

# De bijdrage van de pathologie bij het klinisch opwerken van cutane mestceltumoren van de hond

E. van Garderen<sup>1,III</sup>, J.H. Vos<sup>1</sup>, N.M. Meertens<sup>1</sup>,  
N.H. Peperkamp<sup>1</sup>, K. Junker<sup>1</sup> en J.P. de Vos<sup>II</sup>

Dit artikel is niet door twee referenten beoordeeld en geldt dus niet als wetenschappelijk artikel.

## SAMENVATTING

Door de hoge incidentie van mestceltumoren in de huid bij de hond en de sterk variërende klinische presentatie van deze tumoren, is het noodzakelijk dat voor de diagnostiek en therapie van deze tumoren een doordachte strategie wordt gevolgd. In dit artikel wordt de rol van de pathologie bij deze strategie nader toegelicht.

Door middel van cytologisch onderzoek kunnen cutane mestceltumoren vrijwel altijd worden gediagnosticeerd. De resultaten van nader histopathologisch, histochemisch en immunohistochemisch onderzoek van mestceltumoren leveren echter veel extra informatie op. Deze is van belang voor het inschatten van het klinische verloop en op basis van deze resultaten kan een optimale therapiekeuze plaatsvinden. Met behulp van histopathologisch onderzoek kan een uitspraak worden gedaan over de radicaliteit van verwijdering van de tumor en kan de mitose-index van de tumorcellen worden bepaald. Tevens kan de tumor worden gegradeerd volgens Patnaik. Aanvullend kunnen de resultaten van de histochemische *AGNOR*, de immunohistochemische *KI-67* en *c-kit* receptorbepalingen leidend zijn om zowel onderbehandeling als overbehandeling van het dier met een mestceltumor te voorkomen. Door het kwantitatieve karakter van de *AGNOR* en *KI-67*-labelingsindices kan men een eenduidig advies geven om het dier al dan niet medicamenteus na te behandelen na chirurgische excisie van de mestceltumor. Door het semikwantitatieve karakter van de *c-kit* receptor-immunohistochemie is een dergelijk advies minder makkelijk objectief te geven. De *AGNOR* en *KI-67* labelingsindices bevestigen dat de Patnaik graad 2 mestceltumoren heterogeen zijn. Op basis van deze labelingsindices kan ongeveer 75 procent van de graad 2 mestceltumoren worden beschouwd als lokale tumor, waarbij als therapie complete excisie volstaat. 25 procent van de graad 2

mestceltumoren heeft echter op basis van deze labelingsindices een potentieel metastatisch fenotype, waardoor er een gegrond advies mag worden gegeven tot chemotherapeutische nabehandeling na chirurgische excisie van het proces. Een meer specifieke therapie met receptor tyrosinekinaseremmers, zoals masitinib (Masivet<sup>®</sup>) en toceranib (Palladia<sup>®</sup>), is mogelijk bij honden waarbij in de tumoreuze mestcellen specifieke mutaties aanwezig zijn in het *KIT*-gen. De aanwezigheid van deze mutaties kan men vaststellen door middel van een op PCR gebaseerde *KIT*-mutatieanalyse.

## INTRODUCTIE

De presentatie van cutane mestceltumoren bij de hond vertoont een verbazingwekkende variatie, waardoor de klinische verschijningsvorm en de macroscopische aspecten ervan volledig aspecifiek zijn. Hierdoor spreekt men in de Engelstalige literatuur bij deze vorm van neoplasie ook wel over de 'great imposter', dat in het Nederlands kan worden vertaald als de 'grote bedrieger'. De aspecifieke klinische presentatie en de hoge incidentie van deze tumoren (16 tot 21 procent van de huidtumoren (1)), maken het nodig dat de behandelend dierenarts een doordachte strategie volgt, zodat een juiste diagnose kan worden gesteld en een passende therapie kan worden ingesteld. Het streven daarbij is zowel onderbehandeling als overbehandeling van het dier te voorkomen.

Dit artikel belicht de rol van de pathologie bij de diagnostiek van cutane mestceltumoren en maakt duidelijk dat de resultaten van het cytologische, histopathologische en (immuun)histochemische onderzoek van mestceltumoren elkaar aanvullen, waarbij de gecombineerde resultaten voor de behandelend dierenarts als leidraad kunnen dienen bij het kiezen van de optimale therapie.

## DIAGNOSTIEK VAN CUTANE MESTCELTUMOREN

Net als bij de diagnostiek van andere ruimte innemende processen kan de diagnose 'mestceltumor' worden gesteld door middel van cytologisch onderzoek van uitstrijkjes van een dunne naald (aspiratie)-biopt (*DN(A)B*) van het proces of door middel van histopathologisch onderzoek van incisie- of excisiebiopten.

### Cytologische diagnostiek door middel van een *DN(A)B*.

Hoewel de sensitiviteit en specificiteit van de cytologische diagnose van ruimte-innemende processen nog wel eens te wensen overlaat, geldt de cutane mestceltumor als één van de grote successen van de cytologische diagnostiek. Kritische factoren die in het algemeen van invloed zijn op de sensitiviteit

<sup>I</sup> Laboratorium voor Pathologie en Histologie, De Gezondheidsdienst voor Dieren, Postbus 9, 7400 AA Deventer.

