussen beide en de rol ervan in de ontwikkeling van MCTen is echter niet gekend. Het is mogelijk dat de cytoplasmatische c-KIT receptor activerende *c-kit* mutaties bevat, wat resulteert in de proliferatie en survival van mastcellen en bijgevolg in de ontwikkeling van MCTen [8]. Verder onderzoek is echter vereist om dit na te gaan, alsook om het hierbij betrokken moleculaire mechanisme te ontrafelen. Onze resultaten tonen ten slotte de expressie van c-KIT aan ter hoogte van het epitheel. Dit verschijnsel werd reeds gerapporteerd door Sihto H et al (2007). Zij beschreven de expressie van c-KIT in een hele range van normale cellen, onder meer in endotheelcellen, epitheelcellen en geslachtsellen [55].

Naast proliferatie en c-KIT expressie, zijn er nog processen die mogelijk een belangrijke prognostische waarde hebben in deze MCT problematiek. Een eerste is apoptose. De tumorgroei is niet enkel afhankelijk van de proliferatiestatus van de tumorcellen, maar ook van het niveau van celdood binnen tumoren. Zo kan een tumor die gekenmerkt wordt door een lage proliferatieve index en weinig celdood even agressief zijn als een tumor die gekarakteriseerd wordt door een hoge proliferatieve index en veel celdood. Vermits carcinogenese een meerstappenproces is, met als vereiste het optreden van meerdere genetische mutaties in individuele cellen, is de inhibitie van apoptose een noodzakelijke stap voor die getransformeerde cel om te overleven en te blijven repliceren. Dit heeft geleid tot het gebruik van apoptose-gerelateerde markers (o.a. p53 en de leden van de Bcl-2 familie) als mogelijke determinanten van de tumorprognose [6]. Een tweede belangrijk proces dat vaak gerelateerd is aan maligniteit is angiogenese. Dit proces speelt niet enkel een belangrijke rol in het wondhelingsmechanisme, maar ook in de groei en metastasering van solide tumoren. Zonder vascularisatie kunnen tumoren immers niet groter worden dan 1 à 2 mm diameter, aangezien dit de maximale afstand is waarover zuurstof en nutriënten kunnen diffunderen vanuit de bloedvaten. Neovascularisatie is van belang voor de voorziening van nutriënten en zuurstof waardoor de tumorcellen kunnen overleven en blijven prolifereren. Bovendien stimuleren de nieuwgevormde endotheelcellen de groei van nabijgelegen tumorcellen door de productie en secretie van groeifactoren, o.a. insuline groeifactor (IGF) [30]. Preziosi et al

(2004) toonden reeds aan dat de ‘microvessel density’ (MVD) binnen MCTen significant geassocieerd is met het biologische gedrag van deze tumoren [56].

Het doel is om in de toekomst een nieuw classificatiesysteem uit te werken, waarin op basis van IHC van een aantal markers (proliferatie, apoptose, angiogenese, c-KIT expressie, ...) een zo correct mogelijke prognose kan worden gemaakt. Aangezien hier rekening gehouden wordt met verschillende maligniteit-gerelateerde processen, is het mogelijk dat de hieruit voorkomende prognose correcter is dan de prognose die louter gebaseerd is op de histopathologische gradering van MCTen.

Er kan geconcludeerd worden dat een aantal van de onderzochte LM en EM karakteristieken een potentiële prognostische waarde kunnen hebben in canine MCTen. Verder tonen de IHC resultaten van dit onderzoek aan dat MCM moleculen veelbelovende proliferatiemarkers zijn en mogelijk een belangrijke prognostische rol kunnen spelen in MCTen bij de hond. Verder onderzoek dient uitgevoerd te worden op een grotere stalenpopulatie waarvoor klinische follow-up informatie beschikbaar is. Op deze manier kunnen de resultaten gekoppeld worden aan de overlevingstijd in plaats van aan de tumorgraad, wat zou kunnen resulteren in een grotere prognostische waarde.

