

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**KLINIČNO-PATOLOŠKE ZNAČILNOSTI KOŽNIH
MASTOCITOMOV PSOV, POMEMBNE ZA NAPOVED
POTEKA BOLEZNI**

**CLINICO-PATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF
CANINE CUTANEOUS MAST CELL TUMOURS,
IMPORTANT FOR PROGNOSIS**

Žiga Žagar

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 636.7.09:616.5-006:636-036(043.2)

**KLINIČNO-PATOLOŠKE ZNAČILNOSTI KOŽNIH
MASTOCITOMOV PSOV, POMEMBNE ZA NAPOVED
POTEKA BOLEZNI**

**CLINICO-PATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF
CANINE CUTANEOUS MAST CELL TUMOURS,
IMPORTANT FOR PROGNOSIS**

Žiga Žagar

Delo je bilo pripravljeno v skladu s pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom doc. dr. Darje Pavlin in somentorstvom doc. dr. Tanje Švara, na Kliniki za male živali in Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete v Ljubljani, v okviru programskih skupin P4-0053 in P4-0092.

Ljubljana, 2018

POVZETEK

Ključne besede: Bolezni psov; kožni mastocitom; ocena stadija novotvorbe – metode; histološke tehnike – metode; stanje preživetja; prognoza; psi

Namen raziskovalne naloge je bil proučiti uporabnost dvostopenjskega ocenjevanja stopnje malignosti mastocitomov (MCT) po Kiupelu v primerjavi s starejšim, tristopenjskim ocenjevanjem po Patnaiku za napoved poteka bolezni, ter proučiti uporabnost vzorca KIT-barvanja in izražanja PD-1 in PD-L1 kot napovednega dejavnika za potek bolezni pri psih s kožnimi MCT. Raziskavo smo opravili na arhivskih parafinskih vzorcih 59 kožnih MCT, odvzetih 57 psom, v starosti med 3 in 13 let. Tumorji so bili najpogosteje locirani na trupu in okončinah (22/59), manj pogosto na glavi (5/59), modniku (3/59), vratu, hrbtnu in repu (1/59), medtem ko za 4 tumorje lokacija ni znana. Tumorji so bili premera med 0,3 in 10 cm, s povprečno velikostjo 1,75 cm. 47 psov je imelo po 1 tumor, 6 jih je imelo 2 tumorja, za 4 podatek ni znan. Ugotovili smo 5 primerov lokalne ponovitve bolezni in 5 primerov zasevkov. Kot posledica MCT je poginilo oz. bilo evtanaziranih 11 psov. Histološko stopnjo malignosti tumorjev smo rutinsko določili po Patnaiku (1984) in Kiupelu (2011) ter imunohistokemično določili vzorec KIT-barvanja ter izražanje antigenov PD-1 in PD-L1. Kot histološki gradus I po Patnaiku smo ocenili 18 (30,5 %) MCT, 27 (45,8 %) MCT kot histološki gradus II in 14 (23,7 %) MCT kot histološki gradus III. Glede na kriterije po Kiupelu smo 44 (74,6 %) MCT ocenili kot MCT nizke stopnje malignosti in 15 (25,4 %) MCT kot MCT visoke stopnje malignosti. Vsi MCT histološkega gradusa I in 26/27 (96,3 %) MCT gradusa II po Patnaiku so bili nizke stopnje malignosti po Kiupelu. Vsi MCT histološkega gradusa III in 1/27 (3,7 %) gradusa II po Patnaiku so bili ocenjeni kot MCT visoke stopnje malignosti po Kiupelu. 36/59 (61,0 %) tumorjev je izražalo vzorec KIT-barvanja I, vzorec KIT-barvanja II in vzorec KIT-barvanja III pa smo ugotovili pri po 11 (18,6 %) MCT. Izražanje antiga PD-1 smo ugotovili pri 31 (54,2 %) MCT. Določili smo 3 različne vzorce barvanja: difuzno citoplazemsko reakcijo, reakcijo na površini celične membrane in perinuklearno reakcijo. Izražanje antiga PD-L1 smo ugotovili pri 15/42 (35,7 %) preiskanih MCT. Antigen PD-L1 so izražale tumorske celice z difuzno citoplazemsko reakcijo dveh različnih stopenj.

SUMMARY

Key words: Dog diseases; mast cell tumour, skin; neoplasms grading – methods; histological techniques – methods; survival rate; prognosis; dogs

The goals of this study were to evaluate the prognostic utility of histologic grade (2-tier histologic grading system as proposed by Kiupel et al. (2011) vs. 3-tier grading system by Patnaik et al. (1984)), KIT staining patterns and expression of antigen PD-1 and its ligand PD-L1 in canine cutaneous mast cell tumours (MCTs). The study was performed on 59 cutaneous MCTs from 57 dogs. The anatomical locations of MCTs were: trunk and extremities (22/59), head (5/59), scrotum (3/59), neck, back and tail (1/59 each), locations of 4 tumors were not known. Radius of MCTs was between 0.3 and 10 cm (average 1.75 cm). Five cases of local recidive were recognized and 5 cases of metastatic disease. 11/59 dogs died or was euthanized due to MCT-associated disease. Histologic grade was determined routinely based on grading system by Patnaik (18 MCT (30,5 %) were grade I, 27 MCT (45,8 %) grade II and 14 MCT (23,7 %) grade III). Based on Kiupel's grading system there were 44 (74,6 %) low grade MCTs (all grade I and 26/27 grade II MCTs) and 15 (25,4 %) high grade MCTs (all grade III and 1/27 grade II MCTs). 36/59 (61 %) MCTs had KIT-I staining pattern, KIT-II and KIT-III were found in 11 (18,6 %) MCTs each. Expression of antigen PD-1 was present in 31 (54,2 %) MCTs in three different staining patterns (diffuse cytoplasmic, membranous and perinuclear reaction). Expression of PD-L1 in two distinctive levels was found in 15 (35,7 %) examined MCTs. There was statistically significant shorter survival in dogs with grade III MCTs in comparison with grade I and II, dogs with high grade MCTs based on Kiupel system in comparison with low grade MCTs, dogs with KIT-III staining pattern compared with KIT-I and in dogs in which tumours did not express PD-1 compared to those where this expression was present. The results of our study show that the prognosis of the disease correlates with histological grade, where the Kiupel system has better prognostic value compared to Patnaik's. Outcome of the disease also correlates with KIT staining pattern in MCTs. Canine cutaneous MCTs express both PD-1 antigen as well as its ligand PD-L1, which could represent a new approach for selection of currently available biological therapies for treatment of canine MCT. Expression of PD-1 in MCTs correlates with outcome of the disease, where dogs without PD-1 expression have significantly better prognosis.

SEZNAM OKRAJŠAV

AgNOR	s srebrom dokazljiva regija za organizacijo nuklolušov (angl. argyrophilic nucleolar organiser region)
bFGF	bazični fibroblastni rastni faktor (angl. basic fibroblast growth factor)
HPF	vidno polje visoke povečave (angl. high power field)
IPDRČ	Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete UL
MCT	mastocitom
MI	mitotični indeks
PCNA	jedrni antigen proliferirajočih celic (angl. proliferating cell nuclear antigen)
PDGFR	receptor za trombocitni rastni faktor (angl. platelet-derived growth factor receptor)
PD-1	receptor programirane celične smrti 1 (angl. programmed cell death-1)
PD-L1	ligand za receptor programirane celične smrti 1 (angl. programmed cell death-1 ligand)
RTK	receptor tirozin kinaze
RTKI	inhibitor receptorja tirozin kinaze (angl. receptor tyrosine kinase inhibitor)
SCF	dejavnik matičnih celic (angl. stem cell factor)
TIB	biopsija s tanko iglo
TIL	tumor-infiltrirajoči limfociti
TKI	inhibitorji tirozin kinaze (angl. tyrosine kinase inhibitors)
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze alfa (angl. tumor necrosis factor alfa)
VEGF	vaskularni endoteljski rastni faktor (angl. vascular endothelial growth factor,)
VEGFR2	receptor 2 za vaskularni endotelni rastni faktor (angl. vascular endothelial growth factor receptor 2)

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	II
SUMMARY	III
SEZNAM OKRAJŠAV	IV
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED LITERATURE	4
2.1 BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI MASTOCITOV PSOV	4
2.2 MASTOCITOMI PSOV	4
2.2.1 Patogeneza	5
2.2.2 Incidencija in dejavniki tveganja	5
2.2.3 Klinična slika	6
2.2.3.1 Paraneoplastični sindrom	7
2.2.4 Diagnostične metode	7
2.2.4.1 Biopsija s tanko iglo	8
2.2.4.2 Incizijska biopsija	10
2.2.4.3 Ekscizijska biopsija	10
2.2.4.4 Določitev kliničnega stadija	10
2.2.5 Prognoza	12
2.2.5.1 Histološka stopnja malignosti	13
2.2.5.2 Mitotični indeks	15
2.2.5.3 Izraženost KIT	16
2.2.5.4 Ki-67 protein	16
2.2.5.5 Jedrni antigen proliferirajočih celic (PCNA)	17
2.2.5.6 AgNOR	17
2.2.5.7 AgNOR x Ki-67	17
2.2.5.8 Klinični stadij	18
2.2.5.9 Anatomska lokacija	18
2.2.5.10 Sistemski znaki	18
2.2.5.11 Število tumorjev	18
2.2.5.12 Drugi napovedni dejavniki	19
2.2.6 Zdravljenje	19
2.2.6.1 Kirurško zdravljenje	19
2.2.6.2 Radioterapija	20
2.2.6.3 Kemoterapija	21
2.2.6.4 Terapija z glukokortikoidi	22
2.2.6.5 Elektrokemoterapija	23
2.2.6.6 Elektrogenska terapija	23
2.2.6.7 Inhibitorji tirozin kinaze	24
2.2.6.8 Ostale možnosti zdravljenja	24
2.2.6.9 Podpora terapija	24

2.3 PD-1 IN PD-L1.....	25
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 KRITERIJI ZA VKLJUČITEV MCT V RAZISKAVO	27
3.2 OBDELAVA VZORCEV TUMORJEV ZA PATOHISTOLOŠKO IN IMUНОHISTOKEMIČNO PREISKAVO	27
3.3 BARVANJE S HEMATOKSILINOM IN EOZINOM TER TOLUIDINSKIM MODRILOM	27
3.4 IMUНОHISTOKEMIČNO OZNAČEVANJE	28
3.4.1 Pozitivne in negativne kontrole pri imunohistokemičnem označevanju	29
3.5 KRITERIJI ZA OCENJEVANJE HISTOLOŠKE STOPNJE MALIGNOSTI MASTOCITOMOV	30
3.6 OCENA IMUНОHISTOKEMIČNE REAKCIJE NA CD117 (c-kit) – VZOREC KIT-BARVANJA	30
3.7 OCENA IMUНОHISTOKEMIČNE REAKCIJE NA PD-1 IN PD-L1	30
3.8 STATISTIKA.....	31
4 REZULTATI.....	32
4.1 HISTOLOŠKE STOPNJE MALIGNOSTI MCT	32
4.2 IMUНОHISTOKEMIČNO IZRAŽANJE ANTIGENA CD117 (c-kit) – VZOREC KIT-BARVANJA	37
4.3 IMUНОHISTOKEMIČNO IZRAŽANJE ANTIGENA PD-1	40
4.4 IMUНОHISTOKEMIČNO IZRAŽANJE ANTIGENA PD-L1	42
5 RAZPRAVA.....	47
5.1 HISTOLOŠKA STOPNJA MALIGNOSTI IN KORELACIJA S KLINIČNIMI ZNAČILNOSTMI	48
5.2 IZRAŽANJE ANTIGENA CD117 (c-kit) IN KORELACIJA S KLINIČNIMI ZNAČILNOSTMI	50
5.3 IZRAŽANJE ANTIGENOV PD-1 IN PD-L1 IN KORELACIJA S KLINIČNIMI ZNAČILNOSTMI	51
6 SKLEPI	55
7 ZAHVALA	56
8 LITERATURA	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Citološki razmaz dobro diferenciranega MCT.....	8
Slika 2: Citološki razmaz slabo diferenciranega MCT.....	9
Slika 3: MCT različnih histoloških gradusov po Patnaiku.....	33
Slika 4: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse z MCT različnih histoloških gradusov malignosti po Pataiku.....	35
Slika 5: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse z MCT nizkega in visokega histološkega gradusa malignosti po Kiupelu.....	36
Slika 6: Vzorci KIT-barvanja.....	37
Slika 7: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse z MCT z različnimi vzorci KIT-barvanja.....	40
Slika 8: Vzorci imunohistokemičnega izražanja PD-1.....	41
Slika 9: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse z MCT, ki so izražali/niso izražali PD-1.....	42
Slika 10: Imunohistokemično izražanje PD-L1 v MCT.....	44
Slika 11: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse z MCT, ki so izražali/niso izražali PD-L1.....	46

KAZALO TABEL

Tabela 1: Klinični stadiji MCT po določilih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO).....	11
Tabela 2: Pogostost lokalne ponovitve bolezni, zasevkov in smrtnosti zaradi MCT pri različnih histoloških gradusih MCT po Patnaiku	35
Tabela 3: Pogostost lokalne ponovitve bolezni, zasevkov in smrtnosti zaradi MCT pri MCT nizke in visoke stopnje malignosti po Kiupelu.....	36
Tabela 4: Pogostost različnih vzorcev KIT-barvanja pri MCT različnih histoloških stopenj malignosti po Patnaiku in Kiupelu ter pogostost lokalne ponovitve bolezni, zasevkov in smrtnost zaradi MCT pri različnih vzorcih KIT-barvanja.....	39
Tabela 5: Pogostost izražanja PD-1 in PD-L1 v MCT različnih histoloških stopenj malignosti po Patnaiku in Kiupelu	43
Tabela 6: Pogostost lokalne ponovitve bolezni, zasevkov in smrtnosti zaradi MCT glede na izražanje/neizražanje antiga PD-1 in PD-L1.	45

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Mastocitomi (MCT) so najpogosteji kožni tumorji psov, ki zajemajo približno 21 % vseh kožnih tumorjev pri psih. Zaradi zelo raznolikih bioloških značilnosti, ki variirajo od povsem benignih solitarnih tumorjev, do zelo malignih tumorjev, ki hitro zasevajo in lahko izzovejo različno hude paraneoplastične sindrome, predstavljajo MCT velik diagnostični in terapevtski izziv. Diagnoza, napoved poteka bolezni in terapevtski pristop pri MCT večinoma temeljijo na oceni malignosti (histološkem gradusu), ki ga določimo s patohistološko preiskavo. Dolga leta se je za oceno malignosti najpogosteje uporabljal ocenjevalni sistem, ki so ga opisali Patnaik in sod. (1984), s katerim razlikujemo med MCT gradusa I (dobro diferencirani), MCT gradusa II (zmerno diferencirani) in MCT gradusa III (slabo diferencirani). Zaradi določenih pomanjkljivosti Patnaikovega ocenjevalnega sistema, so Kiupel in sod. (2011) oblikovali predlog dvostopenjskega ocenjevanja, po katerem naj bi ločili med MCT nizke in visoke stopnje malignosti.

V literaturi so poleg ocene malignosti (histološkega gradusa) opisani tudi nekateri drugi dejavniki, ki so v pomoč pri določitvi prognoze MCT, kot so klinični stadij bolezni, pasma, anatomska lokacija, anamneza predhodne ponovitve bolezni, mitotični indeks, vzorec KIT-barvanja, Ki-67 proliferacijski indeks, barvanje AgNOR, AgNOR x Ki-67 indeks ter mutacije v c-KIT onkogenu.

Kiupel in sod. (2004) so prvi opisali, da je vzorec KIT-barvanja v MCT, s katerim prikažemo izražanje KIT receptorja povezan z lokalno ponovitvijo bolezni in časom preživetja. Nasprotno pa je bilo v zadnjem času objavljenih nekaj raziskav, katerih avtorji niso potrdili povezave med vzorcem KIT-barvanja in napovedjo poteka bolezni.

Zaradi pogostosti MCT in njihovega raznolikega biološkega obnašanja ves čas potekajo raziskave novih dejavnikov oz. označevalcev, ki bi lahko bili samostojno ali v kombinaciji z že znanimi označevalci pomembni za določitev napovedi poteka bolezni in izbor zdravljenja.

V humani medicini se že uporabljajo tarčna zdravila v obliki monoklonskih protiteles, ki so usmerjena proti nekaterim celičnim beljakovinam, med drugim proti receptorju programirane celične smrti 1 (PD-1) in ligandu programirane celične smrti 1 (PD-L1). PD-1 in PD-L1 sta poznana kot del signalne poti, ki je močno izražena pri različnih vrstah rakavih obolenj, in s

katero tumorji zavirajo delovanje imunskega sistema. Z vezavo tarčnega zdravila se blokira po poti PD-1 posredovano zavrtje imunskega odziva, vključno z imunskim odzivom proti tumorju.

Visoko izražanje PD-L1 pri nekaterih tumorjih ljudi je povezano tudi z večjo biološko agresivnostjo tumorja in večjim tveganjem za smrt.

Pri psih je podatkov o izražanju PD-1 in PD-L1 malo, izražanje PD-1 je bilo opisano na površini limfocitov, PD-L1 pa v številnih malignih tumorjih, npr. melanomih, tumorjih mlečne žleze, limfomih, sarkomih mehkikh tkiv in hemangiosarkomih. Izražanje PD-L1 je bilo opisano tudi v MCT pri psih, vendar pa doslej ni podatkov kako se PD-L1 izraža v MCT različnih histoloških stopenj malignosti in ali obstaja povezava med izražanjem PD-L1 ter ponovitvijo bolezni in časom preživetja.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

Namen raziskovalne naloge je bil proučiti uporabnost dvostopenjskega ocenjevanja malignosti kožnih MCT po Kiupelu v primerjavi s starejšim, tristopenjskim ocenjevanjem po Patnaiku, za napoved poteka bolezni, ter proučiti uporabnost vzorca KIT-barvanja kot napovednega dejavnika za kožne MCT.

Z raziskovalno nalogo smo želeli pridobiti tudi podatke o izražanju PD-1 in PD-L1 v kožnih MCT različnih histoloških stopenj malignosti. Podatek, da MCT izraža PD-1 in PD-L1 je zelo pomemben, ker bodo psi s takimi tumorji, zlasti tistimi, ki so na mestih, kjer je kirurška odstranitev z dovolj širokim varnostnim robom nemogoča, potencialni kandidati za imunoterapijo.

V nalogi smo poleg tega raziskovali tudi povezavo med izražanjem navedenih celičnih označevalcev ter ponovitvijo bolezni in časom preživetja psov, z namenom, da bi ocenili ali je izražanje PD-1 in PD-L1 v MCT uporabno za napoved poteka bolezni.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

1. Histološka stopnja malignosti kožnih MCT psov, ocenjena po Kiupelu ima večjo napovedno vrednost kot histološka stopnja malignosti MCT psov ocenjena po Patnaiku.
2. Vzorec KIT-barvanja kožnih MCT psov je uporaben napovedni dejavnik, s katerim lahko napovemo ponovitev bolezni in čas preživetja.
3. Kožni MCT psov izražajo antigena PD-1 in PD-L1.
4. Izražanje PD-1 in PD-L1 v kožnih MCT sta uporabna kot napovedna dejavnika, s katerima lahko napovemo ponovitev bolezni in čas preživetja. Poleg tega sta pomembna za izbor kandidatov za tarčno zdravljenje.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI MASTOCITOV PSOV

Mastociti so normalno prisotni v večini tkiv, zlasti na stiku telesa z okoljem (koža, pljuča, gastrointestinalni trakt) (Welle in sod., 2008). Občasno jih najdemo v kostnem mozgu, skoraj nikoli pa v sistemskem obtoku (Blackwood in sod., 2012). Prekurzorji mastocitov nastajajo v kostnem mozgu, najverjetneje iz mielomonocitne celične linije, od koder migrirajo v periferna tkiva in se pod vplivom lokalnih citokinov diferencirajo v zrele mastocite (Misdorp, 2004; Blackwood in sod., 2012).

V citoplazmi zrelih mastocitov so značilne granule, ki se barvajo metakromatično s toluidinskim modrilom in barvanjem po Giemsi (London in Thamm, 2013). Citoplazmatske granule vsebujejo številne bioaktivne substance; heparin, histamin, dejavnik tumorske nekroze alfa (angl. tumor necrosis factor alfa, TNF- α) eozinofilni kemotaktični faktor in različne proteaze (Misdorp, 2004; London in Thamm, 2013). Ob stimulaciji mastociti hitro proizvedejo različne citokine (TNF- α , interleukin-6), rastne faktorje (vaskularni endotelijski rastni faktor (angl. vascular endothelial growth factor, VEGF), bazični fibroblastni rastni faktor (angl. basic fibroblast growth factor, bFGF)), proteaze (triptaza) in lipidne mediatorje (prostaglandin D₂, levkotrien C₄), preko katerih sodelujejo v različnih bioloških procesih kot so celjenje ran, vnetje, preobčutljivostne in alergijske reakcije, indukcija naravnega imunskega odgovora in reakcije na strupe žuželk (Blackwood in sod., 2012; London in Thamm, 2013). Mastociti imajo osrednjo vlogo pri IgE- in IgG-odvisnih alergijskih reakcijah, povezanih s histaminom (Misdorp, 2004).

Zaradi vplivov na številne fiziološke procese se lahko v kombinaciji s proliferacijo mastocitov razvijejo različni paraneoplastični sindromi (Gross in sod., 2005).

2.2 MASTOCITOMI PSOV

Mastocitomi (MCT) so tumorske proliferacije mastocitov. Kožni MCT nastanejo iz mastocitov kože in podkožnega tkiva (Blackwood in sod., 2012).