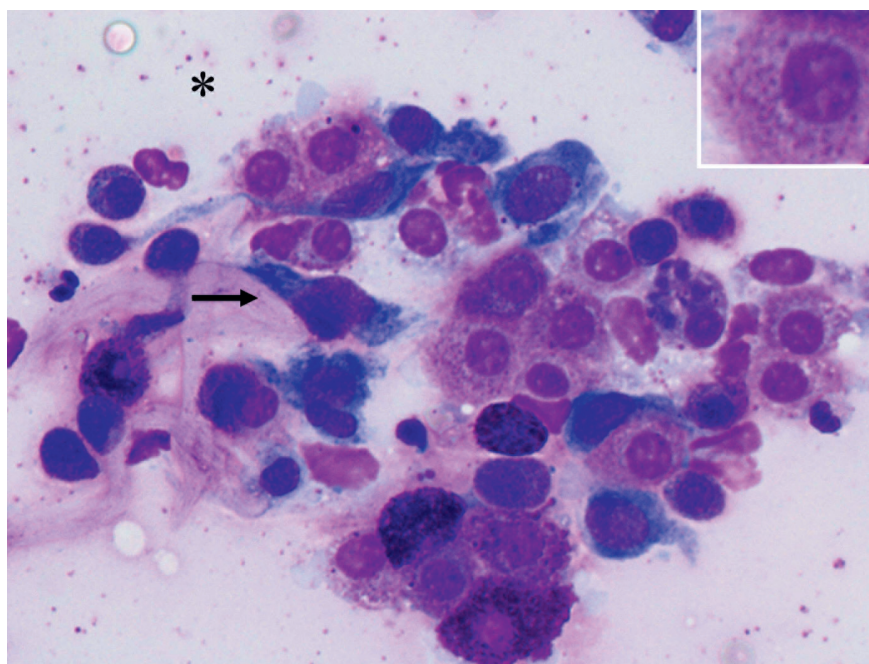
<sup>II</sup> Dierenziekenhuis Zeeuws-Vlaanderen, locatie De Ottenhorst, van Diemenstraat 83, 4535 AR Terneuzen.

<sup>III</sup> Corresponderend auteur.

**Figuur 1. De kenmerkende microscopische aspecten van een uitstrijkje van een mestceltumor van een hond. De tumoreuze mestcellen zijn herkenbaar door de aanwezigheid van paarze cytoplasmatische granula in de cellen.**

De 'insert' in de foto toont een uitvergroting van één van de tumorcellen.

Wanneer de tumoreuze mestcellen ruptureren, kunnen deze granula ook worden aangetroffen als losliggende, extracellulaire uniforme paarze korrels, zoals in de foto te zien is rond de geplaatste asterisk (\*). Andere celtypen die vaak in uitstrijkjes van mestceltumoren aanwezig zijn, zijn geactiveerde fibroblasten (pijl) en eosinofiele granulocyten (hier niet aanwezig). May Grünwald-Giemsa, 40x.



en specificiteit van de cytologische diagnose, blijken bij cutane mestceltumoren gunstig te liggen. Vanwege de goede bereikbaarheid van cutane mestceltumoren is het afnemen van een DN(A)B in de regel geen probleem. Een andere kritische factor bij cytologisch onderzoek, namelijk het verkrijgen van een representatieve celopbrengst, blijkt bij mestceltumoren vrijwel nooit een probleem te zijn. Dit komt enerzijds doordat mestceltumoren in de regel veel tumorcellen bevatten en anderzijds doordat deze tumoreuze mestcellen zich makkelijk laten aspireren. Ten slotte blijkt de derde kritische factor bij het cytologische onderzoek, namelijk de juiste interpretatie van de cellulaire kenmerken van de geaspireerde cellen, vrijwel nooit problemen op te leveren voor een ervaren cytoloog/patholoog. (Tumoreuze) mestcellen tonen namelijk vrijwel altijd kenmerkende microscopische eigenschappen, die zichtbaar zijn in de routinematig uitgevoerde May Grünwald Giemsa-kleuring, waardoor deze cellen gemakkelijk kunnen worden geïdentificeerd (figuur 1). De cytologische kenmerken van (tumoreuze) mestcellen komen ook uitstekend naar voren in andere Romanowsky-afgeleide snelkleuringen zoals de Diff Quick, waardoor de mestceltumor één van de weinige tumoren is die door vrijwel elke practicus door middel van cytologisch onderzoek kan worden herkend.

#### **Histopathologisch onderzoek van incisie- en excisiebiopten**

Het nut van het cytologische onderzoek bij de diagnostiek van mestceltumoren is onomstreden, maar histopathologisch onderzoek van incisie- en excisiebiopten van mestceltumoren heeft toch duidelijk toegevoegde waarde. Indien de behandelend dierenarts besluit het proces chirurgisch te verwijderen en dit gefixeerd naar een diagnostisch pathologisch laboratorium stuurt, is de patholoog in staat enkele microscopische parameters in de tumor te bepalen, die voor de inzendend dierenarts van belang zijn en die informatie kunnen geven over het klinische verloop bij de hond. Deze microscopische parameters met een klinisch-pathologische correlatie zijn:

#### *De beoordeling van de radicaliteit van verwijdering na excisie van het proces*

Mestceltumoren zijn berucht vanwege de problemen met complete chirurgische excisie. Dit komt doordat deze tumoren in de regel weinig begrensd zijn, waardoor het, afhankelijk van de lokalisatie van het proces, niet altijd even makkelijk is adequate chirurgische marges te verkrijgen. Ervaren chirurgische oncologen zijn van dit fenomeen op de hoogte, en overwegen om deze reden in de voorbereiding van de chirurgische excisie van de mestceltumor vaak huidsparende of zogenaamde flaptechnieken (2). Praktisch betekent dit dat bij elk ruimtinnemend proces in de huid van een hond een mestceltumor tot de differentiële diagnose behoort en dat men een dergelijk proces niet chirurgisch hoort te verwijderen zonder voorafgaande (cytologische) diagnostiek, juist vanwege de mogelijke problemen met het verkrijgen van adequate chirurgische marges mocht het proces een mestceltumor blijken te zijn.