Referenties

1. Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract* 2002;43:240-6.
2. Cohen D, Reif JS, Brodey RS, Keiser H. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Res* 1974;34:2859-68.
3. Misdorp W. Mast cells and canine mast cell tumours. A review. 157-69.
4. Rebuzzi S, Willman M, Sonneck K, Gleixner KV, Florian S et al. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; doi10.1016/j.vetimm.2006.11.009:1-14.
5. Ogilvie GK. Mast cell tumors of the extremities and other sites. *Oncologisch treffen* 2007;91-109.
6. Scase TJ, Edwards D, Miller J, Henley W, Smith K et al. Canine Mast Cell Tumors: Correlation of Apoptosis and Proliferation Markers with Prognosis. *J Vet Intern Med* 2006;20:151-8.
7. Simoes JPC, Schoning P, Butine M. Prognosis of Canine Mast Cell Tumors: A Comparison of Three Methods. *Vet Pathol* 1994;31:637-47.
8. Kiupel M, Webster JD, Kaneene JB, Miller R, Yuzbasiyan-Gurkan V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 2004;41:371-7.
9. Gonzalez MA, Tachibana KK, Laskey RA, Coleman N. Control of DNA replication and its potential clinical exploitation. *Nature reviews cancer* 2005;5:135-41.
10. Dean PW. Mast cell tumors in dogs: Diagnosis, treatment, and prognosis. *Vet Med* 1988;82:185-92.
11. Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Mutations in the juxtamembrane domain of *c-KIT* are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet Pathol* 2002;39:529-35.
12. Riva F, Brizzola S, Stefanello D, Crema S, Turin L. A study of mutations in the *c-kit* gene of 32 dogs with mastocytoma. *J Vet Diagn Invest* 2005;17:385-8.

13. Ma Y, Longley BJ, Wang X, Blount JL, Langley K et al. Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms. *J Invest Dermatol* 1999;112:165-70.
14. London CA, Galli SJ, Yuuki T, Hu Z, Helfand SC et al. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp Hematol* 1999;27:689-97.
15. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Shalm's Veterinary Hematology*. Lippincott William & Wilkins;2000.
16. Galli SJ, Wedemeyer J, Tsai M. Analyzing the Roles of Mast Cells and Basophils in Host Defense and Other Biological Responses. *Int J Hematol* 2001;75:363-9.
17. Galli S, Metcalfe D, Dvorak A. Basophils and mast cells and their disorders. *Williams hematology* 2001;801-15.
18. Stevens A, Lowe J. *Histologie van de mens*. Houten/Diegem: Bohn Stafleu Van Loghum;1997.
19. Schalm OW, Jain NC, Carroll EJ. *Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger;1975.
20. Nairn R, Helbert M. *Immunology for Medical Students*. USA: Mosby;2002.
21. Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(2):450-5.
22. Rogers KS. Mast Cell Tumors: Dilemmas of Diagnosis and Treatment 1996;1:87-102.
23. Tkaczyk C, Okayama Y, Woolhiser MR, Hageman DD, Gilfillan AM et al. Activation of human mast cells through the high affinity IgG receptor. *Molecular Immunology* 2001;38:1289-1293.
24. Kulka M, Alexopoulou L, Flavell RA, Metcalfe DD. Activation of mast cells by double-stranded RNA: Evidence for activation through Toll-like receptor 3. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:174-82.
25. Madewell BR, Munn RJ, Philips LK. Ultrastructure of canine, feline, and bovine mast cell neoplasms. *Am J Vet Res* 1984;45:2066-73.
26. Bloom G, Friberg U, Larsson B. Some Observations in the Fine Structure of Mast Cell Tumours (Mastocytoma). *Nord Vet Med* 1956;8:43-55.
27. Lao L, Kumakiri M, Nakagawa K, Ishida H, Ishiguro K et al. The ultrastructural findings of Charcot-Leyden crystals in stroma of mastocytoma. *Journal of Dermatological Science* 1998;17:198-204.