2.2.1 Patogeneza

Natančna etiologija MCT ni znana, kot pri večini ostalih tumorjev pa je najverjetnejši rezultat delovanja večih različnih dejavnikov (Welle in sod. 2008). Večja incidenca pri določenih pasmah nakazuje na genetsko komponento (Welle in sod., 2008; London in Thamm, 2013). Razvoj MCT so včasih povezovali s kroničnim kožnim vnetjem in uporabo kožnih irritantov, vendar epidemiološke raziskave MCT pri psih teh hipotez niso potrdile (London in Thamm, 2013). Avtorji nekaterih raziskav ugotavljajo virusni vzrok, vendar ultrastruktturna preiskava ni razkrila virusnih partiklov, niti ni dokazov o horizontalnem prenosu (Misdorp 2004, London in Thamm, 2013).

Najbolj verjetna in najbolje opisana molekularna anomalija pri MCT psov vključuje KIT, receptor tirozin kinaze (RTK). KIT je receptor, normalno izražen na površini številnih celic, tudi mastocitov, ki ga kodira proto-onkogen c-kit. Ligand za KIT je dejavnik matičnih celic (angl. stem cell factor, SCF), ki po vezavi sproži dimerizacijo receptorja, posledično fosforilacijo in pospešitev proliferacije, diferenciacije in zorenja normalnih mastocitov (Misdorp 2004; Welle in sod., 2008; London in Thamm, 2013). RTK povezujejo tudi z angiogenezo v tumorjih in procesom zasevanja (Blackwood in sod., 2012). SCF je ključen za diferenciacijo zrelih mastocitov *in vitro* in inhibicija KIT sproži apoptozo mastocitov psa (London in Thamm, 2013). Izraženost KIT z imunohistokemičnim barvanjem lahko prikažemo v mastocitih in tumorskih celicah iz MCT. Izraženost je mnogo večja v slabo diferenciranih MCT (Welle in sod., 2008). V velikem deležu MCT psov so na c-kit genu prisotne mutacije. Posledica je nenehna aktivacija KIT receptorja neodvisno od liganda in s tem neregulirana signalna kaskada, kar bi lahko pripomoglo k tumorski transformaciji celic (Misdorp 2004; London in Thamm, 2013). Dokazana je statistično značilna povezava med prisotnostjo mutacij na c-kit genu in višjo histološko stopnjo malignosti tumorja, ne pa tudi med prisotnostjo mutacij in pasmo (Zemke in sod., 2002). Vzrok za visok delež mutacij v MCT psov ni znan (London in Thamm, 2013).

2.2.2 Incidenca in dejavniki tveganja

MCT predstavljajo 16 – 21 % vseh kožnih tumorjev psov in so najpogostejsi kožni tumor pri psih. Povprečna starost psov z MCT je med 7,5 in 9 let, vendar se občasno ugotovijo tudi pri

psih, mlajših od 6 mesecev. Predisponirane so pasme, ki izvirajo iz buldoga (bokser, bostonski terier, angleški bulldog, mops) ter labradorci, zlati prinašalci, šnавcerji, koker španjeli, rodezijski grebenarji, beagli, ameriški Staffordshire terierji, weimarski ptičarji, avstralski ovčarji in shar-peiji. Mopsi naj bi pogosteje razvili multiple MCT, ki pa so benigne narave. Nasprotno naj bi se pri shar-peijih pogosteje razvili slabo diferencirani, biološko agresivnejši tipi MCT. Opisane so nekatere pasemske predisponirane lokacije, npr. rep pri rodezijskem grebenarju in zadnje okončine pri bostonskih in ameriških Staffordshire terierjih. Spol živali ne vpliva na večjo pojavnost MCT (Welle in sod., 2008; Blackwood in sod., 2012; London in Thamm, 2013).

2.2.3 Klinična slika

Večina MCT pri psih nastane v koži ali podkožju in so običajno solitarni tumorji, 11 – 14 % pacientov pa razvije multiple tumorje (London in Thamm, 2013). Večina, 50 – 60 % kožnih MCT se razvije na trupu, 25 – 40 % na okončinah in približno 10 % na glavi in vratu. Na splošno so MCT pogostejši na zadnji polovici telesa (Welle in sod., 2008). Visceralna oblika MCT oz. diseminirana ali sistemska mastocitoza je dokumentirana, vendar običajno sledi agresivnemu tipu primarnega tumorja (London in Thamm, 2013).

Makroskopski izgled kožnih MCT je izjemno raznolik in do neke mere korelira s histološko stopnjo malignosti. Kožna tvorba, ki raste in se manjša, nakazuje na MCT. Dobro diferencirani MCT nizke stopnje malignosti so običajno solitarni, čvrstoelastične konsistence, počasi rastoči, premera 1 – 4 cm, lahko so brezvlačni, vendar običajno ne ulcerirajo. Pogosto so prisotni več kot 6 mesecev pred diagnozo. Slabo diferenciarni MCT so hitro rastoči, ulcerirani, pruritični in pogosto veliki. Okoliško tkivo je lahko vneto in edematozno. V okolini primarnega tumorja se pogosto razvijejo satelitski zasevki (Welle in sod., 2008; Blackwood in sod. 2012; London in Thamm, 2013). MCT visoke stopnje malignosti običajno zasevajo v področne bezgavke, možni pa so tudi hematogeni zasevki v jetra, vranico in kostni mozeg (Misdorp 2004; Blackwood in sod., 2012).

Podkožna oblika MCT, ki je na otip mehka, se pogosto napačno diagnosticira kot lipom (London in Thamm, 2013). Zaradi številnih različnih kliničnih podob moramo MCT izključiti kot diferencialno diagnozo vsake kožne tvorbe (Welle in sod., 2008).

Palpacija MCT med kliničnim pregledom ali travma tumorja lahko povzročita degranulacijo mastocitov in posledično sproščanje histamina in drugih vazoaktivnih substance, kar ima za posledico edem in eritem okoli tumorja (t. i. Darierov znak) (Gross in sod., 2005; Welle in sod., 2008).

2.2.3.1 Paraneoplastični sindrom

Znaki, povezani z izločanje bioaktivnih substanc iz citoplazmatskih granul mastocitov (histamin, heparin, proteolitični encimi), se pojavijo pri do polovici vseh psov z MCT (Welle in sod., 2008). Tumorske celice v MCT vsebujejo do 50-krat več histamina kot normalni mastociti (Welle in sod., 2008). Poleg že omenjenega Darierovega znaka, proteolitični encimi in vazoaktivni amini lokalno povzročajo zapozneno celjenje ran, ulceracije in koagulacijske motnje, ki lahko vodijo do lokalnih krvavitvah ob kirurški eksciziji, biopsiji s tanko iglo (TIB) ali grobi manipulaciji s tumorjem (Welle in sod., 2008; Blackwood in sod., 2012).

Najobičajnejši sistemski učinki so gastrointestinalni znaki. Histamin preko H₂ receptorjev pospeši želodčno peristaltiko in stimulira parietalne celice želodca k povečanemu izločanju klorovodikove kisline, kar vodi k nastanku ulceracij. Gastrointestinalne ulceracije povzročajo klinične zname kot so neješčnost, bruhanje, slabost, hematohezija, trebušna bolečina, melena. Zaradi gastrointestinalnih krvavitev lahko sekundarno ugotavljam anemijo (Welle in sod., 2008; Blackwood in sod., 2012). Pri raztelesbah psov z MCT so bile gastrointestinalne ulceracije ugotovljene v 35 – 83 % primerov (Howard in sod., 1969).

Redka, vendar možna, je akutna anafilaktična reakcija in posledični kolaps po nenadni sprostivti velikih količin histamina iz tumorskih mastocitov (Welle in sod., 2008; Blackwood in sod., 2012).

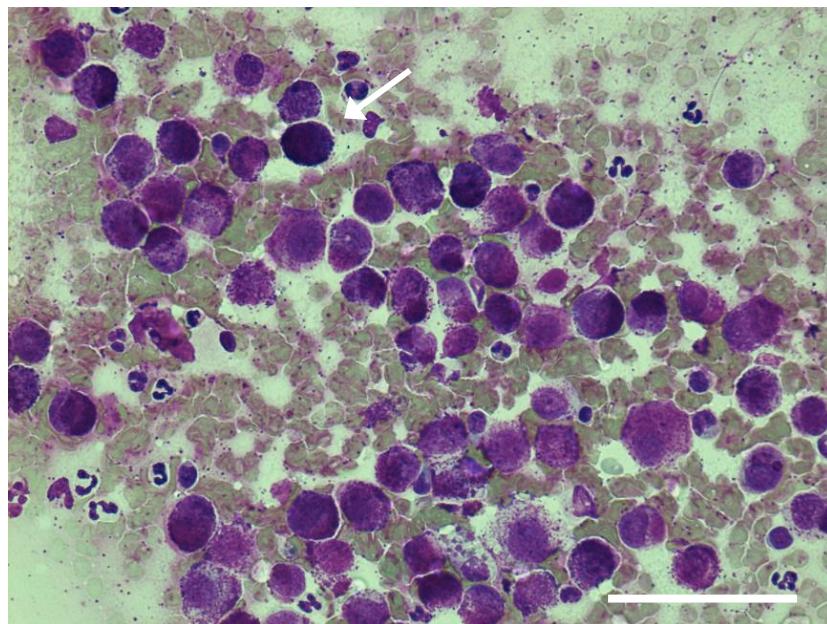
2.2.4 Diagnostične metode

Diagnostični postopek pri psih s sumom na MCT ima tri cilje:

- 1) postavitev diagnoze MCT s citološko in/ali histopatološko preiskavo,
- 2) določitev kliničnega stadija bolezni,
- 3) določitev morebitnih kliničnih znakov paraneoplastičnega sindroma (Rogers, 1996).

2.2.4.1 Biopsija s tanko iglo

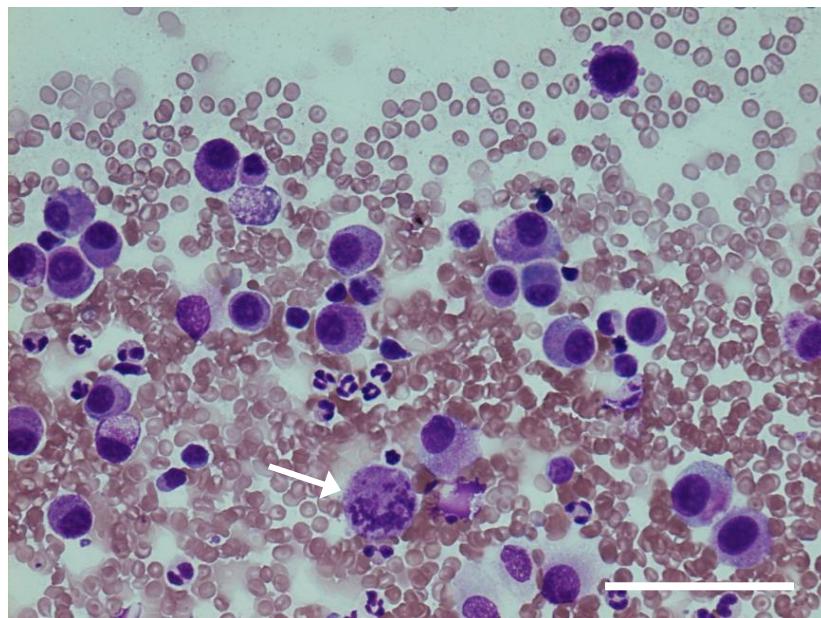
TIB je poceni, minimalno invazivna – lahko izvedljiva na budni živali in omogoča boljše načrtovanje kirurškega postopka (ustrezni robovi) (Blackwood in sod., 2012). TIB kožnih in podkožnih mas je enostavna metoda, ki jo praviloma izvedemo pred kirurškim posegom, saj predoperativna diagnoza MCT vpliva na kirurški pristop (Welle in sod., 2008). Citološka preiskava tankoigelnega aspirata omogoča diagnozo v 92 – 96 % primerov MCT (Blackwood in sod., 2012). Običajno zadostujejo hitra modificirana barvila tipa Romanowsky (npr. Diff QuikTM) (Welle in sod., 2008). Mastociti so majhne do srednje velike, okrogle celice z obilico majhnih, uniformnih citoplazemskih granul, ki se barvajo značilno vijoličasto-rdeče (metakromatično) (London in Thamm, 2013). Celice imajo okroglo do ovalno jedro, ki je v primeru, če je citoplazma močno granulirana, lahko popolnoma prekrito (Slika 1) (Welle in sod., 2008). Manjši odstotek mastocitov vsebuje granule, ki se z običajnimi barvili ne barvajo; v teh primerih so potrebna nekatera specialna barvila, npr. toluidinsko modrilo in Wright-Giemsa (London in Thamm, 2013).



Slika 1: Citološki razmaz dobro diferenciranega MCT. Tumorske celice so monomorfne, okrogle, majhne do srednje velike in imajo po eno okroglo do ovalno jedro. Citoplazma vsebuje številna metakromatična zrnca, ki ponekod povsem prekrivajo jedro (puščica). Hemacolor, x 400. Merilo = 50 µm.

Figure 1: Cytologic smear of a well differentiated MCT. Neoplastic cells are monomorphic, round-shaped, small to medium-sized, with a single round to oval-shaped nucleus. Cytoplasm contains numerous metachromatic granules, which multifocally obscure nuclei (arrow). Hemacolor, x 400. Bar = 50 µm.

Citološka preiskava zadostuje za diagnozo MCT, ne pa tudi za natančno oceno stopnje malignosti tumorja. Vendar pa morfologija celic in obarvanje granul nakazujejo na stopnjo diferenciacije tumorja. Aspirati anaplastičnih tumorjev so običajno gostocelični, celice so močno pleomorfne in anizocitotične, v citoplazmi imajo malo ali nič granul, jedra celic so različnih in nepravilnih oblik, pogoste so mitoze (Slika 2) (Welle in sod., 2008).



Slika 2: Citološki razmaz slabo diferenciranega MCT. Tumorske celice so pleomorfne in močno anizocitotične, s slabo granulirano citoplazmo. Jedra tumorskih celic so različnih oblik in imajo eno ali več izrazitih jedrc. Pogoste so mitoze, tudi bizarre (puščica). Hemacolor, x 400. Merilo = 50 μ m.

Figure 2: Cytologic smear of a poorly differentiated MCT. Neoplastic cells are highly pleomorphic and anisocytotic, with poorly granulated cytoplasm. Nuclei are variably shaped, with one or more distinct nucleoli. Mitotic figures are common, also bizarre mitotic figures are present (arrow). Hemacolor, x 400. Bar = 50 μ m.

Camus in sod. (2016) v nedavni raziskavi predlagajo uporabo dvostopenjskega sistema za oceno stopnje malignosti MCT na podlagi citološke preiskave. Kot kriterije za MCT visoke citološke stopnje malignosti avtorji navajajo slabo granuliranost citoplazme ali vsaj dva izmed naštetih kriterijev:

- prisotnost mitoz,
- različna velikost jeder (posamezna jeda so vsaj 50 % večja od drugih),
- prisotnost dvo ali večjedrnih celic,
- prisotnost pleomorfnih jeder (Camus in sod., 2016).

Vsi MCT, ki ne izpolnjujejo navedenih kriterijev, se ocenijo kot MCT nizke citološke stopnje malignosti. Avtorji ugotavljajo, da so psi z MCT visoke citološke stopnje malignosti 25-krat verjetneje poginili v dveh letih, kot psi z MCT nizke citološke stopnje malignosti (Camus in sod., 2016).

2.2.4.2 Incizijska biopsija

Incizijska biopsija pomeni odvzem vzorca tumorja brez poskusa odstranitve celotne tumorske mase. Po določitvi histopatološke diagnoze in oceni stopnje malignosti tumorja je mogoče natančnejše načrtovanje končne operacije. Pri incizijski biopsiji se moramo izogibati vnetim in ulceriranim področjem ter zagotoviti, da incizija ne bo ovirala ali otežila kasnejše resekcije s kurativnim namenom ali kontaminirala zdravega okoliškega tkiva, potrebnega za rekonstrukcijo kirurške rane (Blackwood in sod., 2012; London in Thamm, 2013). Ob končni resekciji tumorja vedno v celoti odstranimo biopsijski trakt (Blackwood in sod., 2012).

2.2.4.3 Ekscizijska biopsija

Namen ekscizijske biopsije je lahko diagnostični ali terapevtski. Ekscizijska biopsija je najprimernejša, ko natančna diagnoza tumorja ne bi vplivala na izbor druge terapevtske metode (Ehrhart in sod., 2014). V kolikor je diagnoza MCT potrjena s citološko preiskavo in je MCT na lokaciji, ki dovoljuje široko kirurško resekcijo, je ekscizijska biopsija primerna metoda. V primerih zahtevnih kirurških lokacij pa ta metoda ne omogoča potrebnega načrtovanja in lahko ogrozi izid operacije (Blackwood in sod., 2012).

2.2.4.4 Določitev kliničnega stadija

Z določitvijo kliničnega stadija bolezni ocenimo razširjenost tumorske bolezni. MCT lahko zasevajo v področne bezgavke, jetra, vranico in kostni mozeg ter povzročajo rast lokalnih satelitskih tumorjev (Blackwood in sod., 2012). Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) pri MCT loči pet kliničnih stadijev, od 0 do 4 (London in Thamm, 2013) (Tabela 1).

Tabela 1: Klinični stadiji MCT po določilih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) (London in Thamm, 2013)

Table 1: Clinical stages of MCT according to World Health Organization (WHO) (London and Thamm, 2013)

Klinični stadij	Opis
0	En nepopolno izrezan tumor v dermisu, opredeljen histološko, brez zasevkov v področnih bezgavkah <ul style="list-style-type: none"> a. brez sistemskih znakov b. s sistemskimi znaki
1	En tumor omejen na dermis brez zasevkov v področnih bezgavkah <ul style="list-style-type: none"> a. brez sistemskih znakov b. s sistemskimi znaki
2	En tumor omejen na dermis, z zasevki v področnih bezgavkah <ul style="list-style-type: none"> a. brez sistemskih znakov b. s sistemskimi znaki
3	Več kožnih tumorjev ali veliki, infiltrativno rastoči tumorji z zasevki v področnih bezgavkah <ul style="list-style-type: none"> a. brez sistemskih znakov b. s sistemskimi znaki
4	Katerikoli tumor z distalnimi zasevki ali ponovitev tumorja z zasevki (z infiltracijo v kri in kostni mozeg)

Obseg diagnostičnega postopka za določanje kliničnega stadija je odvisen od nekaterih napovednih dejavnikov (Welle in sod., 2008). Večina MCT pri psih ne zaseva, zato vsak pacient ne potrebuje popolnega postopka določitve kliničnega stadija. V primeru slabo diferenciranih tumorjev oz. ob načrtovanju obsežne, invazivne in drage terapijo, pa je natančno določanje kliničnega stadija indicirano (Blackwood in sod., 2012). Minimalni obseg določanja kliničnega stadija bolezni vključuje TIB področnih bezgavk, ne glede na njihovo velikost in ultrazvok trebuha (Welle in sod., 2008).

Citološka preiskava aspirata bezgavk je lahko zavajajoča, saj je prisotnost mastocitov v bezgavki lahko normalna, zlasti v bližini ulceriranega tumorja (Misdorp, 2004; Welle in sod., 2008). Do 24 % zdravih psov ima v aspiratu normalne bezgavke manjše število mastocitov (Bookbinder in sod., 1992). WHO smernice, ki predlagajo zgolj oceno aspirata na prisotnost mastocitov, so zato reje lahko zavajajoče (Welle in sod., 2008).

Pogosto citolog težko oceni ali je bezgavka reaktivna ali neoplastična, na splošno pa velja, da skupine mastocitov nakazujejo na metastatsko bolezen (Blackwood in sod., 2012). Za dokončno oceno je včasih potrebna kirurška odstranitev bezgavke in histopatološka preiskava (London in Thamm, 2013). Weishaar in sod. (2014) so predlagali nov sistem klasificiranja MCT na podlagi števila, razporeditve in arhitekturnih značilnosti tumorskih mastocitov v področnih bezgavkah v 4 razrede (HN0 – HN3). Avtorji so pri psih z večjim številom mastocitov in obsežnejšimi histopatološkimi spremembami v področnih bezgavkah ugotovili krajši interval brez bolezni in krajši čas preživetja v primerjavi s psi z manjšim številom tumorskih mastocitov v področnih bezgavkah (Weishaar in sod., 2014).

Preiskava trombocitno levkocitne plasti polne krvi (angl.buffy-coat smear) se je izkazala kot neuporabna za ugotavljanje sistemske bolezni pri psih s kožnimi MCT, saj je mastocitemija pogosteje pri psih z vnetnimi boleznimi, kot pa pri MCT (Welle in sod., 2008).

Pri psih z zasevki v področne bezgavke je indicirana popolna določitev stadija bolezni z ultrazvokom trebuba, aspiracijo kostnega mozga in rentgenskim slikanjem prsnega koša, čeprav MCT redko zasevajo v pljuča (Blackwood in sod., 2012; London in Thamm, 2013). Ne glede na njuno ultrazvočno strukturo opravimo tudi aspiracijo jeter in vranice, kjer znake sistemske bolezni lažje ugotavljamo kot v kostnem mozgu (Blackwood in sod., 2012; London in Thamm, 2013). Infiltracija tumorskih mastocitov v kostnem mozgu sicer nakazuje na sistemsko bolezen (London in Thamm, 2013).

2.2.5 Prognoza

Biološko obnašanje in napoved poteka bolezni pasjih kožnih MCT je izjemno variabilna (Misdorp in sod., 2004). Noben napovedni dejavnik ni povsem zanesljiv, zato pri oceni pacienta vedno upoštevamo več dejavnikov (London in Thamm, 2013).

2.2.5.1 Histološka stopnja malignosti

Za MCT je najpomembnejši napovedni dejavnik histološka stopnja malignosti (Blackwood in sod., 2012).