Ondanks de aandacht die de chirurg aan de excisie van een mestceltumor besteedt, kan het voorkomen dat de patholoog in het histopathologische rapport vermeldt dat de radicale verwijdering van het proces niet kan worden gegarandeerd, gezien de aanwezigheid van mestcellen in of dichtbij de resectierand. Toch is dit geen directe reden voor een heroperatie, omdat mestcellen die weliswaar bij de resectierand gelegen zijn, maar zich ook duidelijk op afstand van de tumorhaard bevinden, vaak infiltrerende, niet tumoreuze mestcellen zijn. Dergelijke infiltrerende, reactieve en daardoor sterk geactiveerde, maar niet neoplastische mestcellen kunnen meestal niet worden onderscheiden van neoplastische mestcellen (3). Na het uitnemen van de tumor kan de chirurg de speciale aandacht van de patholoog vragen voor bepaalde plekken in de tumor door deze te markeren. De chirurg kan een kritische resectierand markeren door een hechting te plaatsen, maar tegenwoordig is hiervoor ook speciale markeringsinkt verkrijgbaar (Davidson Marking System, Klinipath, Duiven). Deze inkt hecht sterk aan het weefsel. De hechting tussen de markeringsinkt en het weefsel

**Patnaik graad Microscopische kenmerken**

- 1 De lokalisatie van de tumor is beperkt tot de dermis, mitosefiguren worden niet aangetroffen, homogene cytoplasmatische granulatie van de tumorcellen, homogene verdeling van het nucleaire chromatine.
- 2 Tumor is gelokaliseerd in de dermis en subcutis, matige pleiomorfie tumorcellen, de tumor is in de regel weinig begrensd, oedeem kan aanwezig zijn.
- 3 Hoog pleiomorf cel- en kernbeeld van de tumorcellen, tumorcellen zijn regelmatig meerkernig, mitosefiguren worden frequent waargenomen, de tumorcellen hebben weinig cytoplasmatische granula, de aanwezigheid van oedeem, haemorrhagie en necrose in de tumor is gebruikelijk.

**Tabel 1. De indeling van mestceltumoren van de hond op basis van microscopische parameters volgens Patnaik.**

blijft intact nadat het weefsel in de formalineoplossing is geplaatst.

*Histopathologische gradering van de mestceltumor volgens Patnaik*  
 Door middel van histopathologisch onderzoek is het mogelijk in het tumorweefsel microscopische parameters te bepalen met een voorspellende waarde voor het klinische verloop. Cutane mestceltumoren bij de hond blijken een grote variatie te vertonen in biologisch gedrag, variërend van goedaardig tot uitgesproken maligne, inclusief metastasering. In de loop van de tijd zijn een aantal microscopische kenmerken van mestceltumoren bij de hond onderkend, die een correlatie vertonen met het biologische gedrag van de tumor.

Op de eerste plaats blijkt de histopathologische Patnaikgradering enige voorspellende waarde te hebben voor het gedrag van een individuele mestceltumor. Het elegante van deze Patnaikgradering is de relatieve eenvoud ervan. Volgens deze Patnaikgradering worden cutane mestceltumoren van de hond ingedeeld in graad 1-, graad 2- en graad 3-tumoren. De histopathologische parameters op basis waarvan een mestceltumor bij de hond een Patnaikgraad krijgt toegewezen, zijn weergegeven in tabel 1. Ondanks de duidelijk omschreven histopathologische parameters, blijkt de Patnaikgradering toch een bron te zijn van variatie in de uitslagen van verschillende pathologen (4). Dit wordt ook wel ‘interobserver’ variatie genoemd.

Als vuistregel geldt dat graad 1-tumoren in de regel een gunstige prognose hebben. Door hun ligging in de dermis zijn vaak adequate chirurgische marges te verkrijgen, waardoor complete excisie in de regel geen probleem is. Graad 3-tumoren hebben in de regel een ongunstige prognose, gezien hun metastatische fenotype. De beperkte bruikbaarheid van de Patnaikgradering als voorspellende waarde voor het biologische gedrag wordt duidelijk bij graad 2-mestceltumoren. Hoewel graad 2-mestceltumoren op basis van de histopathologische criteria een herkenbare groep vormen, blijken tumoren in deze groep een heterogeen biologisch gedrag te vertonen. Voor een deel van de graad 2-tumoren blijkt complete chirurgische excisie een afdoende therapie, terwijl andere graad 2-tumoren een metastatisch fenotype blijken te bezitten (5). Voor deze laatste subgroep wordt chirurgische excisie en aanvullende chemotherapie als een juiste

therapie beschouwd. Doordat men binnen de groep van graad 2-mestceltumoren de potentieel metastatische fenotypes niet op basis van het routine histopathologische onderzoek kan onderscheiden van de niet metastatische fenotypes, en door de eerder genoemde interobserver-variatie tussen verschillende pathologen, heeft de Patnaikgradering aan betekenis ingeboet bij het voorspellen van het biologisch gedrag van vooral graad 2-mestceltumoren en de daarmee samenhangende therapiekeuze.

*• Additionele histopathologische en (immuun)histochemische parameters met een voorspellende waarde voor het klinische verloop*

Omdat de voorspellende waarde van de Patnaikgradering voor het klinische verloop van graad 2-tumoren tekortschiet, zijn de afgelopen jaren enkele aanvullende histopathologische bepalingen ontwikkeld, waardoor men toch onderscheid kan maken tussen potentieel metastatische en niet metastatische fenotypes. Op volgorde van complexiteit van deze technieken (en de hiermee samenhangende onderzoekskosten) worden achtereenvolgens de volgende parameters besproken: het vaststellen van de mitose-index, histochemisch en immuunhistochemisch onderzoek naar de expressie van *AGNOR*, *KI-67* en *c-kit* receptor door mestceltumoren.