28. Bostock DE. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J Small Anim Pract* 1973;14:27-40.
29. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathool* 1984;21:469-74.
30. Robbins SL, Cotran RS, Kumar VK. Robbins Basic pathology. USA: Saunders;2003.
31. Seguin B., Leibman N.F., Bregazzi V.S *et al.* Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996–1999). *J Am Vet Med Assoc* 2001;218:1120–1123.
32. Weisse C., Shofer F.S., Sorenmo K. Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002;38:71–73.
33. Northrup NC, Harmon BG, Gieger TL, Brown CA, Carmichael KP *et al.* Variation among pathologists in histological grading of canine cutaneous mast cell tumors. *J Vet Diagn Invest* 2005;17:245:8.
34. Maiorano D, Lutzmann M, Mechali M. MCM proteins and DNA replication. Current opinion in Cell Biology 2006;18:130-6.
35. Maine GT, Sinha P, Tye BK. Mutants of *S. Cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics* 1984;106:365-85.
36. Nishitani H, Lygerou Z. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes to Cells* 2002;7(6):523-34.
37. Reguera MJ, Rabanal RM, Puigdemont A, Ferrer L. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *Am J Dermatopathol* 2000;22:49-54.
38. Gieger TL, Northrup N, Wall M. Clinical Management of Mast Cell Tumors in Dogs. *Compendium Online* January 2005;56-67.
39. Woods AE, Ellis RC. Laboratory Histopathology: a complete reference volume 2. Edinburgh: Churchill Livingstone;1994.
40. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M. Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with *c-KIT* and Its Role in Prognostication. *Vet Pathol* 2007;44:298-308.
41. Tams TR, Macy DW. Canine Mast Cell Tumors. *The Compendium on continuing Education* 1981;10:869-78.
42. Sfiligoi G, Rassnick KM, Scarlett JM. Outcome in dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990-2001). *JAVMA* 2005;226:1368-74.

43. Nishizumi K, Fujiwara K, Hasegawa A. Cutaneous Mastocytomas in Djungarian Hamsters. *Exp Anim* 2000;49:127-30.
44. Bloom F. Spontaneous solitary and multiple mast cell tumors (“mastocytoma”) in dogs. *Archives of pathology* 1956;661-76.
45. Xu X, Rivkind A, Pikarsky A, Pappo O, Bischoff SC et al. Mast cells and eosinophils have a potential profibrogenic role in Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:440-7.
46. Calonico LD et al. An ultrastructural analysis of Dog Mastocytoma cells and Normal Mast cells. *Anat Rec* 1985;212:399-407.
47. Bloom GD. Electron microscopy of neoplastic mast cells: A study of the mouse mastocytoma mast cell. *Ann NY Acad Sci* 1963;103:53-86.
48. Lombard LS, Moloney JB, Rickard CG. Transmissible canine mastocytoma. *Ann NY Acad Sci* 1963;108:1086-1105.
49. Taichman NS. Ultrastructure of guinea pig mast cells. *J Ultrastruct Res* 1970;32:284-92.
50. Goto N, Ozasa M, Takahashi R. Pathological observation of feline mast cell tumor. *Jpn J Vet Sci* 1974;36:483-94.
51. Romansik EM, Reilly CM, KaSS PH, Moore PF, London CA. Mitotix index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 2007;44:335-41.
52. Sakai N, Noda A, Shirai N, Iidaka T, Yanai T et al. Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. *J Comp Pathol* 2002;127:233-8.
53. Abadie JJ, Amardeilh MA, Delverdier ME. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1999;215:1629-34.
54. Yang J, Ramnath N, Moysich KB, Asch HL, Swede H et al. Prognostic significance of MCM2, Ki-67 and gelsolin in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2006;6:1-10.
55. Sihto H, Tynninen O, Bützow R, Saarialho-Kere U, Joensuu H. Endothelial cell KIT expression in human tumours. *J Pathol* 2007;211:481-8.
56. Preziosi R, Sarli G, Paltrinieri M. Prognostic Value of Intratumoral Vessel Density in Cutaneous Mast Cell Tumours of the Dog. *J Comp Path* 2004;130:143-51.

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Microscopische en immunohistochemische karakterisatie van canine mastceltumoren

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

Sofie Baeten

Datum: **18.06.2007**