Histopatološka diagnoza MCT je običajno enostavna. MCT so neinkapsulirane, kožne ali podkožne, infiltrativno rastoče tvorbe, zgrajene pretežno iz okroglih celic v trakovih ali plasteh. Epidermis nad tumorjem je lahko nepoškodovan, pri večjih tumorjih pa običajno ulceriran. Morfologija tumorskih celic je odvisna od stopnje diferenciacije MCT. Večina tumorskih mastocitov ima izrazito celično membrano, centralno postavljenog okroglo jedro, v citoplazmi pa so številne citoplazmatske granule, ki se značilno metakromatsko obarvajo s toluidinskim modriliom in nekaterimi drugimi barvili. Med tumorskimi celicami je lahko različna količina kolagene strome, ki je lahko edematozna ali hialinizirana. V skoraj vseh MCT je različno število eozinofilnih granulocitov, ki lahko multifokalno oblikujejo skupine (Gross in sod., 2005).

Najpogostejsi sistem gradiranja je Patnaikov sistem, ki kožne MCT razvršča v tri histološke stopnje malignosti (Patnaik in sod., 1984):

- histološki gradus malignosti I (dobro diferencirani MCT): tumorske celice so urejene v vrstah ali manjših skupinah in so omejene samo na dermis. Tumorske celice so dobro diferencirane, okrogle, monomorfne, imajo pretežno jasno vidne celične meje in obilico citoplazme. V citoplazmi so srednje velike granule. Jedra tumorskih celic so okrogla. Mitoz ni (Patnaik in sod., 1984).

MCT gradusa I zasevajo v manj kot 10 % in so redko vzrok pogina (Blackwood in sod., 2012). V raziskavi Patnaika in sod. (1984) je 28 od 30 psov (93 %) z MCT gradusa I preživelno več kot 1500 dni.

- histološki gradus II: tumorji so zmerno do gostocelični in vraščajo v globoki dermis in podkožje. Tumorske celice so urejene v skupine z različno količino vmesne strome in hialiniziranimi področji. Tumorske celice so zmerno pleomorfne, okrogle do ovalne oblike in imajo pretežno izrazito citoplazmo z drobnimi granulami. Redke so vmesne vretenaste celice in zelo velike celice. Jedra tumorskih celic so okrogla do vdrta z enim jedrcem. Posamezne celice imajo dve jedri. Mitoze so redke, do 2 mitozi na vidno polje visoke povečave (angl. high power field, HPF). Pogostejsa so področja edema in nekroze (Patnaik in sod., 1984).

Prognoza MCT gradusa II je bolj variabilna; 5 – 22 % tumorjev zaseva in 17 – 56 % psov z MCT histološkega gradusa II pogine ali je evtanaziranih zaradi neuspešne

terapije ali metastatske bolezni (Blackwood in sod., 2012). Patnaik in sod. (1984) navajajo, da 44 % psov z MCT histološkega gradusa II preživi več kot 1500 dni.

- histološki gradus III: tumorji so gostocelični in vraščajo v globoki dermis, podkožje in globja tkiva. Tumorske celice so pleomorfne, srednje velike, okrogle, ovalne ali vretenaste oblike in so pretežno urejene v goste plasti. Citoplazma tumorskih celic je neočitna, citoplazmatske granule so majhne ali nevidne. Jedra tumorskih celic so okrogle do vdrta in vezikularna, z enim ali več očitnimi jedrci. Pogoste so dvojedrne celice, pojavljajo se večjedrne in zelo velike tumorske celice. Mitoze so pogoste (3 – 6 na HPF). Pogoste so krvavitve, nekroza in edem (Patnaik in sod., 1984). Več kot 80 % MCT gradusa III zaseva (Welle in sod., 2008). V Patnaikovi raziskavi je le 6 % psov preživelilo več kot 1500 dni (Patnaik in sod., 1984).

Pomanjkljivosti Patnaikovega sistema sta prevladovanje MCT histološkega gradusa II in relativno velike razlike pri ocenjevanju stopnje malignosti med različnimi patologi (Kiupel in sod., 2011). Prevalenca MCT histološkega gradusa II je visoka (53 %), vendar pa nosi nizko napovedno vrednost, saj je obnašanje MCT histološkega gradusa II zelo različno; v tej skupini se pojavlja širok spekter tumorjev, od MCT z benignim potekom do biološko zelo agresivnih MCT. Pes z MCT histološkega gradusa II ima po podatkih Patnaikove raziskave približno polovično možnost preživetja po 1500 dneh, kar kliniku nudi le majhno napovedno vrednost (Patnaik in sod., 1984; Séguin in sod., 2001; Kiupel in sod., 2011). Histopatološko ocenjevanje malignosti MCT je subjektivno in raziskava Kiupela in sod. (2011) poroča o 74 % skladnosti patologov glede diagnoze MCT histološkega gradusa III in o zgolj 63 % skladnosti glede diagnoze histoloških gradusov I in II. Starejša raziskava poroča o še nižji, 62 % skladnosti pri ocenjevanju stopnje malignosti po Patnaikovem sistemu med različnimi patologi (Northrup in sod., 2005). Ena od kritik Patnaikovega sistema je tudi, da zaradi kriterijev za MCT gradusa III izpadejo nekateri biološko agresivni tumorji (Kiupel in sod., 2011). Kiupel in sod. (2011) so zato predlagali nov, dvostopenjski sistem ocenjevanja malignosti, ki MCT deli na MCT nizke in visoke stopnje malignosti.

Za diagnozo MCT visoke stopnje malignosti zadostuje eden od naštetih kriterijev:

- vsaj 7 mitoz v 10 HPF,
- vsaj 3 večjedrne celice (to so tumorske celice, ki imajo več kot 3 jedra) v 10 HPF,
- vsaj 3 bizarna jedra (to so jedra, ki so močno atipična, z izrazitim zažemki, segmentirana ali nepravilne oblike) v 10 HPF,

- kariomegalija (vsaj 10 % tumorskih celic ima dvakrat večji premer jedra od premera najmanjših tumorskih celic) (Kiupel in sod., 2011).

Vse ostale MCT, ki ne izpolnjujejo naštetih kriterijev, se oceni kot MCT nizke stopnje malignosti (Kiupel in sod., 2011).

Mediani čas preživetja psov z MCT visoke stopnje malignosti je manj kot 4 mesece, za pse z MCT nizke stopnje malignosti pa več kot 2 leti (Kiupel in sod., 2011).

Medtem ko Patnaikov sistem gradiranja kot pomemben dejavnik izpostavlja globino invazije tumorskih celic, novejše raziskave tega niso dokazale (Kiupel in sod., 2005; Kiupel in sod., 2011). Zato nekateri avtorji menijo, da globina infiltracije tumorskih celic ne bi smela vplivati na dodelitev histološke stopnje malignosti (Sledge in sod., 2016).

V dveh novejših raziskavah sta bili narejeni primerjavi uporabnosti Patnaikovega in Kiupelovega sistema gradiranja. Sabattini in sod. (2015) ugotavlja večjo napovedno vrednost Kiupelovega sistema, saj prepozna MCT gradusa II z bolj agresivnim biološkim vedenjem, vendar med pomanjkljivostmi izpostavlja, da raziskava ni upoštevala kliničnega stadija in popolnosti ekscizije tumorja (t.i. "čistost robov"). Stefanello in sod. (2015), ki so ugotavliali prisotnost zasevkov pri MCT različnih gradusov, pa ne opisujejo nobene prednosti uporabe Kiupelovega sistema v primerjavi s Patnaikovim, saj so tumorji gradusa II visoke stopnje malignosti približno enako pogosto zasevali v primerjavi s tumorji gradusa II nizke stopnje malignosti. Obe raziskavi navajata, da zgolj histološka stopnja malignosti ni dovolj natančen napovedni dejavnik (Sabattini in sod., 2015; Stefanello in sod., 2015).

2.2.5.2 Mitotični indeks

Mitotični indeks (MI) pomeni število mitoz v 10 HPF, določenih s standardno histopatološko preiskavo (Blackwood in sod., 2012). MI je posredni kazalec stopnje celične proliferacije in je pomemben napovedni dejavnik pri številnih tumorjih ljudi in živali (Romansik in sod., 2007).

Visok MI je pokazatelj slabe prognoze (Romansik in sod., 2007; Elston in sod., 2009; Kiupel in sod., 2011). Raziskava Romansika in sod. (2007) je pokazala neposredno povezavo med MI kožnih MCT psov in časom preživetja, ne glede na histološko stopnjo malignosti tumorja.

Mediani čas preživetja pri psih z MI višjim od 5 je bil 2 meseca, pri MI enakem ali nižjem od 5 pa 70 mesecev (Romansik in sod., 2007). Novejša raziskava Elstona in sod. (2009) poroča o primerljivih izsledkih, vendar pa predлага natančnejšo razdelitev v 3 skupine glede na MI:

$MI = 0 - 1$, $MI = 1 - 7$ in $MI > 7$.

2.2.5.3 Izraženost KIT

Večina pasjih MCT izraža RTK KIT, 15 – 40 % pa jih vsebuje mutacijo v c-kit genu, ki pomeni nenehno aktiviranost receptorja KIT brez potrebne po vezavi liganda (Blackwood in sod., 2012; London in Thamm, 2013). Mutacije na c-kit genu so statistično značilno povezane z višjo histološko stopnjo malignosti MCT, višjo umrljivostjo psov zaradi MCT in večjo verjetnostjo ponovitve bolezni (Zemke in sod., 2002; Webster in sod., 2006). Webster in sod. (2006) so ugotovili povezavo med c-kit mutacijo in spremenjenim izražanjem KIT v celicah kožnih MCT psov.

Izražanje KIT prikažemo z imunohistokemičnim barvanjem, pri katerem lahko ugotovimo tri vzorce barvanja:

- vzorec KIT-barvanja I, pri katerem vidimo pozitivno imunohistokemično reakcijo na celični membrani mastocitov in tumorskih celic v MCT,
- vzorec KIT-barvanja II, pri katerem vidimo fokalno zrnčasto pozitivno imunohistokemično reakcijo v citoplazmi tumorskih celic, in
- vzorec KIT-barvanja III, pri katerem vidimo difuzno močno pozitivno imunohistokemično reakcijo v citoplazmi tumorskih celic (Kiupel in sod., 2004).

KIT receptor je transmembranska beljakovina, ki se v mastocitih psov izraža izključno na celični membrani. Kožni MCT psov s povečanim izražanjem KIT v citoplazmi (vzorca II in III) so bolj nagnjeni k lokalni ponovitvi bolezni in čas preživetja psov je krajši, medtem ko je vzorec KIT-barvanja na celični membrani povezan z redkejšimi lokalnimi ponovitvami, redkejšimi oddaljenimi zasevkami in daljšim časom preživetja (Kiupel in sod., 2004). Vendar pa Costa Casagrande in sod., (2015) niso uspeli dokazati povezave med vzorcem KIT-barvanja in histološkim gradusom tumorja, niti med vzorcem KIT-barvanja in prognozo.

2.2.5.4 Ki-67 protein

Ki-67 je jedrni protein, ki se izraža med vsemi aktivnimi fazami celičnega cikla (G1, S, G2, mitoza) in se uporablja kot proliferacijski označevalec (Scholzen in Gerdes, 2000; London in Thamm, 2013). Prikažemo ga z imunohistokemičnim barvanjem (Blackwood in sod., 2012) in njegovo izraženost najpogosteje opredelimo s t. i. proliferacijskim indeksom Ki-67, ki pove število Ki-67 imunohistokemično označenih jeder med 100 ali 1000 pregledanimi jedri v tumorju (Abadie in sod., 1999; Vascellari in sod., 2012).

Izraženost Ki-67 je uporaben napovedni dejavnik zlasti pri psih s solitarnimi kožnimi MCT histološkega gradusa II (Abadie in sod., 1999; Scase in sod., 2006). Proliferacijski indeks Ki-67 je bil statistično značilno višji v MCT psov, ki so poginili zaradi MCT, kot pri preživelih psih (Abadie in sod., 1999). Scase in sod. (2006) so v svoji raziskavi ugotovili, da je vrednost Ki-67 višja od 1,8 (po Coxovem regresivnem modelu) pri psih z MCT histološkega gradusa II povezana z izrazito krajšo preživetveno dobo. Webster in sod. (2007) podobno ugotavlja večjo verjetnost napredovanja bolezni in smrti zaradi MCT v primeru višje vrednosti Ki-67.

2.2.5.5 Jedrni antigen proliferirajočih celic (PCNA)

Jedrni antigen proliferirajočih celic (angl. proliferating cell nuclear antigen, PCNA) je jedrna beljakovina, potrebna za podvojevanje DNA, ki se izrazi med S in M fazo celičnega cikla in jo prikažemo z imunohistokemičnim barvanjem (Scase in sod., 2006). Raziskave nakazujejo više izražanje PCNA pri rekurentnih in metastazirajočih MCT, vendar pa izražanje PCNA ni uporabno za napoved časa preživetja (Simoes in sod., 1994; Scase in sod., 2006, Seguin in sod., 2006).

2.2.5.6 AgNOR

Število s srebrom dokazljivih regij za organizacijo nukleolusov (angl. argyrophilic nucleolar organiser regions, AgNOR), ki jih prepoznamo v jedrih tumorskih celic, je proporcionalno hitrosti pomnoževanja celic (Simoes in sod., 1994; Scase in sod., 2006; Blackwood in sod., 2012). Nižje število AgNOR točk ($<2,25/\text{celico}$) je povezano s statistično značilno daljšim časom preživetja in manjšo verjetnostjo zasevanja, vendar pa je za napoved kliničnega poteka bolezni hkrati potreben tudi histološki gradus po Patnaiku (Simoes in sod., 1994; Scase in sod., 2006). Kljub dokazani napovedni vrednosti je po mnenju nekaterih raziskovalcev uporabnost AgNOR manjša, saj ne nudi boljše napovedne vrednosti kot ocena stopnje malignosti po Patnaiku (Scase in sod., 2006).

2.2.5.7 AgNOR x Ki-67

Kombinirana vrednost proliferacijskega indeksa Ki-67 in indeksa AgNOR, kot jo predstavlja njun zmnožek (AgNOR x Ki-67), nudi najboljšo oceno celične proliferacije v tumorju (Sledge in sod., 2016). Vrednost AgNOR x Ki-67 nosi največjo napovedno vrednost med proliferacijskimi indeksi (Seguin in sod., 2006; Webster in sod., 2007; Smith in sod., 2017).

Smith in sod. (2017) v nedavni raziskavi opisujejo zelo nizko verjetnost lokalne ponovitve MCT z nizkimi vrednostmi Ki-67 in AgNOR x Ki-67 po nepopolni kirurški resekciji.

2.2.5.8 Klinični stadij

MCT kliničnega stadija 0 ali 1 imajo boljšo prognozo kot MCT višjih kliničnih stadijev (London in Thamm, 2013). Čas preživetja pri psih z MCT stadija 2 je bil zrazito krajsi v primerjavi s psi v stadiju 1 (0,8 proti 6,2 let) (Krick in sod., 2009). Vendar rezultati nekaterih raziskav nakazujejo na pomankljivosti trenutnega sistema (Kiupel, 2016). Zlasti je problematična določitev 3. stadija za pse z multiplimi MCT (Kiupel, 2016). Poleg tega WHO klasifikacija ne opredeljuje "velikosti", ki jo navaja kot dejavnik za vključitev v 3. stadij (Dobson in sod., 2004). Murphy in sod. (2006) niso ugotovili razlike v izidu med psi v stadiju 1 in psi v stadiju 3, psi v stadiju 2 pa so imeli slabšo prognozo kot psi v stadiju 3. Mullins in sod. (2006) navajajo več kot 5-letno dobo brez bolezni pri 54 psih z MCT stadija 3.

Rezultati nekaterih raziskav nakazujejo, da je ob multimodalni terapiji klinični stadij manj pomemben napovedni dejavnik (Chaffin in sod., 2002; Thamm in sod., 2006).

2.2.5.9 Anatomska lokacija

Glede na rezultate nekaterih raziskav so MCT v ustni votlini, pod kremlji, na perinealnem področju, mukokutanih prehodih, modniku in prepuciju, v ingvinalnem področju in na smrčku povezani s slabšo prognozo (Welle in sod., 2008; London in Thamm, 2013). Nasprotno pa v drugih raziskavah niso poročali o slabši prognozi MCT na perinealnem in ingvinalnem področju v primeru ustrezne terapije (Cahalane in sod., 2004; Sfiligoi in sod., 2005). Slabša prognoza za MCT na nekaterih omenjenih anatomskih lokacijah bi lahko bila povezana s težavnostjo popolne kirurške resekcije (Blackwood in sod., 2012).

2.2.5.10 Sistemski znaki

Prisotnost sistemskih znakov, kot so anoreksija, melena, bruhanje, gastrointestinalne ulceracije, je povezana s slabšo prognozo (London in Thamm, 2013).

2.2.5.11 Število tumorjev

Prognoza za multiple kožne MCT ni slabša kot za solitarne tumorje, razen če gre za metastatsko bolezen (Mullins in sod., 2006; Murphy in sod., 2006).

2.2.5.12 Drugi napovedni dejavniki

V literaturi so opisani še nekateri drugi napovedni dejavniki kot so ploidnost DNA (Ayl in sod., 1992), gostota malih krvnih žil v tumorju (angl. intratumoral microvessel density, IMVD) (Preziosi in sod., 2004b), izražanje ciklooksigenaze-2, beljakovine BCL-2 (Vascellari in sod., 2013) in beljakovin topotnega šoka (angl. heat shock protein, HSP) (Romanucci in sod., 2017).

2.2.6 Zdravljenje

Možnosti zdravljenja so odvisne od klinične slike, kliničnega stadija bolezni in histološkega gradusa tumorja. Pred končno odločitvijo o vrsti zdravljenja je potrebno razjasniti predvsem, če je:

- 1) popolna kirurška ekscizija mogoča, in
- 2) lokalno zdravljenje zadostno, ali je potrebno sistemsko zdravljenje (Blackwood in sod., 2012).

2.2.6.1 Kirurško zdravljenje

Pri psih je kirurška resekcija zdravljenje izbora za lokalizirane MCT brez znakov metastatske bolezni (Blackwood in sod., 2012). Od 60-ih let prejšnjega stoletja je veljalo prepričanje, da popolna resekcija MCT zahteva vsaj 3 cm varnostni rob v vse smeri (London in Thamm, 2013). Novejše raziskave kažejo, da za popolno resekcijo večine MCT histološkega gradusa I in II zadostuje 2 cm širok stranski rob in 1 plast fascije v globino (Simpson in sod., 2004; Fulcher in sod., 2006). Globoki rob naj bi vseboval podkožno mišico, spodaj ležečo fascijo ali, v primeru njene odsotnosti, površinsko plast mišičnine (Simpson in sod., 2004; Fulcher in sod., 2006). V retrospektivni raziskavi, opravljeni na 100 psih s 115 MCT histološkega gradusa I in II ter velikosti 2 – 31 mm niso ugotovili nobene lokalne ponovitve v obdobju dveh let po kirurški resekciji, opravljeni z vsaj 10 mm širokim stranskim in vsaj 4 mm globokim robom (Schultheiss in sod., 2011). Vendar pa je bila širina robov določena histološko, kar pomeni, da navedene mere ne korelirajo nujno s širino robov ob operaciji. Kožno tkivo se po fiksaciji v formalinu lahko skrči tudi do 30 % (London in Thamm, 2013). Smiselno je torej zaključiti, da manj radikalna resekcija manjših MCT nizkih histoloških gradusov ne pomeni višje stopnje ponovitve (Blackwood in sod., 2012). Vendar pa literatura opisuje relativno nizko stopnjo lokalne ponovitve tudi v primerih, ko so v robovih ekscizije tumorske celice (t. i. "nečisti

robovi"). Murphy in sod. (2004) so ugotovili le 20 ponovitev v vzorcu 340 nepopolno izrezanih MCT različnih histoloških gradusov.

Pri multiplih MCT se svetuje kirurška odstranitev vseh tumorjev, ki to dopuščajo (Blackwood in sod., 2012).

Vsa navedena priporočila veljajo za tumorje, manjše od 4 cm in histološkega gradusa I ali II. Za vse ostale MCT se priporoča široka kirurška resekcija z vsaj 3 cm širokimi stranskimi robovi in globinsko fascijo; še primernejši je multimodalni pristop (Blackwood in sod., 2012).

MCT na težavnih lokacijah, zlasti na distalnih delih okončin, ki onemogočajo široko kirurško resekcijo, je pred operacijo priporočljivo histopatološko oceniti stopnjo malignosti. Za MCT histoloških gradusov I in II na distalnih delih okončin obstajajo 4 glavne možnosti zdravljenja (London in Thamm, 2013):

- amputacija je najbolj agresivna metoda, ki zagotavlja široke varnostne robe, vendar je najmanj funkcionalna in glede na druge možne terapije ni priporočljiva;
- radioterapija je kot primarna terapija različno uspešna;
- kombinacija operacije in postoperativne kemoterapije; in
- kombinacija operacije in adjuvantne radioterapije se priporoča kot najprimernejša terapija (London in Thamm, 2013).

Za biološko agresivne MCT histološkega gradusa III se priporoča kombinacijo citoreduktivne kirurške resekcije in adjuvantne radioterapije in kemoterapije (London in Thamm, 2013).

2.2.6.2 Radioterapija

Radioterapija naj bi bila omejena na uporabo v primerih, ko popolna kirurška resekcija ni mogoča. V kolikor bi ponovna operacija okrog prvotne kirurške rane omogočila popolno odstranitev, je le-ta indicirana (Blackwood in sod., 2012). Prednost radioterapije pred kirurškim posegom je, da omogoča zajetje večjih področij naenkrat (LaRue in Gordon, 2013). Radioterapije se kot edine metode zdravljenja večjih MCT izogibamo zaradi nevarnosti radiacijsko-inducirane degranulacije mastocitov in resnih sistemskih posledic. Poleg tega, večji tumorji pogosteje vsebujejo radiorezistentne tumorske celice (Blackwood in sod., 2012).