*• Mitose-index*

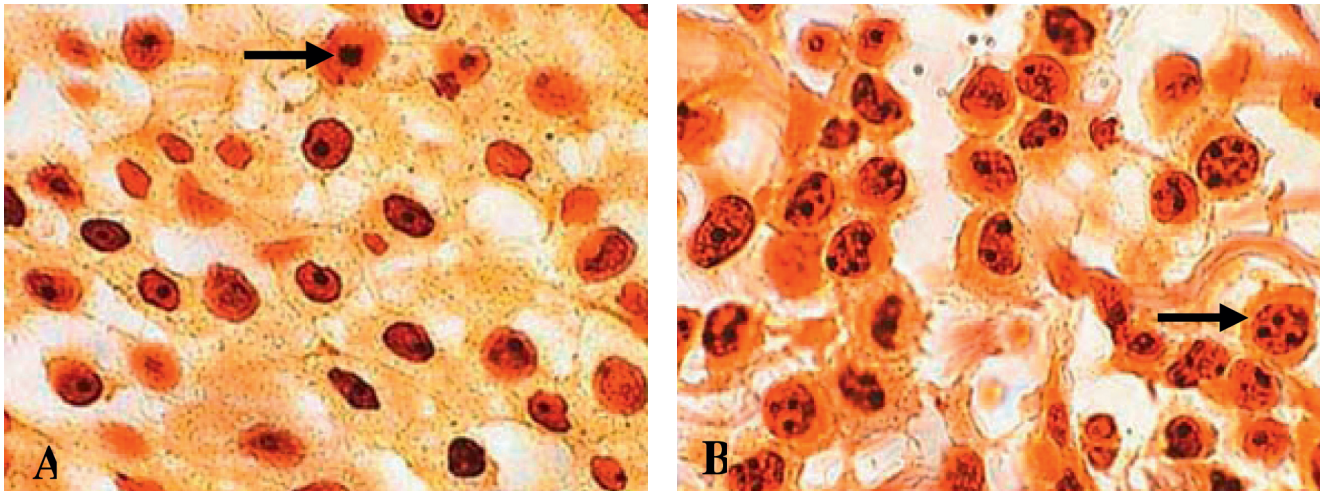
In enkele publicaties stellen de auteurs dat de mitose-index (*M1*), gedefinieerd als het aantal waargenomen mitosefiguren per tien microscopische gezichtsvelden (objectief 40x), in hematoxyline en eosine (*HE*)-gekleurde coupes van mestceltumoren prognostische betekenis heeft (6, 7). Het vaststellen van de *M1* is een eenvoudige en kosteneffectieve bepaling. In één van deze studies werd vastgesteld dat bij 148 honden met cutane mestceltumoren de mediane overlevingstijd 70 maanden bedroeg bij een *M1* ≤ 5. De mediane overlevingstijd was slechts twee maanden bij een *M1* > 5 (6). In een tweede studie werd vastgesteld dat dieren met een *M1* = 0 in de tumor een zodanig lange overlevingstermijn hadden dat de mediane overlevingstijd gedurende de studie niet kon worden vastgesteld. Bij een *M1* van 1 tot 7 bedroeg de mediane overlevingstermijn 18 maanden en deze liep terug naar 3 maanden bij een *M1* groter dan 7 (7).

Hoewel de *M1*-afkapwaarden volgens deze laatste publicatie een duidelijk beeld schetsen van het te verwachten klinische verloop, zijn de conclusies gebaseerd op een kleine groep honden met cutane mestceltumoren (n=57). De praktische bruikbaarheid van deze *M1*-afkapwaarden is daarom nog onvoldoende onderbouwd. Daarentegen bieden de resultaten van het (immuun)histochemische onderzoek naar de mate van de expressie van proliferatiemarkers in cutane mestceltumoren (zie hieronder bij *AGNOR* en *KI-67*) meer houvast om te komen tot een optimale behandeling van het dier (5).

*• Markerexpressie*

*• AGNOR*

*AGNOR* is een afkorting van ‘Argyrophilic Nucleolar Organizer Region’. Zoals deze naam aangeeft, zijn *AGNOR*s gebieden in de celkernen waarop metallisch zilver neerslaat wanneer weefselcoupes worden geïncubeerd met een bepaalde zilvernitraatoplossing (argyrophilic; Argus: zilver). De structuren in de kern



**Figuur 2. Aankleuring van AGNORS in de celkern van tumoreuze mestcellen (pijl).** A; in deze graad 2-mestceltumor blijken er gemiddeld 1,61 AGNORS per tumorcelkern aanwezig te zijn. B; in deze graad 2-mestceltumor zijn gemiddeld 3,43 AGNORS per tumorcelkern aanwezig. A, B. Objectief 60x. Wanneer de labelingsindex van AGNOR  $> 2,25$  bedraagt, kan er na excisie van het proces een gefundeerd advies tot chemotherapeutische nabehandeling worden gegeven. Bij een labelingsindex van  $< 2,25$  is volledige chirurgische excisie van het proces voldoende en wordt medicamenteuze nabehandeling als overbehandeling beschouwd.

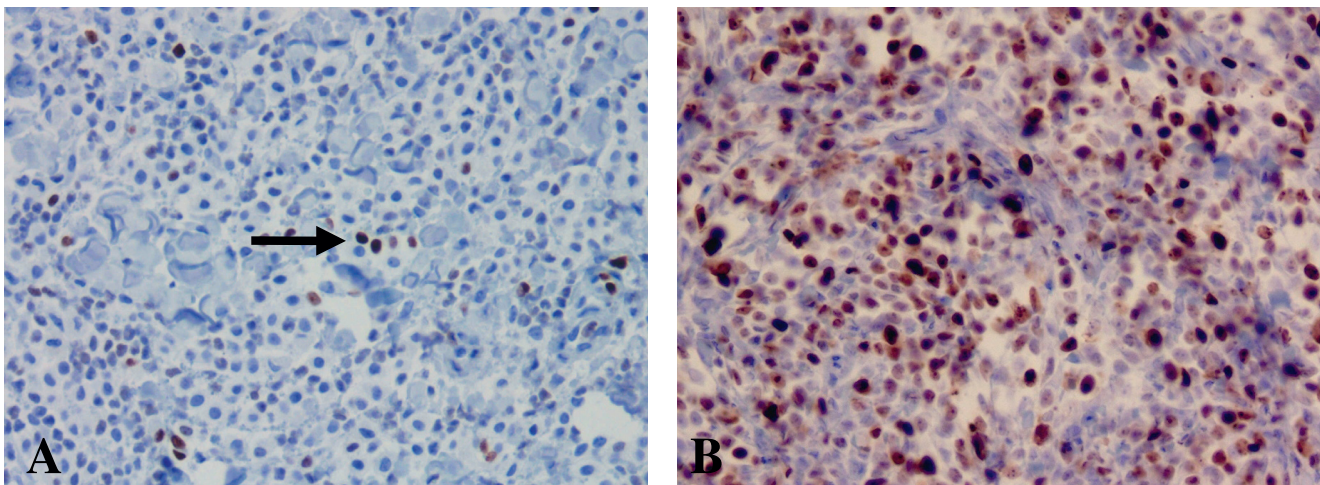
waarop dit metallische zilver neerslaat, blijken nucleoproteïnen te zijn (8). Deze neerslag van metallisch zilver resulteert in microscopisch zichtbare zwarte partikels in de celkernen (figuur 2). Als deze histochemische AGNOR-kleuring wordt uitgevoerd volgens het internationaal geaccepteerde consensus kleuringsprotocol, levert deze kleuring reproduceerbare resultaten op, die tussen verschillende diagnostische laboratoria uitwisselbaar en consistent zijn (8).