Radioterapija je uporabna kot predoperacijska metoda za zmanjšanje velikosti tumorja in izboljšanje možnosti uspeha operacije, najpogosteje pa se je poslužujemo kot postoperacijsko adjuvantno terapijo po nepopolni resekciji (Blackwood in sod., 2012; London in Thamm, 2013). Frimberger in sod. (1997) v svoji raziskavi poročajo, da v 93 % primerov v treh letih po

končani radioterapiji, ki je sledila nepopolni kirurški resekciji MCT histološke stopnje malignosti II, ni prišlo do lokalne ponovitve. Prognoza za pse z MCT, zdravljenimi s kirurškim posegom in radioterapijo, je dobra, vendar pa so ti podatki zaradi relativno nizke stopnje ponovitve tudi pri histološko nečistih robovih vprašljivi (Murphy in sod., 2004; Blackwood in sod., 2012). Chaffin in Thrall (2002) poročata o 1240-dnevnom medianem času preživetja psov z MCT stadija 2 po citoreduktivni operaciji, postoperativni radioterapiji in terapiji s prednizonom.

Iz radiacijskega polja na okončinah izključimo trak kože, da preprečimo nastanek limfedema zaradi poškodb limfnih žil. Posledično celotnega obsega okončine ne moremo obsevati, kar omeji robe (Blackwood in sod., 2012).

Preventivno obsevanje področnih bezgavk, v katerih se s citološko preiskavo ne ugotovi tumorskih celic, je zaradi relativno majhnega tveganja za zasevanje nizko in zmerno diferenciranih MCT verjetno nepotrebno (Poirier in sod., 2006; London in Thamm, 2013). Postopek se priporoča pri MCT visokega tveganja, kot so MCT histološkega gradusa III, histološkega gradusa II na mukokutanem prehodu ali dokazanem zasevku v bezgavki (Thamm in sod., 2006).

Radioterapija je uporabna tudi kot paliativna metoda zdravljenja (Mayer, 2006).

Za zmanjšanje radiološko inducirane degranulacije mastocitov in posledičnih sistemskih učinkov se pred, med in po radioterapiji uporablajo prednizolon, H₁ (klorfeniramin, difenhidramin) in H₂ (cimetidin, ranitidin) blokatorji (Welle in sod., 2008; Blackwood in sod., 2012).

2.2.6.3 Kemoterapija

Kemoterapija za zdravljenje MCT je pri psih indicirana v primeru:

- 1) Kadar je potrebna sistemska terapija za zdravljenje, upočasnitev ali preprečevanje metastatske bolezni pri MCT z visokim tveganjem za zasevanje, to so tumorji gradusa III ali II/III in tumorji gradusa II z visokimi proliferacijskimi indeksi (Blackwood in sod., 2012). Raziskava, v kateri so 61 psov z MCT z visokim tveganjem za zasevanje, zdravili s kombinacijo vinblastina in prednizona po kirurški resekciji z ali brez radiacije, opisuje 1305 dnevni interval brez bolezni in 65 % preživetje po treh letih (Thamm in

sod., 2006). Patnaik in sod. pa so v svoji raziskavi poročali, da je le 6 % psov z MCT gradusa III, zdravljenega s kirurško resekcijo, preživelo več kot 1500 dni (1984).

- 2) Kot neoadjuvantna terapevtska metoda pred kirurškim posegom ali radioterapijo z namenom zmanjšanja tumorskega bremena. Na ta način lahko izboljšamo možnosti za popolno kirurško resekcijo oz. zadovoljivo in varnejšo obsevanje (Blackwood in sod., 2012).
- 3) Za zdravljenje rezidualne mikroskopske bolezni v primerih, ko ponovna kirurška resekcija ni mogoča in radioterapija ni na voljo (Blackwood in sod., 2012). Raziskava Daviesa in sod. (2004) opisuje, da pri 18 od 20 psov po enem letu ni prišlo do lokalne ponovitve bolezni; pri 4 psih od 18 so se pojavili novi MCT. Poudariti je potrebno, da je bilo v omenjeni raziskavi vključenih veliko MCT gradusa II, pri katerih je lokalna ponovitev po nepopolni kirurški odstranitvi redka (Blackwood in sod., 2012).

Obstaja več različnih protokolov, kot monoterapija in kombiniranih. Prvi izbor je običajno kombinacija vinblastina in prednizolona, drugi izbor pa lomustin (Blackwood in sod., 2012).

2.2.6.4 Terapija z glukokortikoidi

Glukokortikoidi statistično značilno zavrejo rast celic kožnih MCT *in vitro* in *in vivo* (Takahashi in sod., 1997).

Stopnja odzivnosti MCT na peroralno terapijo z glukokortikoidi (prednizon ali prednizolon) je glede na različne raziskave 20 – 75 % (McCaw in sod., 1994; Dobson in sod., 2004; Stanclift in Gilson, 2008). Stanclift in Gilson (2008) opisujeta učinek neoadjuvantne uporabe prednizona na zmanjšanje MCT in posledično zaneslivejše doseganje želenih kirurških robov. V raziskavo so bili vključeni MCT, ocenjeni kot zahtevni za popolno kirurško resekcijo. Tumorski volumen se je pri 87 % MCT zmanjšal za najmanj 25 %. Več avtorjev uporabo glukokortikoidov svetuje predvsem kot neoadjuvantno metodo (Dobson in sod., 2004; Stanclift in Gilson, 2008, Case in Burgess, 2018)

Case in Burgess (2018) sta nedavno opisali učinkovitost in varnost intratumorske aplikacije triamcinolona pri 23 psih. Poročana stopnja odzivnosti tumorjev je bila 67 %, a je vrednotenje rezultatov zaradi različnih sočasnih terapevtskih metod manj zanesljivo.

2.2.6.5 Elektrokemoterapija

Elektrokemoterapija združuje lokalno ali sistemsko aplikacijo kemoterapevtikov s slabo membransko permeabilnostjo (običajno cisplatin ali bleomicin) in elektropermeabilizacijo z neposredno aplikacijo električnih pulzov v tumor (Cemazar in sod., 2008). Rezultati na relativno majhnem vzorcu kažejo primerljivo proti-tumorsko učinkovitost med elektrokemoterapijo s cisplatinom in kirurško resekcijo, zlasti pri manjših MCT (Kodre in sod., 2009).

Predlagana je bila tudi uporaba elektrokemoterapije kot adjuvantne terapije po kirurško nepopolno odstranjenih MCT; raziskave kažejo dosežen lokalni nadzor tumorjev v 78 – 85 % primerov (Spugnini in sod., 2006; Spugnini in sod., 2011). Tako elektrokemoterapija lahko predstavlja alternativo adjuvantni radioterapiji in možnost pri zdravljenju MCT na težavnih lokacijah (perinej, genitalije, glava) (Spugnini in sod., 2006; Spugnini in sod., 2011).

Številni avtorji elektrokemoterapijo opisujejo kot varno, učinkovito, preprosto in cenovno ugodno alternativo (Kodre in sod., 2009; Spugnini in sod., 2006; Spugnini in sod., 2011; Cemazar in sod., 2008).

2.2.6.6 Elektrogenska terapija

Elektrogenska terapija, podobno kot elektrokemoterapija, združuje aplikacijo plazmidne DNA z vstavljenim terapevtskim genom in lokalno aplikacijo električnih pulzov v tumor z namenom začasnega povečanja permeabilnosti celičnih membran (Pavlin in sod., 2011). Pavlin in sod. (2011) so opisali zmanjšanje velikosti tumorjev za 13 – 83 % po aplikaciji plazmidne DNA z vstavljenim genom za humani interleukin-12 in hkrati histopatološke spremembe tumorjev, v smislu manjšega števila tumorskih mastocitov in večje infiltracije vnetnih celic.

Nedavno je bila opisana učinkovitost kombinacije elektrokemoterapije in elektrogenske terapije z inteleukinom-12. Odgovor tumorja je bil zabeležen pri 15 od 18 psov, v 72 % primerov je bil odgovor popoln in dolgotrajen (Cemazar in sod., 2017). Salvadori in sod. (2017) so spremljali histopatološke in imunohistokemične učinke terapije iz omenjene raziskave. V tumorjih s popolnim odgovorom so ugotovili izrazito zmanjšanje populacije tumorskih celic in zmanjšanje njihove proliferacijske aktivnosti.

Avtorji ne opisujejo hujših stranskih učinkov niti pri elektrokemoterapiji, niti pri elektrogenski terapiji (Spugnini in sod., 2006; Kodre in sod., 2009; Pavlin in sod., 2011; Spugnini in sod., 2011, Cemazar in sod., 2017).

2.2.6.7 Inhibitorji tirozin kinaze

Specifični inhibitorji tirozin kinaze (TKI) lahko blokirajo aktivacijo receptorjev s kompetitivno inhibicijo vezave ATP. Posledica je nižja proliferacija, migracija, apoptoza in angiogeneza, odvisno od receptorja, ki ga TKI blokira (Blackwood in sod., 2012).

Evropska agencija za zdravila (EMA) je za uporabo v veterinarski medicini odobrila dva inhibitorja receptorja tirozin kinaze (RTKI): toceranib fosfat in masitinib (Blackwood in sod., 2012).

Toceranib je odobren za zdravljenje rekurentnih, neresektabilnih MCT gradusa II in III (Blackwood in sod., 2012). Toceranib učinkuje antitumorsko in antiangiogeno preko inhibicije receptorja KIT, receptorja za vaskularni endotelni rastni faktor (VEGFR2) in receptorja za trombocitni rastni faktor (PDGFR) (London in sod., 2009). London in sod. (2009) poročajo o 42,8 % stopnji odzivnosti MCT na samostojno terapijo s toceranibom. Najpogostejsi stranski učinki so bili nevtopenija, driska, neješčnost oz. zmanjšan apetit, bruhanje in letargija.

Masitinib je odobren za zdravljenje neresektabilnih MCT gradusa II in III z dokazano c-kit mutacijo (Blackwood in sod., 2012). Hahn in sod. (2008) opisujejo upočasnjeno napredovanje tumorja, zlasti ko je bilo zdravilo uporabljenko kot prva terapija. Najpogostejsi stranski učinki so bili driska, bruhanje, edemi, nevtopenija; opisane so tudi hemolitična anemija in nefropatijs (Hahn in sod., 2008). Učinek tako toceraniba kot masitiniba je večji v primeru mutacije na c-kit genu (Hahn in sod., 2008; London in sod., 2009).

RTKI naj ne bi bila alternativa kirurški resekciji, kadar je le-ta mogoča. Trenutna priporočila jih kot prvo zdravilo proti MCT odsvetujejo (Blackwood in sod., 2012).

2.2.6.8 Ostale možnosti zdravljenja

Manj ustaljene terapevtske možnosti vključujejo intratumorsko aplikacijo kortikosteroidov ali deionizirane vode, imunoterapijo, krioterapijo, hipertermijo, brahiterapijo in fotodinamično terapijo, vendar so podatki o učinkovitosti posameznih postopkov skopi in neprepričljivi (Welle in sod., 2008; Blackwood in sod., 2012). Mnoge od omenjenih možnosti zdravljenja tudi onemogočijo histološko oceno robov tumorja (Welle in sod., 2008)

2.2.6.9 Podpora terapija

Podpora terapija je usmerjena v preprečevanje učinkov histamina. Uporabljajo se H₂ antagonisti za preprečevanje želodčnih čirov in H₁ antagonisti za zmanjšanje učinka histamina na periferno žilje in celjenje ran (Blackwood in sod., 2012). Podpora terapija je zlasti

pomembna pri pacientih s sistemskimi znaki in kadar pričakujemo degranulacijo mastocitov (London in Thamm, 2013). Pri znakih gastroduodenalnih ulceracij se svetuje dodatek sukralfata (London in Thamm, 2013).

2.3 PD-1 IN PD-L1

PD-1 je inhibitorni receptor, ki ga uvrščamo med beljakovine družine B7/CD28. Skupaj z ligandoma PD-L1 in PD-L2 igra pomembno vlogo pri razvoju periferne tolerance in avtoimunosti. Med drugimi se PD-1 izraža na limfocitih T, kjer negativno regulira celično receptorsko signaliziranje in s tem zmanjša intenzivnost in trajanje imunskega odziva ter preprečuje avtoimune poškodbe zdravih tkiv. Medtem ko je os PD-1 kritična komponenta telesne avtoimunosti, jo lahko izkoristijo tudi tumorji za omejitev antitumorske aktivnost limfocitov T, kar vodi v tumorski pobeg pred imunskim sistemom (Keir in sod., 2008; Intlekofer in Thompson, 2013; Jin in sod., 2011; McDermott in sod., 2013; Muenst in sod., 2015). Izražanje PD-L1 v tumorskih celicah nima pro-onkogenega učinka, temveč predstavlja imunski ščit, ki tumor varuje pred imunskim sistemom telesa (Patel in Kurzrock, 2015).

Inhibitorni receptor PD-1 in njegov ligand PD-L1 v humani onkologiji predstavljata vse pomembnejša napovedna dejavnika pri številnih vrstah tumorjev (Darb-Esfahani in sod., 2015; Maruse in sod., 2018). Izražanje PD-L1 je bilo dokazano v številnih tumorjih ljudi: melanomu, nedrobnoceličnemu raku pljuč, karcinomu ledvičnih celic, hepatocelularnemu karcinomu, seroznemu karcinomu jajčnika, ploščatoceličnemu karcinomu ust, timomu in timičnemu karcinomu, različnih levkemijah, B-celičnemu limfomu, multiplemu mielomu idr. (Darb-Esfahani in sod., 2015; Patel in Kurzrock, 2015; Maruse in sod., 2018), medtem ko je bilo izražanje PD-1 dokazano v tumor-infiltrirajočih limfocitih (TIL, ang. tumor-infiltrating lymphocytes) (Ahmadzadeh in sod., 2009). Številni avtorji izražanje PD-1 oz. PD-L1 v tumorjih označujejo kot negativni napovedni dejavnik zaradi krajskega časa preživetja ali pogostejših zasevkov (Thompson in sod., 2006; Nomi in sod., 2007; Karim in sod., 2009, Maruse in sod., 2018), vendar se s tem ne strinjajo vsi avtorji (Bellmunt in sod., 2015; Darb-Esfahani in sod., 2015).

V veterinarski medicini je v primerjavi s humano medicino bistveno manj podatkov o PD-1 in PD-L1. Trenutno lahko v literaturi najdemo samo tri tovrstne raziskave. Izražanje PD-L1 je bilo

imunohistokemično dokazano v številnih tumorjih pri psih: oralnemu melanomu, osteosarkomu, hemangiosarkomu, MCT, adenokarcinomu prostate, adenomu in adenokarcinomu mlečne žleze, limfomu, malignemu fibroznemu histiocitomu, malignemu tumorju živčnih ovojnic, hemangiopericitomu in fibrosarkomu (Maekawa in sod., 2014; Maekawa in sod., 2016; Shosu in sod., 2016), medtem ko je bilo izražanje PD-1 z metodo pretočne citometrije dokazano v MCT, limfomu ter TIL oralnega melanoma, hepatocelularnega adenoma in adenokarcinoma (Maekawa in sod., 2016; Shosu in sod., 2016)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KRITERIJI ZA VKLJUČITEV MCT V RAZISKAVO

Raziskavo smo opravili na arhivskih parafinskih vzorcih 59 MCT, ki so bili med leti 2009 in 2017 poslani v histopatološko preiskavo na Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele (IPDRČ) Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

V raziskavo smo vključili le kožne MCT, zdravljeni izključno s kirurško resekcijo in, v nekaj primerih, dodatkom glukokortikoidov, pri katerih smo imeli na voljo dovolj vzorca za dodatna barvanja. Razen treh tumorjev so bili vsi odstranjeni s histološko potrjenim širokim varnostnim robom; le 1 MCT histološkega gradusa III je bil kirurško nepopolno odstranjen, 2 MCT histološkega gradusa III pa sta imela tumorske celice blizu robov.

Za vsak primer smo pridobili naslednje anamnestične podatke in podatke o poteku bolezni: starost, spol in pasma psa, število, lokacija in velikost tumorjev, prisotnost zasevkov, terapevtski postopki, kirurški robovi, lokalna ponovitev bolezni, preživetvena doba in vzrok smrti. Živali smo spremljali 24 mesecev po postavitvi patohistološke diagnoze.

Za namen te raziskave smo lokalno ponovitev bolezni definirali kot ponovitev tumorja na mestu kirurške resekcije, zasevek pa kot zasevanje tumorja v regionalne bezgavke oz. drug organ.

3.2 OBDELAVA VZORCEV TUMORJEV ZA PATOHISTOLOŠKO IN IMUNOHISTOKEMIČNO PREISKAVO

Vzorci tumorjev za patohistološko in imunohistokemično preiskavo so bili fiksirani v 10 % puferiranem formalinu in nato impregnirani s parafinom s pomočjo tkivnih procesorjev HypercenterXP (Shandon[®]) in Excelsior AS (Thermo Scientific[®]).

3.3 BARVANJE S HEMATOKSILINOM IN EOZINOM TER TOLUIDINSKIM MODRILOM

Z drsnim mikrotomom (Leica[®]) smo iz parafinskih blokov narezali tkivne rezine debeline 4 µm, ki smo jih v napravi Gemini (Thermo Scientific[®]) nato deparafinizirali v ksilolu in padajoči vrsti alkoholov. Eno rezino smo v napravi Gemini (Thermo Scientific[®]) obarvali s hematoksilinom in eozinom (HE), drugo rezino pa ročno s toluidinskim modrilom. Po končanem barvanju smo rezine dehidrirali v naraščajoči vrsti alkoholov in postopek barvanja zaključili z bistrenjem v ksilolu. Pobarvane tkivne rezine smo pokrili s sintetično smolo in pokrovnim stekelcem. Barvanje je bilo izvedeno po protokolu, ki se ga uporablja na IPDRČ.

3.4 IMUNOHISTOKEMIČNO OZNAČEVANJE

Parafinske tkivne rezine debeline 4 µm smo prenesli na objektna stekelca prevlečena s 3-aminopropiltrioksilanom (APTES) in jih nato čez noč sušili v termostatu pri temperaturi 45 °C. Pred imunohistokemičnim označevanjem smo tkivne rezine deparafinizirali v napravi Gemini (Thermo Scientific[®]).

Imunohistokemično označevanje smo izvajali ročno z vizualizacijskim kitom Dako REALTM EnVisionTM Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007).

Postopek imunohistokemičnega označevanja:

1. Deparafinizacija tkivnih rezin do vode.
2. Demaskiranje antigenov z mikrovalovi v citratnem pufru s pH 6,0 20 minut.
3. Hlajenje rezin do sobne temperature.
4. Spiranje v izpiralnem pufru (TRIS-HCl-NaCl pufer s pH 7,5), 5 minut.
5. Inkubacija z normalnim kozjim serumom (NGS, okr. angl. normal goat serum) (DAKO, kat. št. X0907), redčenem 1:50 v 5 % govejem serumskem albuminu, raztopljenem v PBS. To fazo smo uporabili samo pri tkivnih rezinah, na katere smo nanesli protitelo proti PD-L1.
6. Inkubacija s primarnim protitelesom v vlažni komori. Na osnovi predhodne optimizacije postopkov smo v tej fazi uporabili naslednja protitelesa:
 - kunče poliklonsko protitelo proti človeškemu CD117 (c-kit) (DAKO, kataloška oznaka A450229), v redčitvi 1: 300, inkubacija 1 uro na sobni temperaturi,

- kunčje poliklonsko protitelo proti človeškemu PD-1 (Invitrogen, kataloška oznaka PA5-32543), v redčitvi 1: 100, inkubacija čez noč na temperaturi 4 °C,
 - kunčje poliklonsko protitelo proti človeškemu PD-L1 (Biorbyt, kataloška oznaka orb 158130), v redčitvi 1: 200, inkubacija 45 minut na sobni temperaturi,
7. Spiranje v izpiralnem pufru (TRIS-HCl-NaCl pufer s pH 7,5), 5 minut.
 8. Inhibicija endogene peroksidaze s Peroxidase-Blocking Solution Dako REAL™ (DAKO), 30 minut.
 9. Spiranje v izpiralnem pufru (TRIS-HCl-NaCl pufer s pH 7,5), 5 minut.
 10. Inkubacija s sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s polimerom in označenimi s hrenovo peroksidazo, v vlažni komori pri sobni temperaturi, 30 minut. Uporabili smo sekundarna protitelesa iz vizualizacijskega kita DAKO REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007).
 11. Spiranje v izpiralnem pufru (TRIS-HCl-NaCl pufer s pH 7,5), 5 minut.
 12. Inkubacija v delovni raztopini barvnega substrata s 3-diaminobenzidinom (DAB) pri sobni temperaturi, 7 minut. Raztopino barvnega substrata smo pred uporabo pripravili tako, da smo pufru iz kita (Substrate Buffer) dodali kromogen iz kita (DAB + Chromogen) v razmerju 1 ml pufra in 20 µl kromogena.
 13. Spiranje z destilirano vodo in kontrastiranje z Meyerjevim hematoksilinom 1 minuto.
 14. Spiranje v puferirani fiziološki raztopini (PBS, angl. phosphate buffer saline) s pH 7,2 1 minuto.
 15. Spiranje v tekoči vodi 20 minut, dehidracija v naraščajoči vrsti alkoholov, bistrenje v ksilolu in pokrivanje s sintetično smolo.

Pozitivno reakcijo pri imunohistokemičnem označevanju, kjer kot barvni substrat uporabimo DAB, vidimo kot rjav reakcijski produkt. Jedra celic se po kontrastiranju s hematoksilinom obarvajo nežno modro-sivo.

3.4.1 Pozitivne in negativne kontrole pri imunohistokemičnem označevanju

Pri vsakem imunohistokemičnem označevanju smo uporabili pozitivno in negativno kontrolo. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili parafinske tkivne rezine MCT psa. Kot negativno

kontrolo smo uporabili parafinsko tkivno rezino MCT psa, pri kateri smo v postopku imunohistokemičnega označevanja primarno protitelo nadomestili z razredčilom za protitelesa (DAKO Cytomation Antibody Diluent, DAKO).

Ponovljivost imunohistokemične reakcije smo kontrolirali tako, da smo v vsako serijo barvanja vzorcev vključili tkivno rezino vzorca, ki je bil uspešno označen v prejšnji seriji. Ponovljivost reakcije smo ocenili subjektivno.

3.5 KRITERIJI ZA OCENJEVANJE HISTOLOŠKE STOPNJE MALIGNOSTI MASTOCITOMOV

S patohistološko preiskavo vzorcev MCT smo poleg postavitve diagnoze ocenili tudi histološko stopnjo malignosti po Patnaiuku in Kiupelu, tako kot je navedeno v pregledu literature (Patnaik in sod., 1984; Kiupel in sod., 2011).

3.6 OCENA IMUNOHISTOKEMIČNE REAKCIJE NA CD117 (c-kit) – VZOREC KIT-BARVANJA

Imunohistokemično reakcijo na CD117 smo ocenili na podlagi kriterijev, ki so jih opredelili Kiupel in sod. (2004), in glede na te ločili 3 vzorce barvanja:

- vzorec KIT-barvanja I, če smo ugotovili pozitivno reakcijo na celični membrani mastocitov in tumorskih celic,
- vzorec KIT-barvanja II, če smo ugotovili fokalno zrnčasto pozitivno reakcijo v citoplazmi tumorskih celic, in
- vzorec KIT-barvanja III, če smo ugotovili difuzno močno pozitivno reakcijo v citoplazmi tumorskih celic (Kiupel in sod., 2004).

3.7 OCENA IMUNOHISTOKEMIČNE REAKCIJE NA PD-1 IN PD-L1

V imunohistokemično označenih vzorcih smo ocenili, da tumor izraža PD-1 ali PD-L1 v primeru, če smo ugotovili specifičen reakcijski produkt v tumorskih celicah. V primeru, da reakcijskega produkta nismo ugotovili, smo ocenili, da MCT ne izraža antiga.

V primeru izražanja PD-1 ali PD-L1 smo zabeležili lokacijo in jakost imunohistokemične reakcije. Pri določanju lokacije imunohistokemične reakcije smo ločili med 3 tipi reakcij: membransko, perinuklearno in difuzno citoplazemsko. Pri posameznem vzorcu smo za lokacijo zabeležili prevladujoč tip reakcije. Jakost reakcije smo ocenili subjektivno glede na jakost izražanja reacijskega produkta v tumorskih celicah.

3.8 STATISTIKA

Podatke smo analizirali s komercialno dostopnim programskim orodjem SigmaStat (Systat Software, Inc). Za opis osnovnih podatkov smo uporabili deskriptivno statistiko. S pomočjo Shapiro-Wilk testa smo ugotavliali normalno porazdelitev podatkov. S pomočjo Kaplan-Meierjeve analize preživetja smo pridobili krivulje preživetja pacientov. Čas preživetja smo določili od dneva postavitve patohistološke diagnoze do dneva smrti zaradi MCT oziroma do konca časa opazovanja (24 mesecev). Živali, ki so bile na koncu študije še vedno žive, smo obdržali v raziskavi in smo jih v analizi preživetja cenzorirali. Kot signifikantno smo določili vrednost $p < 0,05$.

4 REZULTATI

V raziskavo smo vključili 59 kožnih MCT, ki so bili kirurško odstranjeni s 57 psov. Psi, vključeni v raziskavo, so bili stari med 3 in 13 let, povprečna starost je bila 7 let in 11 mesecev. Med psi je bilo 25 samic (2 nesterilizirani, 8 steriliziranih, 15 brez podatka), 22 samcev (1 nekastriran, 8 kastriranih, 13 brez podatka), medtem ko za 10 psov nimamo podatka o spolu. Najpogosteje zastopane pasme so bile nemški bokser (11/57), mešanec (7/57), mops (6/57), francoski bulldog, Stafordshire terier in labradorec (3/57).

Tumorji so bili najpogosteje locirani na trupu in okončinah (22/59), manj pogosto na glavi (5/59), modniku (3/59), vratu, hrbtnu in repu (1/59), medtem ko za 4 tumorje lokacija ni znana. Tumorji so bili premera med 0,3 in 10 cm, s povprečnim premerom 1,75 cm.

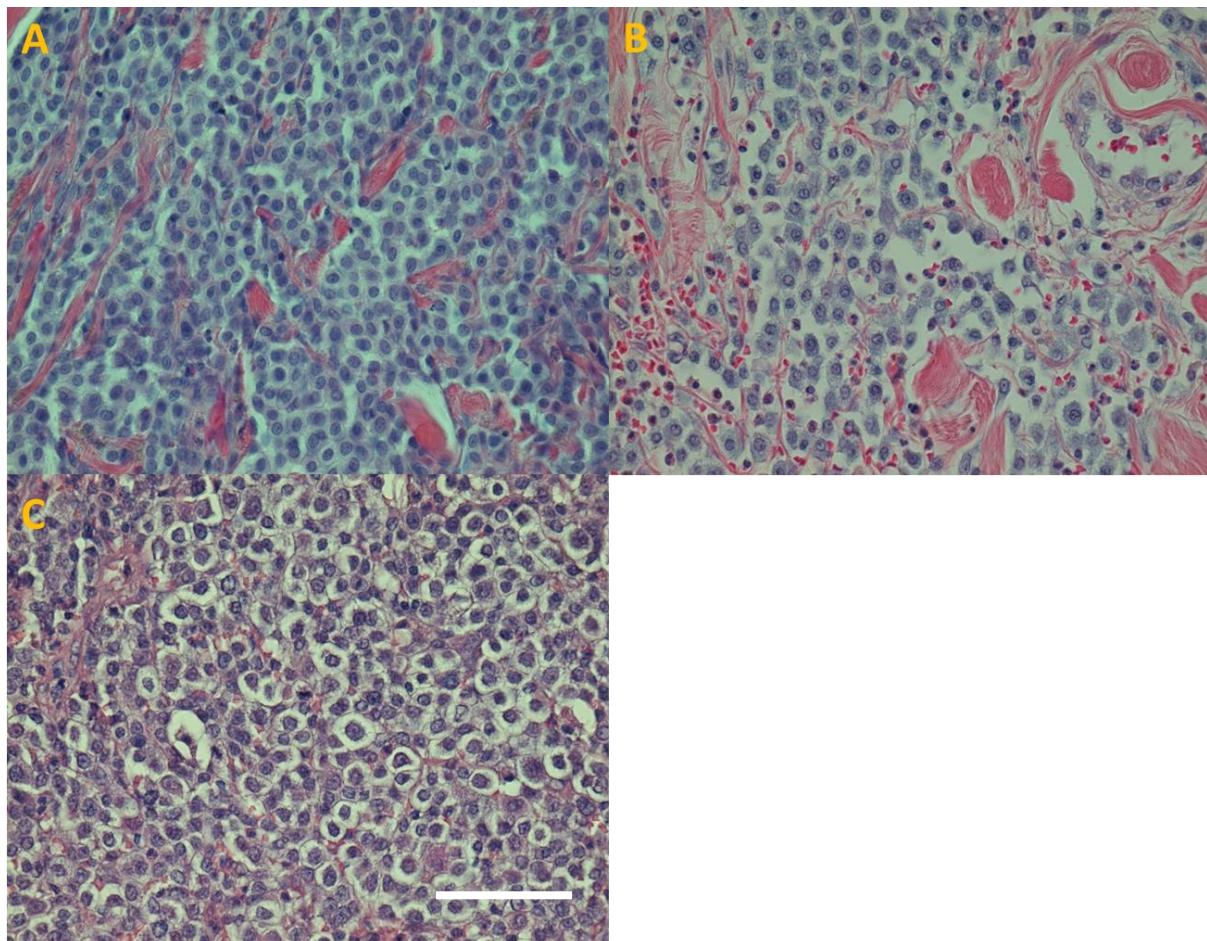
Večina, 47 psov, je imelo po 1 tumor, 6 jih je imelo 2 tumorja, za 4 podatek ni znan.

Ugotovili smo 5 primerov lokalne ponovitve bolezni in 5 primerov zasevkov. Histološko smo v še enem primeru ugotovili žilno in limfno invazijo tumorskih celic ter 2 premetastatski bezgavki, ki pa se niso odrazili s klinično zaznavnim zasevkom. Kot posledica MCT je poginilo oz. bilo evtanaziranih 11 psov.

4.1 HISTOLOŠKE STOPNJE MALIGNOSTI MCT

Glede na kriterije, ki so jih opisali Patnaik in sod. (1984) smo 18 (30,5 %) tumorjev ocenili kot MCT histološkega gradusa I, 27 (45,8 %) tumorjev kot MCT histološkega gradusa II in 14 (23,7 %) tumorjev kot MCT histološkega gradusa III (Slika 3).

Glede na kriterije, ki so jih je opisali Kiupel in sod. (2011), smo 44 (74,6 %) tumorjev ocenili kot MCT nizke stopnje malignosti in 15 (25,4 %) tumorjev kot MCT visoke stopnje malignosti. Vsi MCT histološkega gradusa I po Patnaiku so bili nizke stopnje malignosti po Kiupelu. 26 MCT histološkega gradusa II po Patnaiku je bilo nizke stopnje malignosti po Kiupelu in le 1 visoke stopnje malignosti. Vsi MCT histološkega gradusa III po Patnaiku so bili ocenjeni kot MCT visoke stopnje malignosti po Kiupelu.



Slika 3: MCT različnih histoloških gradusov po Patnaiku. A. MCT histološkega gradusa I. Dobro diferencirane, okrogle, monomorfne tumorske celice z jasno vidnimi celičnimi mejami in obilico citoplazme. Jedra tumorskih celic so okrogla in imajo po eno jedrce ali jedrce ni vidno. Mitoz ni. HE, x 400. B. MCT histološkega gradusa II. Zmerno pleomorfne, okrogle do ovalne tumorske celice s pretežno izrazito granulirano citoplazmo. Jedra so okrogla do vdrta z enim jedrcem. Posamezne celice imajo dve jedri. HE, x 400. C. MCT histološkega gradusa III. Gostoceličen tumor s celicami, ki so okrogle, ovalne ali vretenaste oblike ter močno anizocitotične. Citoplazma tumorskih celic je slabo granulirana. Jedra celic so okrogla do vdrta in vezikularna z enim ali več izrazitim jedrci. Pogoste so dvojedrne celice in mitoze. HE, x 400. Merilo za A, B in C = 50 µm.

Figure 3: MCTs of different histological grades of malignancy according to Patnaik grading system. A. **Grade I MCT.** Well differentiated, round, monomorphic neoplastic cells with distinct borders and abundant granular cytoplasm. Nuclei are round with a single nucleolus or the nucleoli are not visible. There are no mitotic figures. HE, x 400. B. **Grade II MCT.** Moderately pleomorphic, round to oval-shaped neoplastic cells with mostly distinct granular cytoplasm. Nuclei are round to indented with single nucleoli. Single neoplastic cells have two nuclei. HE, x 400. C. **Grade III MCT.** Highly cellular tumor with neoplastic cells that are pleomorphic, round, oval or spindle-shaped and severely anisocytotic. Cytoplasm of neoplastic cells is poorly granulated. Nuclei are round to indented and vesicular, with one or more distinct nucleoli. Binucleated cells are common, as well as mitotic figures. HE, x 400. Bar for A, B and C = 50 µm.

Lokalno ponovitev bolezni smo zabeležili pri 5,5 % MCT gradusa I, 7,4 % MCT gradusa II in 14,3 % MCT gradusa III po Patnaiku, oz. pri 6,8 % MCT nizke histološke stopnje malignosti

in 13,3 % MCT visoke histološke stopnje malignosti. Zasevke smo zabeležili pri 3,7 % MCT gradusa II in 28,6 % MCT gradusa III po Patnaiku, oz. 26,7 % MCT visoke histološke stopnje malignosti.

Neposredno zaradi MCT je poginilo oz. bilo evtanaziranih 7,4 % psov z MCT histološkega gradusa II in 64,3 % psov z MCT histološkega gradusa III (Tabela 2) oz. 66,7 % psov z MCT visoke histološke stopnje malignosti (Tabela 3). Vsi psi z MCT gradusa I po Patnaiku so preživeli čas opazovanja 24 mesecev.

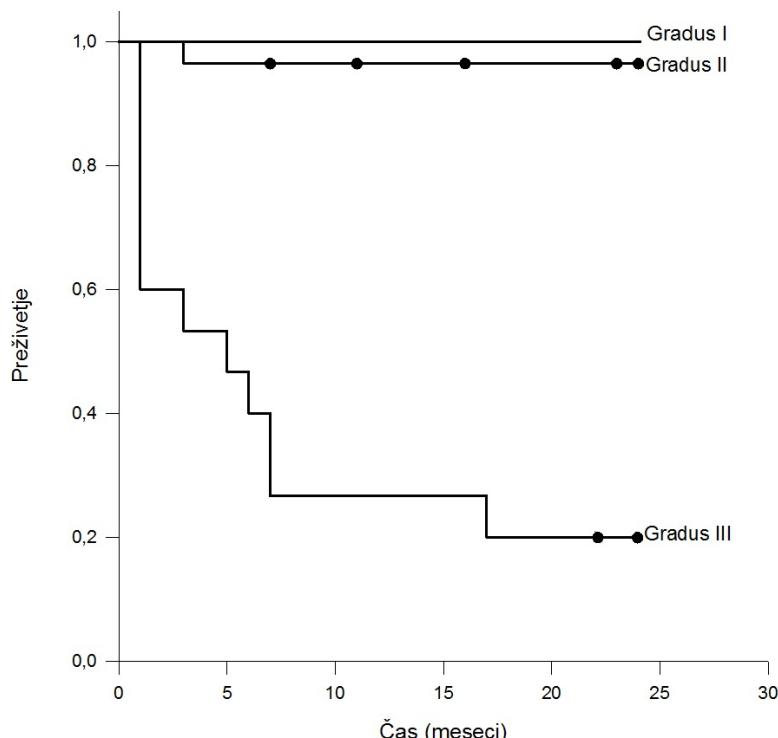
Mediana časa preživetja psov z MCT gradusa III po Patnaiku oziroma visoke histološke stopnje malignosti je bila 5 mesecev. Povprečen čas preživetja psov z MCT gradusa III je bil statistično značilno krajši v primerjavi s časom preživetja psov z MCT gradusa I in II ($p < 0,001$), kot tudi pri psih z MCT visoke stopnje malignosti po Kiupelu v primerjavi s psi z MCT nizke stopnje malignosti ($p < 0,001$) (Slika 4). Razlika v času preživetja je bila statistično značilna tako za pse z gradusom III v primerjavi z gradusoma I in II ($p < 0,001$), kot tudi med psi z MCT z nizko in visoko histološko stopnjo malignosti ($p < 0,001$) (Slika 5).

Tabela 2: Pogostost lokalne ponovitve bolezni, zasevkov in smrtnosti zaradi MCT pri različnih histoloških gradusih MCT po Patnaiku. V posameznem stolcu je navedeno število primerov z določeno klinično značilnostjo od vseh primerov MCT določenega gradusa.

Table 2: The frequency of local recurrence, metastases and mortality due to MCT of different histological grades of malignancy according to Patnaik system. Each column represents the number of cases with a specific clinical characteristic out of all MCT with a particular histological grade.

Klinična značilnost	MCT G I	MCT G II	MCT G III
Lokalna ponovitev bolezni	1/18 (5,5 %)	2/27 (7,4 %)	2/14 (14,3 %)
Zasevek	0/18 (0 %)	1/27 (3,7 %)	4/14 (28,6 %)
Pgin zaradi MCT	0/18 (0 %)	2/27 (7,4 %)	9/14 (64,3 %)

G I: gradus I po Patnaiku, G II: gradus II po Patnaiku, G III: gradus III po Patnaiku



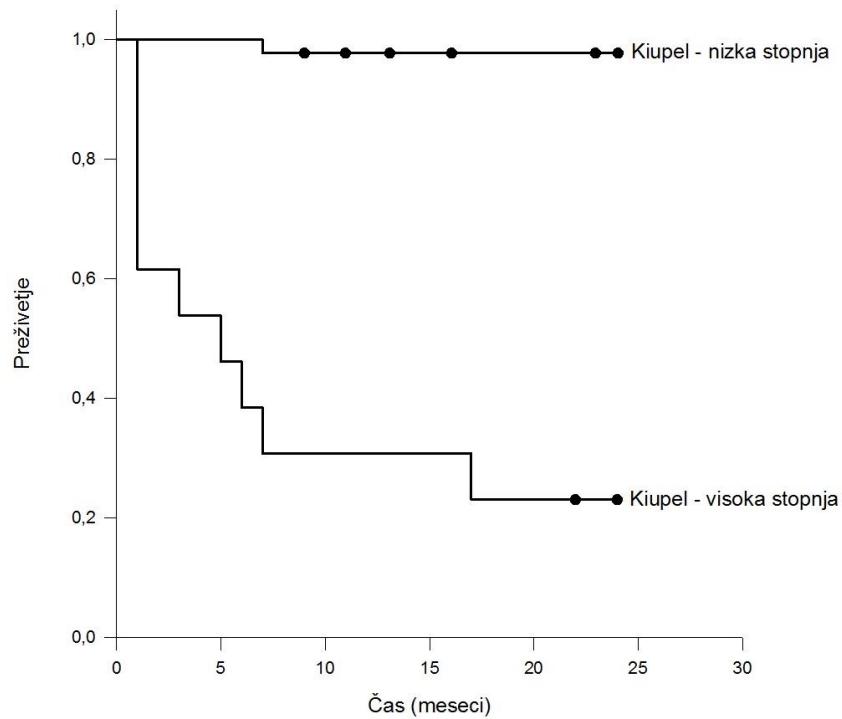
Slika 4. Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse z MCT različnih histoloških gradusov malignosti po Patnaiku.

Figure 4. Kaplan-Meier survival plot for dogs with MCT of different histologic grades of malignancy according to Patnaik grading system.

Tabela 3: Pogostost lokalne ponovitve bolezni, zasevkov in smrtnosti zaradi MCT pri MCT nizke in visoke stopnje malignosti po Kiupelu. V posameznem stolpcu je navedeno število primerov z določeno klinično značilnostjo od vseh primerov MCT določene stopnje malignosti.

Table 3: The frequency of local recurrence, metastases and mortality due to MCT in MCT of low and high grade of malignancy according to Kiupel system. Each column represents the number of cases with a specific clinical characteristic out of all MCT with a particular histological grade.

Klinična značilnost	MCT nizke	MCT visoke
	stopnje malignosti	stopnje malignosti
Lokalna ponovitev bolezni	3/44 (6,8 %)	2/15 (13,3 %)
Zasevek	1/44 (2,3 %)	4/15 (26,7 %)
Pogin zaradi MCT	1/44 (2,3 %)	10/15 (66,7 %)

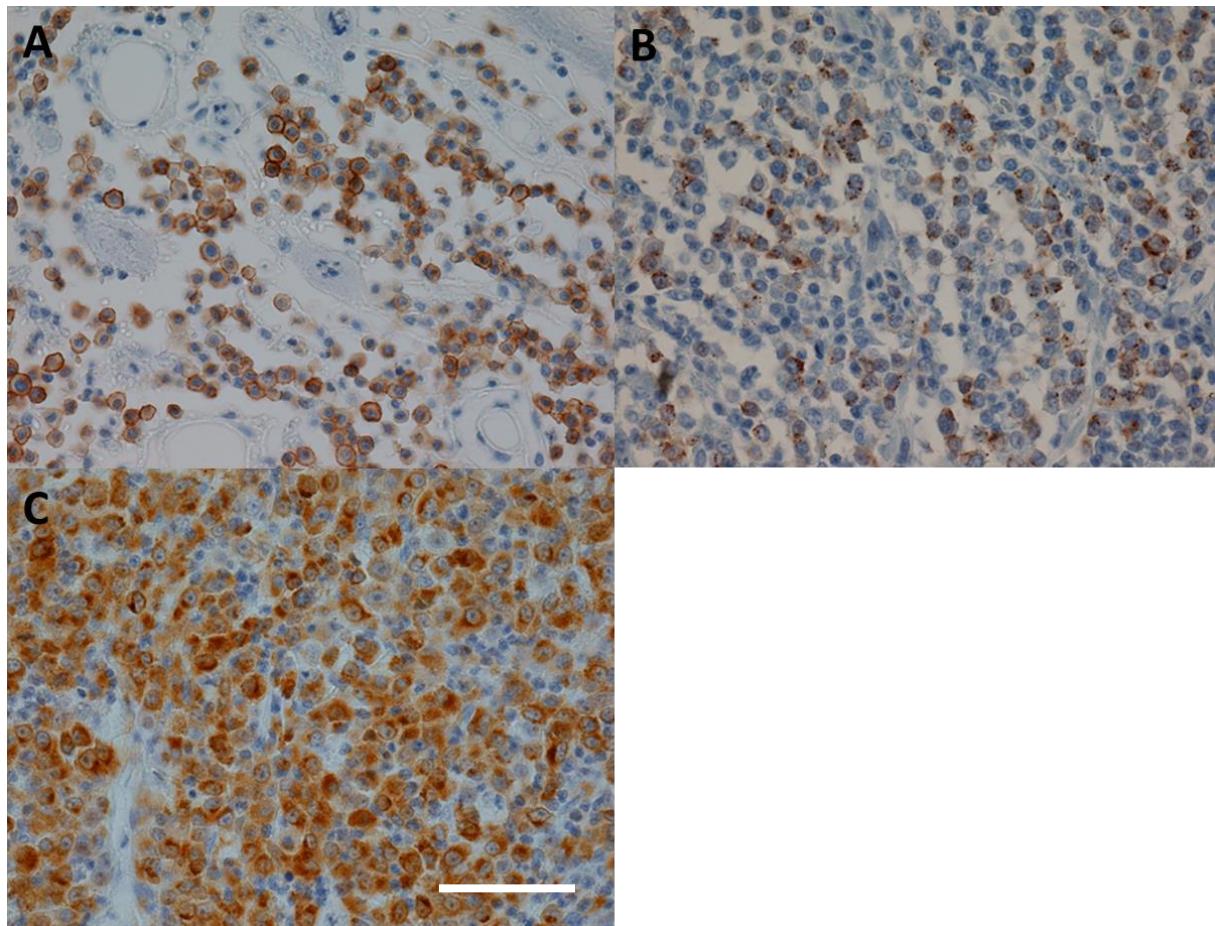


Slika 5. Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse z MCT nizkega in visokega histološkega gradusa malignosti po Kiupelu.