Een toename van het aantal AGNOR's is gecorreleerd met een verhoogde biochemische activiteit en resulteert uiteindelijk in een verhoogde proliferatie van de tumoreuze mestcellen (9, 10). Een verhoogde celproliferatie is geassocieerd met een afname van de

overlevingstermijn van het dier. Door middel van overlevingscurves is vastgesteld dat bij honden met mestceltumoren, waarin de gemiddelde hoeveelheid AGNOR's per tumorcelkern meer dan 2,25 bedroeg, de ziekte ongunstig verliep (11). Dit heeft geresulteerd in de therapeutische consequentie dat bij een vastgestelde AGNOR-index van meer dan 2,25 een wetenschappelijk valide advies gegeven mag worden het dier medicamenteus na te behandelen na (in)complete chirurgische excisie van de mestceltumor.

#### • KI-67

KI-67 is een eiwit dat in de celkern tot expressie komt gedurende alle actieve fases van de celcyclus (G1, S, G2, mitose). Expressie is



**Figuur 3. Expressie van KI-67 in de celkern van tumoreuze mestcellen.** De aanwezigheid van KI-67 eiwit in de celkern leidt tot een bruine aankleuring van de kern (pijl). A; graad 2 mestceltumor. Er blijken 27 positieve tumorcelkernen per 1000 tumorcelkernen aanwezig te zijn. B; graad 2-mestceltumor. In deze tumor is er een erg hoge KI-67-labelingsindex van 577 positieve tumorcelkernen per 1000 tumorcelkernen. Deze labelingsindex wordt computermatig vastgesteld door middel van beeldanalysesoftware (Cell D, Olympus). A, B. Objectief 20x. Wanneer de labelingsindex voor KI-67  $> 93/1000$  bedraagt, kan er na excisie van het proces een gefundeerd advies tot medicamenteuze nabehandeling worden gegeven. Bij een labelingsindex  $< 93/1000$  is chirurgische excisie van het proces voldoende en wordt medicamenteuze nabehandeling beschouwd als overbehandeling.

afwezig in rustende cellen in de Go-fase van de celcyclus. Hierdoor is de aanwezigheid van KI-67-eiwit strikt geassocieerd met celproliferatie. KI-67 kan zichtbaar worden gemaakt door middel van een immunohistochemische procedure (figuur 3). De mate van celproliferatie blijkt bij cutane mestceltumoren van de hond een prognostische marker te zijn (12, 13). In de studie van Abadie et al (12) werd aangetoond dat de prognose ongunstig was wanneer meer dan 93 van de 1000 tumoruze mestcellen KI-67 tot expressie brengen. Therapeutisch betekent dit dat bij een KI-67-expressie van meer dan 93 per 1000 positieve tumorcellen een gegrond advies mag worden gegeven om medicamenteus na te behandelen na (in)complete chirurgische excisie van de mestceltumor.

Inmiddels hebben wij vele honderden mestceltumoren op deze manier geanalyseerd. Hierdoor konden wij de resultaten van de hierboven vermelde mitose-index (MI) vergelijken met de resultaten van de AGNOR- en KI-67-labelingsindices. Bij deze vergelijking valt op dat mestceltumoren met een MI groter dan 5, AGNOR en KI-67 labelingsindices vertonen die boven de kritische grenzen uitstijgen (zie hierboven), maar dat dit omgekeerd niet geldt. Het komt voor dat mestceltumoren met een MI tussen 0 en 5 toch AGNOR- en KI-67-labelingsindices hebben die boven de kritische grenzen uitstijgen. De interpretatie van deze waarneming is niet eenduidig, maar deze bevinding kan er op duiden dat de MI als voorspellende waarde voor het metastaserend vermogen van een mestceltumor, gebruikmakend van de afkapwaarde MI = 5 (6), mogelijk wel een sensitieve uitslag oplevert, maar niet zozeer een specifieke uitslag. Om deze reden wordt geadviseerd de AGNOR- en KI-67-labelingsindices in een mestceltumor bepalend te laten zijn voor het afgeven van een advies tot aanvullende chemotherapie na (in)complete excisie van de tumor. Een dergelijk advies moet natuurlijk te

verenigen zijn met de specifieke situatie en wensen van de eigenaar. Deze maken het soms onmogelijk een aanvullende chemotherapie te geven.

Zoals hierboven is gemeld, blijken graad 2-mestceltumoren bij de hond een heterogeen klinisch verloop te vertonen; voor een deel van de graad 2-tumoren volstaat complete excisie als therapie, terwijl een ander deel van de graad 2-tumoren een metastaserend vermogen heeft. De resultaten van het bovengenoemde onderzoek naar de labelingsindices van AGNOR en KI-67 bevestigen het heterogene karakter van de graad 2-mestceltumoren. Op basis van de door ons vastgestelde labelingsindices in een grote groep van cutane mestceltumoren (n=323) blijkt voor 75 procent van de graad 2-mestceltumoren excisie van het proces afdoende. Maar voor de overige 25 procent geldt dat chirurgische excisie eigenlijk moet worden gevolgd door een medicamenteuze nabehandeling (figuur 4).