Figure 5. Kaplan-Meier survival plot for dogs with MCT of low and high histologic grades of malignancy according to Kiupel grading system.

4.2 IMUNOHISTOKEMIČNO IZRAŽANJE ANTIGENA CD117 (c-kit) – VZOREC KIT-BARVANJA

Najpogostejši je bil vzorec KIT-barvanja I, ki smo ga ugotovili pri 36 MCT, vzorec KIT-barvanja II in vzorec KIT-barvanja III pa smo ugotovili pri po 11 MCT (Slika 6).



Slika 6: Vzorci KIT-barvanja. A. MCT z vzorcem KIT-barvanja I. Pozitivna imunohistokemična reakcija na celičnih membranah tumorskih celic v MCT. B. MCT z vzorcem KIT-barvanja II. Fokalna zrnčasta pozitivna imunohistokemična reakcija v citoplazmi tumorskih celic. C. MCT z vzorcem KIT-barvanja III. Difuzna močna pozitivna imunohistokemična reakcija v citoplazmi tumorskih celic. Imunohistokemično barvanje s poliklonalskim protitelesom proti človeškemu CD 117 (DAKO), kontrastirano s hematoksilinom, X 400. Merilo za A, B in C = 50 µm.

Figure 6: KIT-staining patterns. A. MCT with KIT-staining pattern I. Membrane-associated immunohistochemical staining of neoplastic cells. B. MCT with KIT-staining pattern II. Focal or stippled immunohistochemical cytoplasmic staining of neoplastic cells. C. MCT with KIT-staining pattern III. Intense diffuse immunohistochemical cytoplasmic staining of neoplastic cells. Immunohistochemical staining with polyclonal antibody against human CD 117 (DAKO), counterstained with haematoxylin, x 400. Bar for A, B and C = 50 µm.

Vzorec KIT-barvanja I je izražalo 83,3 % MCT histološkega gradusa I in 77,8 % MCT histološkega gradusa II. Vzorec KIT-barvanja II so izražali 3 MCT histološkega gradusa I (16,7 %) ter po 4 MCT histoloških gradusov II (14,8 %) in III (20,8 %).

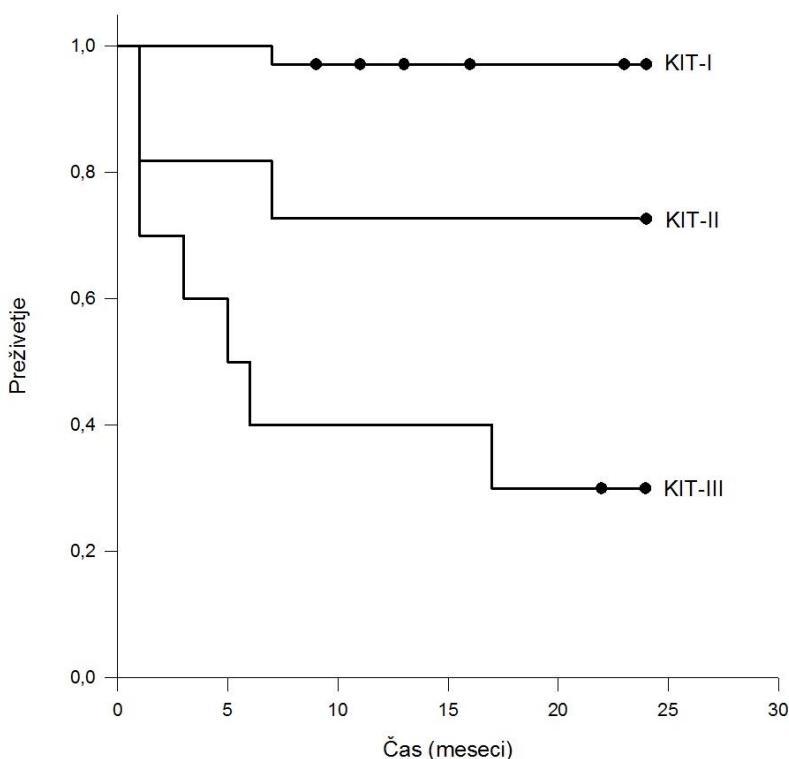
Vzorec KIT-barvanja III je izražalo 9 MCT histološkega gradusa III po Patnaiku (69,2 %) oz. 10 MCT visoke stopnje malignosti po Kiupelu (71,4 %) ter 2 MCT histološkega gradusa II (7,4 %) po Patnaiku oz. 1 MCT nizke stopnje malignosti po Kiupelu (Tabela 4).

Lokalno ponovitev bolezni smo zabeležili pri 2 (5,6 %) MCT z vzorcem KIT-barvanja I, 2 (18,2 %) MCT z vzorcem KIT-barvanja II in 1 (9,1 %) MCT z vzorcem KIT-barvanja III. Zasevke smo zabeležili pri 1 (2,8 %) MCT z vzorcem barvanja KIT-I, 1 (9,1 %) MCT z vzorcem barvanja KIT-II in 3 (27,3 %) MCT z vzorcem barvanja KIT-III. Neposredno zaradi MCT je poginilo oz. bilo evtanaziranih 1 (2,8 %) (KIT-I), 3 (27,3 %) (KIT-II) in 7 (63,6 %) (KIT-III) psov (Slika 7).

Tabela 4: Pogostost različnih vzorcev KIT-barvanja pri MCT različnih histoloških stopenj malignosti po Patnaiku in Kiupelu ter pogostost lokalne ponovitve bolezni, zasevkov in smrtnost zaradi MCT pri različnih vzorcih KIT-barvanja. V posameznem stolpcu je navedeno število primerov z določeno klinično-patološko značilnostjo od vseh primerov MCT z določenim vzorcem KIT-barvanja.

Table 4: Frequency of KIT-staining patterns in MCT of different histological grades of malignancy according to Patnaik and Kiupel system, and the frequency of local recurrence, metastases and mortality due to MCT in different KIT-staining patterns. Each column represents the number of cases with a specific clinico-pathological characteristic out of all MCT with a particular KIT-staining pattern.

Klinično-patološka značilnost	Vzorec KIT-barvanja I	Vzorec KIT-barvanja II	Vzorec KIT-barvanja III
MCT histološkega gradusa I	15/18 (83,3 %)	3/18 (16,7 %)	0/18 (0 %)
MCT histološkega gradusa II	21/27 (77,8 %)	4/27 (14,8 %)	2/27 (7,4 %)
MCT histološkega gradusa III	0/13 (0 %)	4/13 (30,8 %)	9/13 (69,2 %)
<hr/>			
MCT nizke stopnje malignosti	36/44 (81,8 %)	7/44 (15,9 %)	1/44 (2,3 %)
MCT visoke stopnje malignosti	0/13 (0 %)	4/14 (28,6 %)	10/14 (71,4 %)
<hr/>			
Lokalna ponovitev bolezni	2/36 (5,6 %)	2/11 (18,2 %)	1/11 (9,1 %)
Zasevki	1/36 (2,8 %)	1/11 (9,1 %)	3/11 (27,3 %)
Pogin zaradi MCT	1/36 (2,8 %)	3/11 (27,3 %)	7/11 (63,6 %)
<hr/>			



Slika 7. Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse z MCT z različnimi vzorci KIT-barvanja.

Figure 7. Kaplan-Meier survival plot for dogs with different KIT-staining patterns.

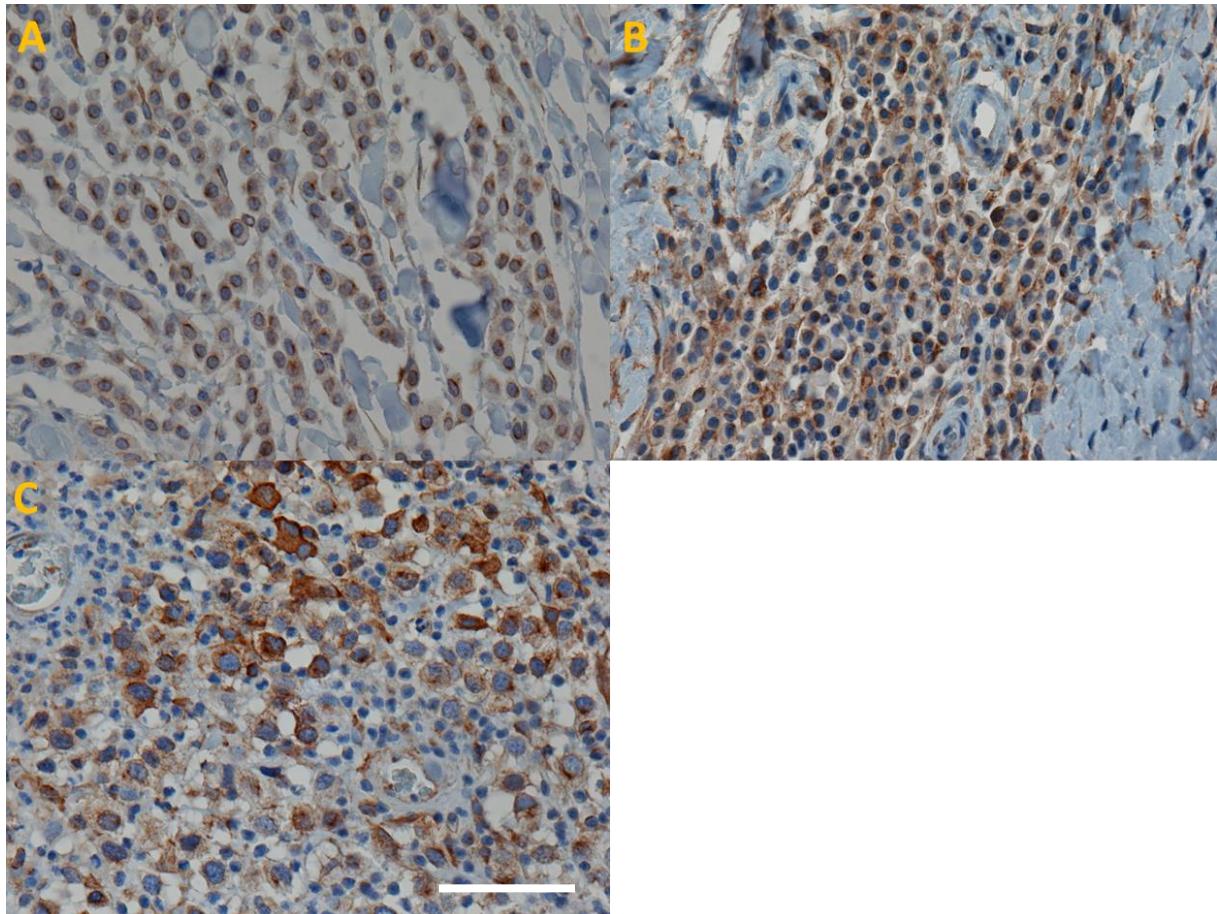
4.3 IMUNOHISTOKEMIČNO IZRAŽANJE ANTIGENA PD-1

Izražanje antiga PD-1 smo ugotovili pri skupno 32/59 MCT (54,2 %). Antigen PD-1 je izražalo 11/18 (61,1 %) MCT histološkega gradusa I, 17/27 (63,0 %) MCT histološkega gradusa II in 4/14 (28,6 %) MCT histološkega gradusa III, oz. 17/44 (38,6 %) MCT nizke stopnje malignosti in 5/15 (33,3 %) MCT visoke stopnje malignosti (Tabela 5).

Izražanje antigen PD-1 smo ugotovili v tumorskih celicah v treh različnih vzorcih barvanja: difuzna citoplazemska reakcija, reakcija na površini celične membrane (membranska) in perinuklearna reakcija. V nekaterih MCT smo ugotovili kombinacijo dveh različnih vzorcev barvanj (Slika 8). Vzorec barvanja ni bil v korelaciiji s histološko stopnjo malignosti.

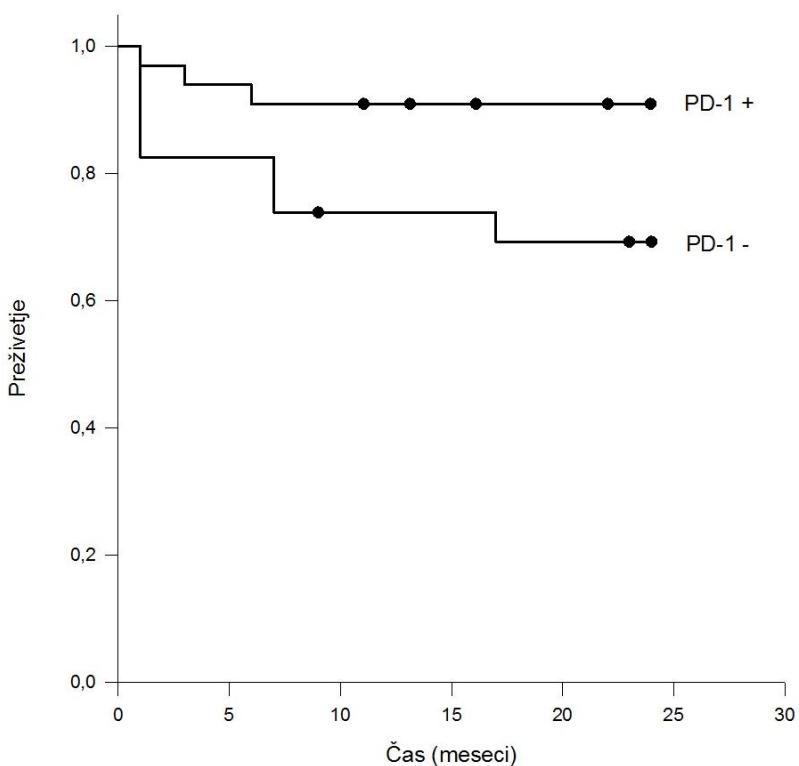
Lokalno ponovitev bolezni smo zabeležili pri 9,4 % MCT, ki so izražali PD-1, oz. pri 7,4 % MCT, ki niso izražali PD-1. Zasevke smo zabeležili pri 3,1 % psov z MCT, ki so izražali PD-1, oz. 14,8 % psov z MCT, ki niso izražali PD-1. Zaradi MCT je poginilo 9,4 % psov z MCT,

ki so izražali PD-1, oz. 25,0 % psov z MCT, ki niso izražali PD-1. Razlika v času preživetja je bila statistično značilna med skupinama psov, katerih MCT so izražali PD-1 in tistimi, ki tega antiga niso izražali ($p < 0,05$) (Slika 9).



Slika 8. Vzorci imunohistokemičnega izražanja PD-1. A. Perinuklearna reakcija. B. Reakcija na površini celične membrane (membranska). C. Močna difuzna citoplazemska reakcija. Imunohistokemično barvanje s poliklonalskim protitelesom proti človeškemu PD-1 (Invitrogen), kontrastirano s hematoksilinom, X 400. Merilo za A, B in C = 50 µm.

Figure 8. Different patterns of PD-1 expression. A. Perinuclear reaction. B. Reaction on the cellular membrane (membranous). C. Intense diffuse cytoplasmic reaction. Immunohistochemical staining with polyclonal antibody against human CD-1 (Invitrogen), counterstained with haematoxylin, x 400. Bar for A, B and C = 50 µm.



Slika 9. Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse z MCT, ki so izražali/niso izražali PD-1.

Figure 9. Kaplan-Meier survival plot for dogs with MCTs that expressed/not expressed PD-1.

4.4 IMUNOHISTOKEMIČNO IZRAŽANJE ANTIGENA PD-L1

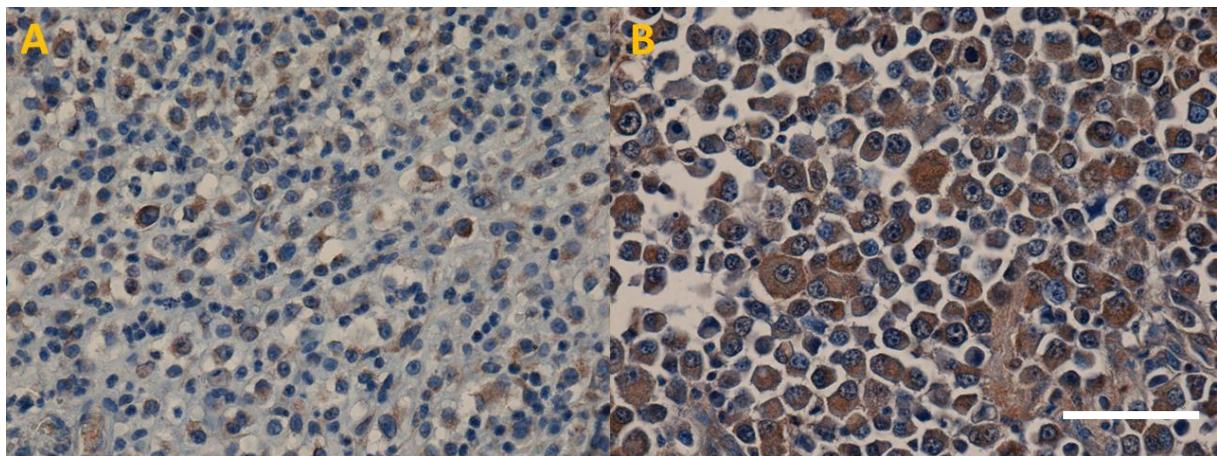
Izražanje antiga PD-L1 smo ugotovili pri 15/42 preiskanih MCT (35,7 %): 3/14 (21,4 %) MCT histološkega gradusa I, 8/19 (42,1 %) MCT histološkega gradusa II in 4/9 (44,4 %) MCT histološkega gradusa III oz. 11/33 (33,3 %) MCT nizke stopnje malignosti in 4/9 (44,4 %) MCT visoke stopnje malignosti (Tabela 5).

Tabela 5: Pogostost izražanja PD-1 in PD-L1 v MCT različnih histoloških stopenj malignosti po Patnaiku in Kiupelu. V posameznem stolpcu je navedeno število MCT, ki so izražali antigen, od vseh primerov MCT določene stopnje malignosti.

Table 5: Frequency of PD-1 and PD-L1 expression in MCT of different histological grades of malignancy according to Patnaik and Kiupel system. Each column represents the number of MCTs expressing PD-1/PD-L1 out of all cases of MCT of a particular histological grade of malignancy.

Histološka stopnja malignosti	Izražanje PD-1	Izražanje PD-L1
MCT histološkega gradusa I	11/18 (61,1 %)	3/14 (21,4 %)
MCT histološkega gradusa II	17/27 (63,0 %)	8/19 (42,1 %)
MCT histološkega gradusa III	4/14 (28,6 %)	4/9 (44,4 %)
<hr/>		
MCT nizke stopnje malignosti	17/44 (38,6 %)	11/33 (33,3 %)
MCT visoke stopnje malignosti	5/15 (33,3 %)	4/9 (44,4 %)
<hr/>		

Antigen PD-L1 so izražale tumorske celice, v njih smo ugotovili difuzno citoplazemsko reakcijo, ki je bila v nekaterih tumorjih blaga, v drugih pa močna (Slika 10). MCT gradusa I in II so izražali blago ali močno imunohistokemično reakcijo, medtem ko so vsi MCT gradusa III izražali močno imunohistokemično reakcijo.



Slika 10. Imunohistokemično izražanje PD-L1 v MCT. A. Šibka citoplazemska reakcija. B. Močna citoplazemska reakcija. Imunohistokemično barvanje s poliklonalskim protitelesom proti človeškemu PD-L1 (Biorbyt), kontrastirano s hematoksilinom, X 400. Merilo za A in B = 50 µm.

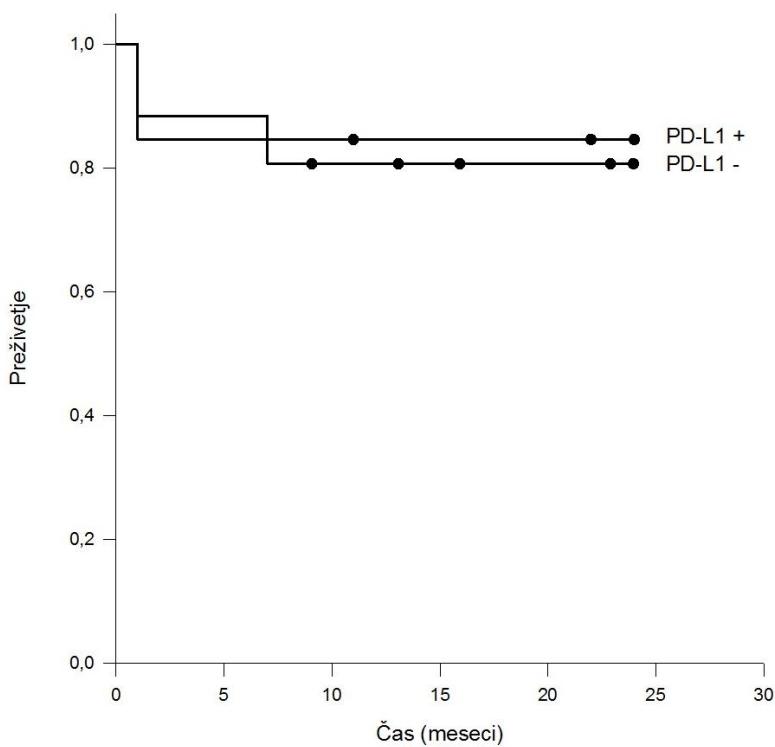
Figure 10. Immunohistochemical expression of PD-L1 in MCT. A. Weak cytoplasmic reaction. B. Intense diffuse cytoplasmic reaction. Immunohistochemical staining with polyclonal antibody against human PD-L1 (Biorbyt), counterstained with haematoxylin, x 400. Bar for A and B = 50 µm.

Lokalno ponovitev bolezni smo zabeležili pri 13,3 % MCT, ki so izražali PD-L1, oz. pri 11,5 % MCT, ki niso izražali PD-L1. Zasevke smo zabeležili pri 13,3 % psov z MCT, ki so izražali PD-L1, oz. 7,4 % psov z MCT, ki niso izražali PD-L1. Zaradi MCT je poginilo 13,3 % psov z MCT, ki so izražali PD-L1 in 22,2 % psov z MCT, ki niso izražali PD-L1 (Tabela 6, Slika 11).

Tabela 6: Pogostost lokalne ponovitve bolezni, zasevkov in smrtnosti zaradi MCT glede na izražanje/neizražanje antiga PD-1 in PD-L1. V posameznem stolpcu je navedeno število primerov MCT z določeno klinično značilnostjo, ki so izražali/niso izražali antiga od vseh primerov MCT, ki so izražali/niso izražali antiga.

Table 6: Frequency of local recurrence, metastases and mortality due to MCT with respect to the expression/non-expression of PD-1 and PD-L1. Each column represents the number of cases of MCTs with a specific clinical characteristic that expressed / did not express the antigens out of all cases of MCTs that expressed/ did not express the antigen.

Značilnost	Izražanje	Neizražanje	Izražanje	Neizražanje
	PD-1	PD-1	PD-L1	PD-L1
Ponovitev bolezni	3/32 (9,4 %)	2/27 (7,4 %)	2/15 (13,3 %)	3/27 (11,5 %)
Zasevki	1/32 (3,1 %)	4/27 (14,8 %)	2/15 (13,3 %)	2/27 (7,4 %)
Pgin zaradi MCT	3/32 (9,4 %)	8/32 (25,0 %)	2/15 (13,3 %)	6/27 (22,2 %)



Slika 11. Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja za pse z MCT, ki so izražali/niso izražali PD-L1.

Figure 11. Kaplan-Meier survival plot for dogs with MCTs that expressed/not expressed PD-L1.

5 RAZPRAVA

Glavni cilji naše raziskave so bili primerjati napovedno vrednost tristopenjskega Patnaikovega in dvostopenjskega Kiupelovega sistema gradiranja pasjih MCT ter proučiti uporabnost vzorca KIT-barvanja kot napovednega dejavnika za MCT. Poleg tega smo želeli pridobiti podatke o izražanju PD-1 in PD-L1 v MCT različnih histoloških stopenj malignosti in raziskati povezavo med izražanjem navedenih celičnih označevalcev ter ponovitvijo bolezni in časom preživetja psov, da bi ocenili, ali je izražanje PD-1 in PD-L1 v MCT uporabno za napoved poteka bolezni. V raziskavo smo vključili skupno 59 MCT, ki so bili odstranjeni pri 57 psih. Povprečna starost psov, najpogosteje zastopane pasme, lokacija in število tumorjev ter približno enakomerna zastopanost samic in samcev v naši raziskavi so skladni s podatki, ki jih navajajo drugi avtorji (Welle in sod., 2008; Blackwood in sod., 2012; London in Thamm, 2013; Stefanello in sod., 2015). Večina MCT, ki so povzročili smrt psa, je bilo lociranih na okončinah ali trupu, ki ne veljata za prognostično neugodni lokaciji (Welle in sod., 2008; London in Thamm, 2013). Po literarnih podatkih med anatomske lokacije, ki so povezane s slabšo prognozo, spadajo ustna votlina, področje pod kremlji, perinealno področje, mukokutani prehodi, modnik in prepucij, ingvinalno področje in smrček (Welle in sod., 2008; London in Thamm, 2013). V našo raziskavo smo vključili 4 tumorje s teh področij, od tega 3 na modniku in 1 na mukokutanem prehodu (ustnici). Od treh psov z MCT na modniku je po naših podatkih zaradi MCT poginil eden, dva pa sta bila brez znakov ponovitve bolezni 24 mesecev po postavitvi diagnoze. Zanimivo je, da je pri psu, pri katerem je prišlo do zasevanja MCT z modnika v pljuča, šlo za tumor nizke histološke stopnje malignosti oz. histološkega gradusa II. To se sklada z literurnimi podatki, ki MCT modnika opisujejo kot agresivnejšega ne glede na histološko stopnjo malignosti (London in Thamm, 2013). V naši raziskavi je bil zgolj en tumor lociran na mukokutanem prehodu (ustnica), ki zaradi domnevno agresivnejše narave tumorja po mnenju nekaterih avtorjev velja za prognostično neugodno lokacijo (Welle in sod., 2008; London in Thamm, 2013). Po mnenju drugih avtorjev je slabša prognoza MCT na tej lokacijah lahko posledica težav pri izvedbi ustrezne (dovolj radikalne) kirurške terapije (Blackwood in sod., 2012). Pes je zaradi MCT ustnice sicer poginil, vendar je bil MCT v tem primeru histološkega gradusa III, ki je prognostično mnogo neugodnejši ne glede na lokacijo (Patnaik in sod., 1984; Welle in sod., 2008), zato vpliv lokacije v tem primeru težko ocenimo.

Metastatski potencial MCT ni znan in je odvisen od narave tumorja (Welle in sod., 2008). Stefanello in sod. (2015) v raziskavi s 386 MCT poročajo o 18,7 % zasevanju, medtem ko je v naši raziskavi zasevalo 8,5 % MCT. Poudariti je treba, da je bil v našo raziskavo vključen relativno visok delež MCT histološkega gradusa I po Patnaiku (30,5 %) v primerjavi z raziskavo Stefanella in sod. (13,5 %), kar pomeni, da rezultati niso povsem primerljivi.

5.1 HISTOLOŠKA STOPNJA MALIGNOSTI IN KORELACIJA S KLINIČNIMI ZNAČILNOSTMI

Histološka stopnja malignosti je najpomembnejši samostojni napovedni dejavnik pri pasjih MCT (Blackwood in sod., 2012). Tudi v naši raziskavi se je izkazala kot pomemben napovedani dejavnik, saj so vsi psi z MCT histološkega gradusa I razen enega (MCT na modniku), oz. z MCT nizke stopnje malignosti preživeli več kot 24 mesecev, medtem ko je večina živali s histološkim gradusom III/visoko stopnjo malignosti poginila zaradi MCT v 1 do 17 mesecih po postavitvi diagnoze (mediana 5 mesecev). Po podatkih Patnaika in sod. (1984) je 93 % psov z MCT gradusa I preživilo več kot 1500 dni, medtem, ko je to obdobje preživilo le 47 % psov z MCT gradusa II in samo 6 % psov z MCT gradusa III. V naši raziskavi je več kot 24 mesecev preživilo 100 % živali z MCT gradusa I, 81 % živali z MCT gradusa II in 8 % z MCT gradusa III. V raziskavi Kiupela in sod. (2011) je bil mediani čas preživetja psov z MCT visoke stopnje malignosti manj kot 4 mesece, za pse z MCT nizke stopnje malignosti pa več kot 2 leti, kar je primerljivo z našimi rezultati.

Kljub temu da je Patnaikov sistem še vedno zlati standard za napoved poteka bolezni pri psih z MCT, ima določene pomanjkljivosti. Med največjimi pomanjkljivostmi sta dejstvi, da po teh kriterijih prevladujejo MCT gradusa II, ki imajo zelo raznoliko biološko obnašanje, ter da se med različnimi ocenjevalci pojavljajo velike razlike v ocenah. V raziskavi Patnaika in sod. (1984) je kar 56 % MCT gradusa II povzročilo smrt psov, v drugih raziskavah je bil ta delež bistveno manjši, npr. 27 % pri Kiupelu in sod. (2011) oz. 23 % pri Vascellarijevi in sod. (2013). Najverjetnejše je vzrok za tako velike razlike med tumorji gradusa II subjektivnost pri ocenjevanju histološkega gradusa po Patnaiku. Namreč, v svoji raziskavi so Northrup in sod. (2005) ugotovili, da nekatere MCT različni patologi lahko ocenijo z različnimi gradusi. Kot možne vzroke za tako velike razlike v ocenah navajajo razlike v objavljenih sistemih gradiranja, heterogenost tumorjev (nekateri MCT lahko izražajo značilnosti več kot enega histološkega

gradusa) in subjektivnost patologov pri uporabi kriterijev (Northrup in sod., 2005). Poleg tega pa glede na kriterije Patnaika in sod. nekateri MCT, kljub temu da so biološko agresivni, nimajo dovolj visokega števila mitoz in so zato ocenjeni z nižjim histološkim gradusom malignosti, ker ne izpolnjujejo navedenih kriterijev za oceno gradusa III (Northrup in sod., 2005; Kiupel in sod., 2011).

V naši raziskavi je bil delež MCT histološkega gradusa II, ki so povzročili smrt, bistveno nižji, samo 7,4 % - dejansko sta samo dva tumorja od skupno 27 povzročila smrt pacienta. Eden od njiju je bil MCT, ki je bil po Kiupelu ocenjen z visoko stopnjo malignosti, drugi pa MCT na prognostično neugodni anatomske lokaciji, modniku. Iz navedenih rezultatov izhaja, da se velika večina MCT, ocenjenih z gradusom II (92,6 %), biološko ni obnašala drugače kot MCT histološkega gradusa I.

Vendar pa niti Patnaikov, niti Kiupelov sistem klasifikacije MCT v naši raziskavi nista uspela napovedati lokalne ponovitve bolezni. Več kot polovica primerov, ki so se lokalno ponovili (3/5 oz. 60 %), je bilo namreč nizke stopnje malignosti oz. histoloških gradusov I ali II. Tumorji so se ponovili kljub temu, da so bili, sodeč po histološko določenih robovih, odstranjeni v celoti. Histološka stopnja malignosti namreč ne upošteva nekaterih drugih prognostično pomembnih dejavnikov, kot je recimo anatomska lokacija tumorja. V naši raziskavi se je npr. kot prognostično zelo neugoden (zasevki v pljučih in smrt živali 7 mesecev po postavitvi diagnoze) izkazal MCT modnika, ki je bil ne le po Patnaikovem, pač pa tudi po Kiupelovem sistemu ocenjen kot nizke stopnje malignosti. Tudi Stefanello in sod. (2015) ugotavlja, da zgolj histološka stopnja malignosti ni dovolj za natančno napovedovanje poteka bolezni, pač pa nanj vpliva tudi klinični stadij bolezni. Ena od možnih pojasnil bi lahko bilo to, da so tumorji nizke stopnje malignosti, pri katerih je prišlo do lokalne ponovitve bolezni, imeli višji proliferativni indeks, ki naj bi bil eden od dejavnikov za napoved lokalne ponovitve bolezni (Seguin in sod., 2006).

Na podlagi naših podatkov lahko trdimo, da je Kiupelov sistem gradiranja natančneje predvidel prognostično neugodnejše primere MCT in ima boljšo napovedno vrednost v primerjavi s Patnaikovim sistemom. S pomočjo Kiupelovega sistema lahko bistveno natančneje predvidimo, kateri od MCT, ki po Patnaikovem sistemu sodijo v "sivo cono" gradusa II, se bo obnašal biološko bolj agresivno in kateri od tumorjev dejansko sodijo v nižjo stopnjo malignosti.

5.2 IZRAŽANJE ANTIGENA CD117 (c-kit) IN KORELACIJA S KLINIČNIMI ZNAČILNOSTMI

Po podatkih nekaterih avtorjev (Kiupel in sod., 2004; Preziosi in sod., 2004a; Horta in sod., 2018) je vzorec KIT-barvanja v MCT, s katerim prikažemo izražanje KIT receptorja, povezan z lokalno ponovitvijo bolezni in časom preživetja. Vzorec KIT-barvanja I, pri katerem se pozitivna rekacija ugotovi na celični membrani, je povezan z redkejšimi lokalnimi ponovitvami, redkejšimi oddaljenimi zasevki in daljšim časom preživetja, medtem ko sta zrnčasta (vzorec KIT-barvanja II) in difuzna citoplazemska reakcija (vzorec KIT-barvanja III) povezana s pogostejšimi lokalnimi ponovitvami, pogostejšimi oddaljenimi zasevki in krajšim časom preživetja (Kiupel in sod., 2004). Večina MCT v naši raziskavi je izražala vzorec KIT-barvanja I. Rezultati se nekoliko razlikujejo od raziskave Kiupela in sod. (2004), pri kateri je bilo ugotovljeno prevladovanje vzorcev KIT-barvanja I in II (43 oz. 44 %). Razlog za to je najverjetneje v različnih deležih MCT posameznih histoloških gradusov, ki so bili vključeni v raziskavo: 30,5 % MCT gradusa I, 45,8 % MCT gradusa II, 23,7 % MCT gradusa III v naši raziskavi v primerjavi s 17 % MCT gradusa I, 72 % MCT gradusa II in 11 % MCT gradusa III v raziskavi Kiupela in sod. Po pričakovanju je večina MCT gradusa I/nizke stopnje malignosti v naši raziskavi izražala vzorec KIT-barvanja I in noben od MCT gradusa III/visoke stopnje malignosti ni izražal tega vzorca.

Zanimivo pa je izrazito prevladovanje vzorca KIT-barvanja I pri MCT histološkega gradusa II, kar je najverjetneje povezano s tem, da je bila večina teh MCT dejansko nizke stopnje malignosti in s tem še dodatno potrjuje naše ugotovitve o benignem biološkem obnašanju večine tumorjev gradusa II. Ti rezultati niso povsem v skladu z rezultati nekaterih predhodnih raziskav, namreč Gil da Costa in sod. (2007) poročajo o enakomerni razporeditvi membranskega in citoplazemskega vzorca KIT-barvanja pri MCT histološkega gradusa II, pri čemer je membranski vzorec ustrezal vzorcu KIT I, citoplazemski pa vzorcema KIT II in KIT III.

Podatki o korelaciji razporeditve vzorca KIT-barvanja s histološko stopnjo malignosti po Kiupelu so v trenutno dostopni literaturi zelo skopi. Če primerjamo razporeditev KIT vzorca v naši raziskavi s histološko stopnjo malignosti določeno po Kiupelu, ugotovimo, da večina MCT nizke histološke stopnje malignosti izraža vzorec KIT I, večina MCT visoke histološke stopnje malignosti pa vzorec KIT III. Medtem ko noben MCT visoke histološke stopnje malignosti ni

izražal vzorca KIT I, je en MCT nizke histološke stopnje malignosti izražal vzorec KIT III. Pes je v tem primeru preživel 24 mesecev brez lokalne ponovitve bolezni ali zasevkov.

Podobno kot histološki gradus je vzorec KIT-barvanja III v naši raziskavi izrazito povezan z umrljivostjo zaradi MCT. Zanimivo je, da je bilo kar 63,6 % poginov zaradi MCT v skupini živali z MCT z vzorcem KIT III, kar je bistveno več kot poročajo drugi avtorji (npr. 38,5 % Kiupel in sod. (2004)). Podatki glede pogina pacientov z vzorcema KIT I in II pa so primerljivi z rezultati drugih avtorjev. Podobno kot Kiupel in sod. (2004) v naši raziskavi ugotavljamo tudi večjo verjetnost zasevanja MCT s KIT vzorci II in III, vendar je pogostost zasevanja pri naših pacientih nižja (18,1 % v primerjavi z 32,1). Eden od razlogov za to je verjetno v višji splošni stopnji zasevanja MCT v raziskavi Kiupela in sod. (2004) (24,0 %), v primerjavi z našo raziskavo (8,5 %). Omenjena raziskava kot vključitveni kriterij za MCT namreč ne navaja popolnosti kirurške eksicizije, kar je najverjetneje vplivalo na večjo pogostost zasevanja.

Povezave med vzorcem KIT in lokalno ponovitvijo bolezni nismo uspeli dokazati, kar se delno sklada z ugotovitvijo raziskave Coste Casagrande in sod. (2015), ki niso ugotovili povezave med vzorcem KIT in ponovitvijo bolezni oz. poginom zaradi MCT. Vendar pa omenjena raziskava tudi ni ugotovila povezave med vzorcem KIT in histološkim gradusom MCT. V raziskavi smo imeli tudi en primer MCT na modniku s histološkim gradusom II/nizke stopnje malignosti in vzorcem KIT-barvanja I, pri katerem je prišlo do zasevanja v pljuča in pogina zaradi MCT, kar dokazuje, da tudi vzorec KIT-barvanja I ne izključuje primerov s slabšo prognozo, kar nakazuje na potrebo po uporabi še drugih napovednih dejavnikov za natančnejše napovedovanje poteka bolezni.

Na podlagi naših podatkov lahko zaključimo, da je vzorec KIT-barvanja uporaben napovedni dejavnik za čas preživetja psov z MCT in korelira s histološko stopnjo malignosti MCT.

5.3 IZRAŽANJE ANTIGENOV PD-1 IN PD-L1 IN KORELACIJA S KLINIČNIMI ZNAČILNOSTMI

Izražanje PD-L1 je bilo predhodno že dokazano na posameznih primerih številnih vrst tumorjev psov (Maekawa in sod., 2014; Maekawa in sod., 2016; Shosu in sod., 2016), vendar pa večja raziskava na eni vrsti tumorja doslej še ni bila opravljena. Maekawa in sod. (2016) so med drugim dokazali izražanje PD-L1 v MCT, vendar so v raziskavo vključili le 5 MCT

histološkega gradusa III, medtem ko Shosu in sod. (2016) histološkega gradusa 13 MCT, vključenih v svojo raziskavo, niso določili.

Podatki o izražanju antiga PD-1 pri MCT psov so v trenutno dostopni literaturi precej skopi; medtem ko Maekawa in sod. (2014, 2016) izražanja antiga PD-1 v tumorskih celicah MCT niso preiskovali, so Shosu in sod. (2016) dokazali izražanje PD-1 v 50 % (2/4) MCT.

Po naših podatkih je naša raziskava prva, ki opisuje izražanje antiga PD-1 in PD-L1 na večjem številu pasjih MCT in njuno izražanje primerja s histološkim gradusom ter kliničnim potekom bolezni.

Izražanje antiga PD-1 smo ugotovili v 54,2 % preiskanih vzorcev MCT, kar je primerljivo z ugotovitvami Shosa in sod. (2016), pri čemer pa je treba poudariti, da je bil naš vzorec tumorjev bistveno večji (59 preiskanih vzorcev v naši raziskavi v primerjavi s 4 tumorji v raziskavi Shosu in sod.). Pomembna razlika je tudi, da so Shosu in sod. (2016) izražanje PD-1 v MCT dokazali z metodo pretočne citometrije, ki je s stališča morebitne kasnejše uporabe v rutinski diagnostiki tehnično bolj zapletena, težje dostopna in dražja, čeprav natančnejša, medtem ko smo v naši raziskavi uporabili imunohistokemično barvanje.

Shosu in sod. (2016) poročanje o 84,6 % (11/13) izražanju PD-L1, Mekawa in sod. (2016) pa so izražanje ugotovili v 3/5 (60 %) MCT histološkega gradusa III, medtem, ko smo v naši raziskavi izražanje PD-L1 ugotovili le v 35,7 % MCT različnih gradusov. Dokaj velike razlike v rezultatih bi lahko bile deloma posledica razlik v zastopanosti posameznih histoloških gradusov MCT. V naši raziskavi smo namreč ugotovili pogostejše izražanje antiga PD-L1 pri MCT histoloških gradusov II in III. Mekawa in sod. (2016) so vključili le MCT gradusa III, medtem ko Shosu in sod. (2016) v svojih rezultatih sploh niso navedli histoloških gradusov 13 MCT, vključenih v svojo raziskavo.

Drugi možni vzroki za razlike so lahko tudi uporabljeni metoda (pretočna citometrija v primerjavi z imunohistokemično metodo) ali uporaba različnih primarnih protiteles za imunohistokemično označevanje. Mekawa in sod. (2016) so v svoji raziskavi namreč uporabili primarno protitelo lastne izdelave, ki je usmerjeno proti pasjemu PD-L1, medtem ko smo v naši raziskavi uporabili poliklonsko protitelo usmerjeno proti človeškemu PD-L1, ker primarno protitelo proti pasjemu PD-L1 trenutno še ni komercialno dostopno.

Na osnovi rezultatov naše raziskave lahko potrdimo, da lahko pasji kožni MCT izražajo tako PD-1, kot PD-L1 ali kombinacijo obeh antigenov. Dokaz izražanja PD-1 in PD-L1 v pasjih MCT bi v prihodnosti lahko predstavljal dodaten kriterij za izbor načina zdravljenja.