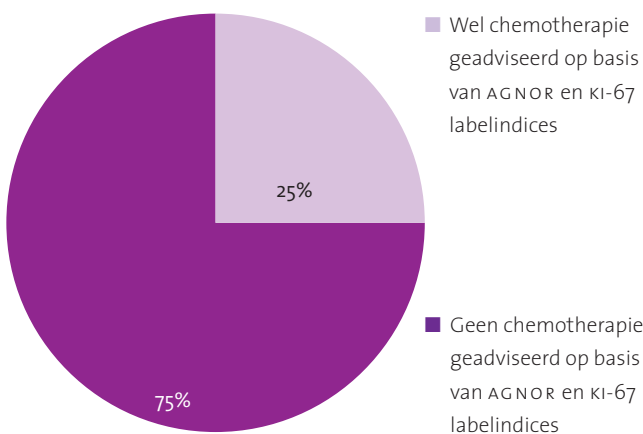
#### C-kit receptor

c-Kit receptor, ook wel KIT genoemd, is volgens de internationaal geaccepteerde 'cluster of differentiation'-nomenclatuur ingedeeld als CD117. Deze transmembraanreceptor komt vooral tot expressie in de verschillende celtypen afkomstig uit de hemopoëtische reeks, zoals mestcellen, maar is niet specifiek voor de hemopoëtische reeks (14). De transmembrane lokalisatie van deze receptor resulteert bij immunohistochemisch onderzoek in aankleuring van de celmembraan. In neoplastische, maligne mestcellen blijkt echter een verschuiving op te treden in de expressie van KIT; naarmate de maligniteit stijgt, neemt de membraneuze aankleuring af en neemt de cytoplasmatische en/of perinucleaire aankleuring van de tumorcellen toe. De mate waarin deze cytoplasmatische translocatie van KIT optreedt, wordt semikwantitatief vastgesteld. Deze cytoplasmatische translocatie van KIT in maligne mestcellen is overigens positief gecorreleerd met hoge AGNOR- en KI-67-labelingsindices (15). Deze correlatie in aanmerking genomen, leveren de kwantitatieve AGNOR- en KI-67-labelingsindices een meer solide leidraad voor het geven van een advies tot het al dan niet medicamenteus nabehandelen van het dier na excisie van de tumor, dan de resultaten van de semikwantitatieve bepaling van cytoplasmatische translocatie van KIT in tumoruze mestcellen.

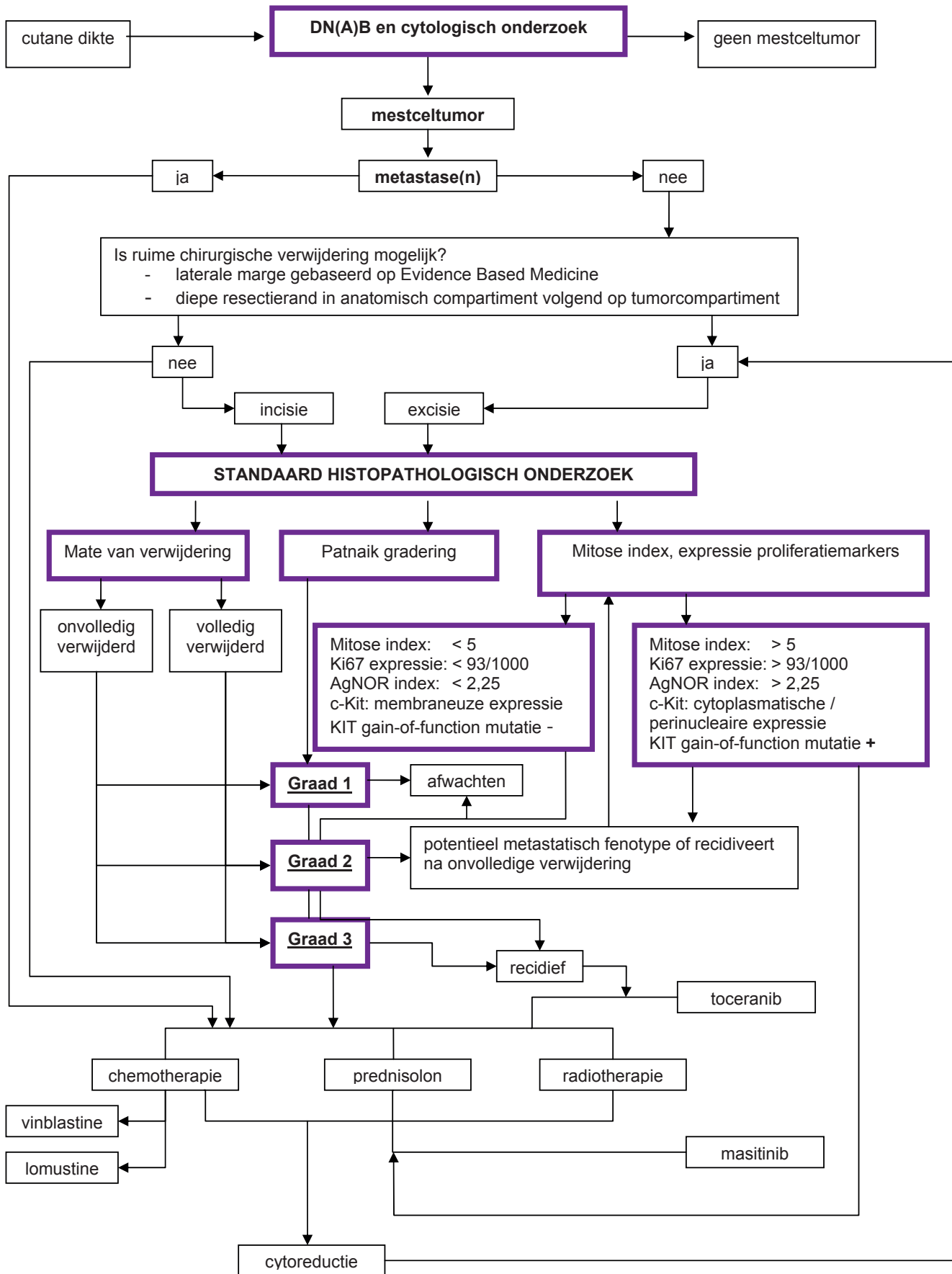
#### C-Kit receptor-mutatieanalyse

Voor de volledigheid bespreken we ook de analyse van de mutatiestatus van de c-kit receptor door middel van PCR en sequentieanalyse in cutane mestceltumoren, hoewel dit geen histopathologische bepaling is. De mutatiestatus van deze receptor in de tumorcellen bepaalt of nieuwe antitumormiddelen uit de groep van de receptor tyrosinekinaseremmers, die hieronder nader worden besproken, een therapeutisch effect kunnen hebben.