V humani onkologiji namreč že obstajajo imunoterapevtska zdravila (nivolumab, pembrolizumab), usmerjena proti osi PD-1/PD-L1, ki predstavljajo enega od pristopov k zdravljenju nekaterih napredovalih oblik malignih obolenj, kot so nedrobnocelični rak pljuč, karcinom ledvičnih celic in melanom (Brahmer in sod., 2012).

Zdravil, usmerjenih proti osi PD-1/PD-L1, v veterinarski medicini trenutno še ni na voljo, vendar bi v prihodnosti lahko predstavljala eno od terapevtskih možnosti tudi za pasje MCT. Imunoterapija, usmerjena proti osi PD-1/PD-L1, bi bila zlasti uporabna za neresektabilne, biološko agresivne pasje MCT ali MCT, ki so na lokacijah, kjer je kirurška odstranitev z dovolj širokim varnostnim robom težka, in ki še vedno ostajajo velik terapevtski izziv. Maekawa in sod. (2017) poročajo o pilotnem poskusu zdravljenja sedmih psov z oralnim malignim melanomom in dveh psov z nediferenciranim sarkomom z monoklonalnim protitelesom proti PD-L1. Očiten antitumorski učinek zdravila so zabeležili pri enem primeru vsakega tumorja, medtem ko neželenih učinkov ni bilo.

V našem primeru bi bilo kar 10 % pacientov primernih kandidatov za tovrstno zdravljenje, če upoševamo kriterij, da tumor izraža PD-1 in/ali PD-L1 in je istočasno na anatomske prognostično neugodni lokaciji (mukokutani prehodi, modnik) oziroma je na lokaciji, kjer je ustrezna resekcija povezana z zelo invazivnim posegom (npr. amputacija okončin, velike rekonstrukcije).

Raziskave, ki bi ocenila napovedno vrednost izražanja PD-1 in PD-L1 v veterinarski medicini, po naših podatkih trenutno ni. V humani medicini številni avtorji izražanje PD-1 in PD-L1 v tumorjih opisujejo kot negativni napovedni dejavnik (Thompson in sod., 2006; Nomi in sod., 2007; Karim in sod., 2009, Maruse in sod., 2018). Smrtnost zaradi MCT je bila v naši raziskavi statistično značilno pogosteje pri psih z MCT, ki niso izražali antigena PD-1. Do smrti zaradi MCT je prišlo pri 25 % psov z MCT, ki niso izražali PD-1, in 22,2 % psov z MCT, ki niso izražali PD-L1, zato v nasprotju s pričakovanji ugotavljamo, da izražanje antigenov PD-1 in PD-L1 pomeni boljšo prognozo pri psih z MCT. Trenutno izražanje PD-L1 v tumorskih celicah razumemo kot eno od poti pobega imunskemu odzivu, saj privablja imuno-inhibitorne limfocite, ki izražajo PD-1 (Darb-Esfahani in sod., 2015). Vendar številni avtorji podobno ugotavljajo ugodnejšo prognozo pri različnih tumorjih ljudi, ki izražajo PD-L1 (seroznemu karcinomu jajčnika, melanomu, nekaterih oblikah nedrobnoceličnega raka pljuč) (Darb-Esfahani in sod., 2015; Kluger in sod., 2015; Schmidt in sod., 2015), kar morda nakazuje na različno vlogo PD-1/PD-L1 v različnih tumorjih. Darb-Esfahanijeva in sod. (2015)

predpostavljojo, da je ugodnejša prognoza pri tumorjih, ki izražajo PD-L1, lahko povezana z aktivnejšim imunskim odgovorom v teh tumorjih. Povezava med izražanjem PD-L1 in večjo gostoto TIL, ki jo v svoji raziskavi opisujejo Klugerjeva in sod. (2015), to hipotezo podpira. PD-L1 sicer velja za imunosupresivno molekulo, vendar pa njeno izražanje ne pomeni nujno imunskega pobega tumorja, temveč je lahko tudi znak potekajočega proti-tumorskega imunskega odgovora, ki vključuje sintezo interferona- γ in drugih vnetnih dejavnikov (Taube in sod., 2012). Izražanje PD-L1 namreč stimulirajo limfociti T z izločanjem interferona- γ , zato imajo pacienti z visoko gostoto TIL v tumorjih, ki izražajo PD-L1, verjetno učinkovitejši imunski odziv oz. nadzor (Dong in sod., 2002).

Darb-Esfahanijeva in sod. (2015) opisujejo tudi vpliv kombinacije izražanja PD-1 in PD-L1 na preživetje patientk s seroznim karcinomom jajčnikov, pri čemer je bilo preživetje najdaljše pri dvojno-pozitivnih tumorjih. Podobnega mi nismo uspeli dokazati, smo pa v naši raziskavi ugotovili, da je bilo kar 6 tumorjev, ki so povzročili smrt psa, dvojno-negativnih. Med njimi je bil tudi edini tumor, ki je bil ocenjen kot gradus II/nizke stopnje malignosti in je povzročil smrt psa. Izražanje PD-1/PD-L1 bi tako morda lahko predstavljal dodatni napovedni dejavnik za napoved poteka bolezni pri psih, podobno kot pri številnih tumorjih ljudi. Za potrditev teze je potrebna raziskava na večjem vzorcu MCT zlasti nizke stopnje malignosti.

6 SKLEPI

1. Preživetje psov s kožnimi MCT je povezano s histološko stopnjo malignosti, pri čemer ima Kiupelov dvostopenjski sistem večjo napovedno vrednost kot Patnaikov tristopenjski sistem.
2. Vzorec KIT-barvanja je uporaben napovedni dejavnik za čas preživetja psov z kožnimi MCT.
3. Vzorec KIT-barvanja korelira s histološko stopnjo malignosti kožnih MCT, MCT nizke stopnje malignosti prevladujoče izražajo vzorec KIT-barvanja I in MCT visoke stopnje malignosti ne izražajo tovrstnega vzorca.
4. Nekateri kožni MCT psov izražajo PD-1 in PD-L1.
5. Psi z kožnimi MCT, ki ne izražajo PD-1, imajo statistično značilno krajši čas preživetja, kot tisti, katerih MCT izražajo PD-1.
6. Izražanje PD-L1 v kožnih MCT ni statistično povezano s časom preživetja psov.

7 ZAHVALA

Na začetku in kot najpomembnejše bi se rad iskreno zahvalil moji mentorici doc. dr. Darji Pavlin in somentorici doc. dr. Tanji Švara. Brez njunega znanja, svetovanja, usmerjanja in tudi spodbujanja te raziskovalne naloge ne bi bilo. Njuna predvidevanja so se vedno znova izkazala kot utemeljena in resnična, v kar pa sicer že od samega začetku nisem dvomil. Njuna požrtvovalnost se je v ključnih trenutkih izkazala kot taka – ključna.

Posebna zahvala gre asist. Nini Milevoj za statistično obdelavo naših podatkov in izris Kaplen-Meierjevih krivulj, brez česar je lahko še tako dobro zasnovana raziskovalna naloga le malo vredna.

Za svetovanje pri pravilni uporabi statističnih podatkov gre zahvala prof. dr. Alenki Nemec Sveti.

Za dokončanje raziskovanja so bile potrebne dolge ure laboratorijskega dela in s tem tudi uporaba vse laboratorijske opreme in prostorov Inštituta za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete v Ljubljani. Da mi je bilo to dovoljeno in omogočeno, se prav lepo zahvaljujem predstojniku inštituta doc. dr. Mitji Gombaču.

Ker je verjetno pri vsakem raziskovalnem delu včasih težko in lahko spodbuda še kako veliko pomeni, se za le-to iskreno zahvaljujem asist. Tamari Dolenšek.

Ker se hudič skriva v malenkostih, se za zaključno urejanje naloge in za pomoč pri odpravljenju vseh naželenih »malenkosti«, ki to niso, lepo zahvaljujem Kristini Tekavec.

Za pomoč pri zbiranju podatkov se zahvaljujem Veterinarski bolnici Ptuj, Šaleski Veterini, Veterinarski postaji Slovenske Konjice, Veterinarskemu centru Mateja Plevnik, Veterinarskemu Domu Domžale, Veterinarski postaji Postojna, Prvi-K, kliniki za male živali, Veterinarskemu centru Miklavžin, Veterinarski ambulanti Koper, Veterini Gorica, Veterinarstvu Vidic, Veterinariji Murska Sobota in Veterinarski kliniki Lesce.

Za pomoč pri včasih mukotrpnom iskanju kartotek na Kliniki za male živali Veterinarske fakultete v Ljubljani se zahvaljujem Katarini Ramljak.

Brez literarnih podatkov ne gre. Za pomoč pri urejanju le-teh gre zahvala mag. Giti Greco-Smole.

Izvedba raziskovalne naloge je potekala v okviru programskih skupin P4-0053 in P4-0092, zato se zahvaljujem njunima vodnjema, izr. prof. dr. Milki Vrecl Fazarinc in znan. svet. dr. Matjažu Ocepku.

Na koncu, vendar pa poleg mojih mentoric najpomembnejše, bi se rad iz srca zahvalil Juriju Omahnu in Benjaminu Cerku za nesebično in neprecenljivo pomoč pri pripravi histoloških rezin, za strokovno pomoč pri laboratorijskemu delu, za pomoč pri pripravi kemijskih reagentov in za pomoč pri prebijanju skozi labirint skladischa histoloških preparatov. Brez njiju bi bil izgubljen.

8 LITERATURA

1. Abadie JJ, Amardeilh MA, 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: 1629–34.
2. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 2009; 114: 1537–44.
3. Ayl RD, Couto CG, Hammer AS, et al. Correlation of DNA ploidy to tumor histologic grade, clinical variables, and survival in dogs with mast cell tumors. *Vet Pathol* 1992; 29: 386–90.
4. Bellmunt J, Mullane SA, Werner L, et al. Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells and overall survival in patients with urothelial carcinoma. *Ann Oncol* 2015; 26: 812–7.
5. Blackwood L, Murphy S, Buracco P, et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Vet Comp Oncol* 2012; 10: e1– e29.
6. Bookbinder PF, Butt MT, Harvey HJ. Determination of the number of mast cells in lymph node, bone marrow, and buffy coat cytologic specimens from dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 200: 1648–50.
7. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 2455–65.
8. Cahalane AK, Payne S, Barber LG, et al. Prognostic factors for survival of dogs with inguinal and perineal mast cell tumors treated surgically with or without adjunctive treatment: 68 cases (1994-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2004; 225: 401–8.
9. Camus MS, Priest HL, Koehler JW, et al. Cytologic criteria for mast cell tumor grading in dogs with evaluation of clinical outcome. *Vet Pathol* 2016; 53: 1117–23.
10. Case A, Burgess K. Safety and efficacy of intralesional triamcinolone administration for treatment of mast cell tumors in dogs: 23 cases (2005-2011). *J Am Vet Med Assoc* 2018; 252: 84–91.
11. Cemazar M, Ambrozic Avgustin J, Pavlin D, et al. Efficacy and safety of electrochemotherapy combined with peritumoral IL-12 gene electrotransfer of canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2017; 15: 641–54.
12. Cemazar M, Tamzali Y, Sersa G, et al. Electrochemotherapy in veterinary oncology. *J*

- Vet Intern Med 2008; 22: 826–31.
13. Chaffin K, Thrall DE. Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis. *Vet Radiol Ultrasound* 2002; 43: 392–5.
 14. Costa Casagrande TA, de Oliveira Barros LM, Fukumasu H, et al. The value of molecular expression of KIT and KIT ligand analysed using real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry as a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 2015; 13: 1–10.
 15. Davies DR, Wyatt KM, Jardine JE, Robertson ID, Irwin PJ. Vinblastine and prednisolone as adjunctive therapy for canine cutaneous mast cell tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40: 124–30.
 16. Dobson J, Cohen S, Gould S. Treatment of canine mast cell tumours with prednisolone and radiotherapy. *Vet Comp Oncol* 2004; 2: 132–41.
 17. Ehrhart N, Withrow SJ, LaRue SM. Tumor biopsy principles and techniques. In: Bojrab MJ, Waldron DJ, Toombs JP, eds. *Current techniques in small animal surgery*. 5th ed. Jackson: Teton NewMedia, 2014: 47–54.
 18. Elston LB, Sueiro FA, Cavalcanti JN, Metze K. The importance of the mitotic index as a prognostic factor for survival of canine cutaneous mast cell tumors: a validation study. *Vet Pathol* 2009; 46: 362–4.
 19. Darb-Esfahani S, Kunze CA, Kulbe H, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7: 1486–99.
 20. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8: 793–800.
 21. Frimberger AE, Moore AS, LaRue SM, Gliatto JM, Bengtson AE. Radiotherapy of incompletely resected, moderately differentiated mast cell tumors in the dog: 37 cases (1989–1993). *J Am Anim Hosp Assoc* 1997; 33: 320–4.
 22. Fulcher RP, Ludwig LL, Bergman PJ, Newman SJ, Simpson AM, Patnaik AK. Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2006; 228: 210–5.
 23. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. *Skin Diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 2005: 853–58.

24. Hahn KA, Ogilvie G, Rusk T, et al. Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 1301–9.
25. Horta RS, Lavalle GE, Monteiro LN, Souza MCC, Cassali GD, Araújo RB. Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Vet Pathol* 2018; 55: 212–23.
26. Howard EB, Sawa TR, Nielsen SW, Kenyon AJ. Mastocytoma and gastroduodenal ulceration. Gastric and duodenal ulcers in dogs with mastocytoma. *Pathol Vet* 1969; 6: 146–58.
27. Intlekofer AM, Thompson CB. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2013; 94: 25–39.
28. Jin HT, Ahmed R, Okazaki T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011; 350: 17–37.
29. Karim R, Jordanova ES, Piersma SJ, Kenter GG, Chen L, Boer JM, et al. Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+ T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 6341–7.
30. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 677–704.
31. 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.
32. Kiupel M, Webster JD, Miller RA, Kaneene JB. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2005; 52: 280–6.
33. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol* 2011; 48: 147–55.
34. Kiupel M. Mast cell tumors. In: Meuten DJ, ed. *Tumors in domestic animals*. 5th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2017: 176–95.
35. Kluger HM, Zito CR, Barr ML, et al. Characterization of PD-L1 expression and associated T-cell infiltrates in metastatic melanoma samples from variable anatomic sites. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 3052–60.

36. Krick EL, Billings AP, Shofer FS, Watanabe S, Sorenmo KU. Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival. *Vet Comp Oncol* 2009; 7: 130–8.
37. Kodre V, Cemazar M, Pecar J, Sersa G, Car A, Tozon N. Electrochemotherapy compared to surgery for treatment of canine mast cell tumours. *In Vivo* 2009; 23: 55–62.
38. LaRue RM, Gordon IK. Radiation therapy. In: Withrow SJ, Vail DM, eds. *Withrow & MacEwen's Small animal clinical oncology*. 5th ed. Missouri: Elsevier Inc., 2013: 180–97.
39. London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, et al. 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: 3856–65.
40. London CA, Thamm DH. Mast cell tumors. In: Withrow SJ, Vail DM, eds. *Withrow & MacEwen's Small animal clinical oncology*. 5th ed. Missouri: Elsevier Inc., 2013: 335–55.
41. Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, et al. Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- γ production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. *PLoS One* 2014; 9: e98415.
42. Maekawa N, Konnai S, Okagawa T, et al. Immunohistochemical analysis of PD-L1 expression in canine malignant cancers and PD-1 expression on lymphocytes in canine oral melanoma. *PLoS One* 2016; 11: e0157176.
43. Maekawa N, Konnai S, Takagi S, et al. A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma. *Sci Rep* 2017; 7: 8951.
44. Maruse Y, Kawano S, Jinno T, et al. Significant association of increased PD-L1 and PD-1 expression with nodal metastasis and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018; 47: 836–845.
45. Mayer MN. Radiation therapy for canine mast cell tumors. *Can Vet J* 2006; 47: 263–5
46. McCaw DL, Miller MA, Ogilvie GK, et al. Response of canine mast cell tumors to treatment with oral prednisone. *J Vet Intern Med* 1994; 8: 406–8.

47. McDermott DF, Atkins MB. PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Med* 2013; 2: 662–73.
48. Misdorp W. Mast cells and canine mast cell tumours. A review. *Vet Q* 2004; 26: 156–69.
49. Muenst S, Soysal SD, Tzankov A, Hoeller S. The PD-1/PD-L1 pathway: biological background and clinical relevance of an emerging treatment target in immunotherapy. *Expert Opin Ther Targets* 2015; 19: 201–11.
50. Mullins MN, Dernell WS, Withrow SJ, Ehrhart EJ, Thamm DH, Lana SE. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). *J Am Vet Med Assoc* 2006; 228: 91–5.
51. Murphy S, Sparkes AH, Blunden AS, Brearley MJ, Smith KC. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. *Vet Rec* 2006; 158: 287–91.
52. Murphy S, Sparkes AH, Smith KC, Blunden AS, Brearley MJ. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. *Vet Rec* 2004; 154: 743–6.
53. Nomi T, Sho M, Akahori T, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2151–7.
54. Northrup NC, Howerth EW, Harmon BG, et al. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 561–4.
55. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 2015; 14: 847–56.
56. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 1984; 21: 469–74.
57. Pavlin D, Cemazar M, Cor A, Sersa G, Pogacnik A, Tozon N. Electrogene therapy with interleukin-12 in canine mast cell tumors. *Radiol Oncol* 2011; 45: 31–9.
58. Poirier VJ, Adams WM, Forrest LJ, Green EM, Dubielzig RR, Vail DM. Radiation therapy for incompletely excised grade II canine mast cell tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 2006; 42: 430–4.

59. Preziosi R, Morini M, Sarli G. Expression of the KIT protein (CD117) in primary cutaneous mast cell tumors of the dog. *J Vet Diagn Invest* 2004a; 16: 554–61.
60. Preziosi R, Sarli G, Paltrinieri M. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumors of the dog. *J Comp Pathol* 2004b; 130: 143–51.
61. Reguera MJ, Rabanal RM, Puigdemont A, Ferrer L. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *Am J Dermopathol* 2000; 22: 49–54.
62. Rogers KS. Mast cell tumors: dilemmas of diagnosis and treatment. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1996; 26: 87–102.
63. Romansik EM, Reilly CM, Kass PH, Moore PF, London CA. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 2007; 44: 335–41.
64. Romanucci M, Massimini M, Ciccarelli A, Malatesta D, Bongiovanni L, Gasbarre A, Della Salda L. HSP32 and HSP90 immunoexpression, in relation to kit pattern, grading, and mitotic count in canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 2017; 54: 222–5.
65. Sabattini S, Scarpa F, Berlato D, Bettini G. Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3? *Vet Pathol* 2015; 52: 70–3.
66. Salvadori C, Svara T, Rocchigiani G, et al. Effects of electrochemotherapy with cisplatin and peritumoral IL-12 gene electrotransfer on canine mast cell tumors: a histopathologic and immunohistochemical study. *Radiol Oncol* 2017; 51: 286–294.
67. Scase TJ, Edwards D, Miller J, et al. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 151–8.
68. Schmidt LH, Kümmel A, Görlich D, et al. PD-1 and PD-L1 Expression in NSCLC Indicate a Favorable Prognosis in Defined Subgroups. *PLoS One*. 2015; 10: e0136023.
69. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311–22.
70. Shosu K, Sakurai M, Inoue K, et al. Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Canine Cancer. *In Vivo*. 2016; 30: 195–204.
71. Schultheiss PC, Gardiner DW, Rao S, Olea-Popelka F, Tuohy JL. Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2011; 238: 1464–9.
72. Séguin B, Leibman NF, Bregazzi VS, 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: 1120–3.
73. Séguin B, Besancon MF, McCallan JL, et al. Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002). *J Vet Intern Med* 2006; 20: 933–40.
74. Sfiligoi G, Rassnick KM, Scarlett JM, Northrup NC, Gieger TL. Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990-2001). *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226: 1368–74.
75. Simoes JP, Schonning P, Butine M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet Pathol* 1994; 31: 637–47.
76. Simpson AM, Ludwig LL, Newman SJ, Bergman PJ, Hottinger HA, Patnaik AK. Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 236–40.
77. Sledge DG, Webster J, Kiupel M. Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *Vet J* 2016; 215: 43–54.
78. Smith J, Kiupel M, Farrelly J, et al. Recurrence rates and clinical outcome for dogs with grade II mast cell tumours with a low AgNOR count and Ki67 index treated with surgery alone. *Vet Comp Oncol* 2017; 15: 36–45.
79. Spugnini EP, Vincenzi B, Baldi F, Citro G, Baldi A. Adjuvant electrochemotherapy for the treatment of incompletely resected canine mast cell tumors. *Anticancer Res* 2006; 26: 4585–9.
80. Spugnini EP, Vincenzi B, Citro G, Dotsinsky I, Mudrov T, Baldi A. Evaluation of Cisplatin as an electrochemotherapy agent for the treatment of incompletely excised mast cell tumors in dogs. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 407–11.
81. Stanclift RM, Gilson SD. Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232: 53–62.
82. Stefanello D, Buracco P, Sabattini S, et al. Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009 – 2014). *J Am Vet Med Assoc* 2015; 246: 765–9.

83. Takahashi T, Kadosawa T, Nagase M, et al. Inhibitory effects of glucocorticoids on proliferation of canine mast cell tumor. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 995–1001.
84. Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012; 4: 127–37.
85. Thamm DH, Turek MM, 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: 581–7.
86. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 2006; 66: 3381–5.
87. Vascellari M, Giantin M, Capello K, et al. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. *Vet Pathol* 2013; 50: 110–21.
88. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, Miller R, Resau JH, Kiupel M. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 2006; 8: 104–11.
89. 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.
90. Weishaar KM, Thamm DH, Worley DR, Kamstock DA. Correlation of nodal mast cells with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation of node metastasis. *J Comp Pathol* 2014; 151: 329–38.
91. Welle MM, Bley CR, Howard J, Rüfenacht S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Vet Dermatol* 2008; 19: 321–39.
92. 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.