c-Kit receptor is in niet neoplastische mestcellen een transmembraanreceptor. Het natuurlijke ligand dat aan deze receptor bindt, is 'stem cell factor' (SCF). Na binding van dit ligand aan KIT treedt dimerisatie op van deze receptor en treedt fosforylatie op van bepaalde tyrosineresiduen in de cytoplasmatische staart van deze receptor. Deze gefosforyleerde tyrosineresiduen activeren vervolgens cytoplasmatische signaaltransductiepaden, die uiteindelijk leiden tot biologische effecten zoals



**Figuur 4. Frequentie van potentieel metastatische fenotypes binnen de opgewerkte graad 2 cutane mestceltumoren van de hond (n=323).** De labelingsindices voor AGNOR en KI67 in een grote groep mestceltumoren van de hond bevestigen dat graad 2-mestceltumoren heterogeen zijn; 75 procent van deze tumoren kan worden beschouwd als lokale tumor, maar de overige 25 procent van deze mestceltumoren blijkt een potentieel metastatisch fenotype te bezitten.



**Figuur 5.** Klinisch-pathologisch-therapeutisch algoritme voor cutane mestceltumoren bij de hond. De bijdragen van de pathologie aan het klinisch opwerken zijn paars omkaderd.

celproliferatie en remming van apoptose (16, 17). Deze ligandafhankelijke receptoractivering is van groot belang voor de regulering van de biologie van de mestcel.

Bij ongeveer 25 procent van de cutane mestceltumoren van de hond is een aantal mutaties in het canine KIT-gen geïdentificeerd, waardoor een functioneel afwijkend KIT-eiwit ontstaat (18). Deze gemuteerde KIT-eiwitten vertonen een SCF-onafhankelijke dimerisatie. Een dergelijke ligand-onafhankelijke, constitutieve receptordimerisatie leidt tot permanente activering van deze receptor en de voortdurende activering van signaaltransductiepaden in de cel. Dergelijke 'gain-of-function'-mutaties kunnen dus leiden tot permanent geactiveerde signaaltransductiepaden, die resulteren in ongebreidelde celproliferatie en tumorvorming.

Vanuit therapeutisch oogpunt zijn de constitutief geactiveerde signaaltransductiepaden echter ook belangrijk als aangrijpingspunt voor de recent op de markt verschenen 'receptor tyrosinekinaseremmers', zoals masitinib (Masivet®) en toceranib (Palladia®) (19). Deze middelen remmen de excessieve fosforylatie en activering van signaal transductiepaden door de gemuteerde c-kit receptor.

De aanwezigheid van 'gain of function'-mutaties in het KIT-gen en de daarmee samenhangende gevoeligheid van mestceltumoren voor de receptor tyrosinekinaseremmers, kan worden opgespoord door middel van PCR en sequentieanalyse van de PCR-producten. Hierbij moet men bij voorkeur gebruik maken van het DNA dat uit de ingestuurde formalinegefixeerde mestceltumor is verkregen. Op dit moment zijn er echter nauwelijks laboratoria die deze KIT-mutatieanalyse uitvoeren. Er is bovendien nog geen enkel laboratorium dat deze mutatieanalyse uitvoert op DNA dat is verkregen uit formalinegefixeerde mestceltumoren.

**Klinisch-pathologisch-therapeutisch algoritme voor cutane mestceltumoren van de hond**

Ten behoeve voor het overzicht van de lezer worden de belangrijkste stappen en processen bij het opwerken van de cutane mestceltumor bij de hond nog eens samengevat in de vorm van een 'flowschema' (figuur 5). In dit 'flowschema', waarin de bijdragen vanuit de pathologie in een paarse kleur omkaderd zijn, wordt aangegeven op welke wijze de resultaten van het cytologische, histopathologische en (immuun)histochemische onderzoek het behandelingsprotocol van een individuele hond met een mestceltumor beïnvloeden. Voor nadere achtergrondinformatie over de chirurgische en medicamenteuze aspecten van het algoritme verwijzen we de lezer naar de referenties 20 tot 41.

**REFERENTIES**

1. Thamm DH and Vail DM. Mast cell tumors. In: Small Animal Clinical Oncology. Withrow SJ, Vail DM (Editors), Saunders, 4e druk, 2007.
2. Pavletic MM. Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery. Ames, Iowa, Wiley Blackwell 2010.
3. Misdorp W. Mast cells and canine mast cell tumours. A review. Vet Q 2004; 26: 156-169.
4. Northrup NC, Howerth EW, Harmon BG, Brown CA, Carmicheal KP, Garcia AP, Latimer KS, Munday JS, Rakich PM, Richey LJ, Stedman NL and Gieger TL. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous

- mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. Vet Diagn Invest 2005; 17: 561-564.
5. Welle MM, Bley CR, Howard J and Rüfenacht S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. Vet Dermatol 2008; 19: 321-339.
6. Romansk EM, Reilly CM, Kass PH, Moore PF and London CA. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. Vet Pathol 2007; 44: 335-341.
7. Elston L, Sueiro FA, Cavalcanti J and Metze K. The importance of the mitotic index as a prognostic factor for canine cutaneous mast cell tumors. A Validation study. Vet Pathol 2009; 46: 362-364.
8. Tere D. AGNOR staining and quantification. Micron 2000; 31: 127-131.
9. Hall PA, Crocker J, Watts A, Stansfeld AG. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. Histopathology 1988; 12: 373-381.
10. Eskelinen MJ, Lipponen PK, Collan Y and Syrjänen KJ. The role of nucleolar organiser regions as prognostic factors in breast cancer. Eur J Cancer 1991; 27: 989-992.
11. Simoes JP, Schoning P and Butine M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. Vet Pathol 1994; 31: 637-647.
12. Abadie JJ, Amardeilh MA and Delverdier ME. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. J Am Vet Med Assoc 1999; 215: 1629-1634.
13. Scase TJ, Edwards D, Miller J, Henley W, Smith K, Blunden A and Murphy S. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. J Vet Intern Med 2006; 20: 151-158.
14. Timokhina I, Kissel H, Stella G and Besmer P. Kit signalling through PI3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. EMBO J 1998; 17: 6250-6262.
15. Gil da Costa RM, Matos E, Rema A, Lopes C, Pires MA and Gärtner F. CD117 immunoeexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. BMC Vet Res 2007; 21: 3-19.
16. Serve H, Yee NS, Stella G, Sepp-Lorenzino L, Tan JC and Besmer P. Differential roles of PI3-kinase and kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. EMBO J 1995; 14: 473-483.
17. Timokhina I, Kissel H, Stella G and Besmer P. Kit signalling through PI3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. EMBO J 1998; 17: 6250-6262.
18. Letard S, Yang Y, Hanssens K, Palmerini F, Leventhal PS, Guery S, Moussy A, Kinet J, Hermine O and Dubreuil P. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. Mol Cancer Res 2008; 6: 1137-1145.
19. Khanna C and Gordon I. Catching cancer by the tail: new perspectives on the use of kinase inhibitors. Clin Cancer Res. 2009; 15: 3645-3647.
20. Cooper M, Tsai X and Bennett P. Combination ccnu and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. Vet Comp Oncol. 2009; 7: 196-206.
21. Dobson J, Cohen S and Gould S. Treatment of canine mast cell tumours with prednisolone and radiotherapy. Vet Comp Oncol 2004; 2: 132-141.
22. Fulcher RP, Ludwig LL, Bergman PJ, Newman SJ, Simpson AM and Patnaik AK. Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumours in dogs. J Am Vet Med Assoc. 2006; 228: 210-215.
23. Hahn KA, King GK and Carreras JK. Efficacy of radiation therapy for incompletely excised grade III mast cell tumours in dogs. J Am Vet Med Assoc. 2004; 224: 79-82.
24. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, Devauchelle P, Leblanc A, Legendre A, Powers B, Leventhal PS, Kinet JP, Palmerini F, Dubreuil P, Moussy A and Hermine O. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors.

- J Vet Intern Med 2008; 22: 1301-1309.
25. Hahn KA, Legendre AM, Shaw NG, Phillips B, Ogilvie GK, Prescott DM, Atwater SW, Carreras JK, Lana SE, Ladue T, Rusk A, Kinet JP, Dubreuil P, Moussy A and Hermine O. Evaluation of 12- and 24- month survival rates after treatment with masitinib in dogs with nonresectable mast cell tumors. *Am J Vet Res.* 2010; 71: 1354-1361.
  26. Hayes A, Adams V, Smith K, Maglennon G and Murphy S. Vinblastine and prednisolone chemotherapy for surgically excised grade III canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2007; 5: 168-76.
  27. Hosoya K, Kisseberth WC, Alvarez FJ, Lara-Garcia A, Beamer G, Stromberg PC and Couto CG. Adjuvant CCNU (lomustine) and prednisone chemotherapy for dogs with incompletely excised grade 2 mast cell tumours. *J Am Anim Hosp Assoc* 2009; 45: 14-18.
  28. LaDue T, Price GS, Dodge R, Page RL and Thrall DE. Radiation therapy for incompletely resected canine mast cell tumours. *Vet Radiat Ultra* 1998; 39: 57-62.
  29. London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, Boucher JF, Rusk AW, Rosenberg MP, Henry CJ, Mitchener KL, Klein MK, Hintermeister JG, Bergman PJ, Couto GC, Mauldin GN and Michels GM. Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3856-3865.
  30. McCaw DL, Milner MA, Ogilvie GK, Withrow SJ, Brewer WG, Klein MK, Bell FW and Anderson SK. Response of canine mast cell tumors to treatment with oral prednisolone. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1994; 8: 406-408.
  31. Michels GM, Knapp DW, DeNicola DB, Glickman N, and Bonney P. Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumours with histopathologically tumour-free versus nontumour-free margins: a retrospective study of 31 cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002; 38: 458-466.
  32. Mullins MN, Dernel WS, Withrow SJ, Ehrhart EJ, Thamm DH and Lana SE. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumours treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998 - 2004). *J Am Vet Med Assoc* 2006; 228, 91-95.
  33. Poirier VJ, Adams WM, Forrest LJ, Green EM, Dubielzig RR and Vail DM. Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumours. *J Am Anim Hosp Assoc* 2006; 42: 430-434.
  34. Rassnick KM, Moore AS, Williams LE, London CA, Kintzer PP, Engler SJ and Cotter SM. Treatment of canine mast cell tumours with CCNU (lomustine). *J Vet Intern Med* 1999; 13: 601-605.
  35. Seguin B, Besancon MF, McCallan JL, Dewe LL, Tenwolde MC, Wong EK and Kent MS. Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumours: 28 dogs (1994-2002). *J Vet Intern Med* 2006; 20: 933-940.
  36. Seguin B, Leinman NF, Bregazzi VS, Ogilvie GK, Powers BE, Dernel WS, Fettman MJ and Withrow SJ. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumours treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 1120-1123.
  37. Simpson AM, Ludwig LL, Newman SJ, Bergman PJ, Hottinger HA and Patnaik AK. Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumours in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 236-240.
  38. Stanclift RM and Gilson SD. Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumours in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232: 53-62.
  39. Thamm DH, Maudlin EA and Vail DM. Prednisolone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor - 41 cases (1992-1997) *J of Vet Int Med* 1999; 13, 491-497.
  40. Thamm DH, Turek MM and Vail DM. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *J Vet Med Sci* 2006; 68: 581-587.
  41. Weisse C, Shofer FS and Sorenmo K. Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumours following complete surgical excision. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002; 38: 71-73.