

DIPLOMAMUNKA

Somogyi Veronika

2024

Állatorvostudományi Egyetem

Kórélettani és Onkológiai Tanszék

**Az AgNOR festési módszer alkalmazása mastocytomás betegek szövettani és
citológiai mintáinak értékelésére**

Application of the AgNOR staining method for the evaluation of histological and
cytological samples in patients with mastocytoma

Készítette: Somogyi Veronika

Témavezető: Dr. Vajdovich Péter, egyetemi docens, tanszékvezető

Kórélettani és Onkológiai Tanszék

2024

1. Absztrakt

A kutyák bőrdaganatainak egyik leggyakoribb típusa a mastocytoma, amely jelentős diagnosztikai és terápiás kihívást rejt magában. A daganatok prognózisának meghatározására jelenleg a szövettani vizsgálat számít az arany standard eljárásnak, de egyre nagyobb szerepet kapnak a proliferációs markerek, például az AgNOR festési módszer. Kutatásunkban 29 mastocytomás kutya szövettani és citológiai mintáit hasonlítottuk össze az AgNOR módszer alkalmazásával. A vizsgálatok során a festett minták képfeldolgozása az ImageJ program segítségével történt. Az eredmények alapján a citológiai és szövettani adatok között szignifikáns korreláció mutatkozott, különösen az AgNOR-számok és -felületek tekintetében. Ezzel igazolni tudtuk, hogy citológiai mintavétellel esetleg helyettesíthetjük a szövettani mintavételezést, így a citológiai minták számítógépes értékelése egy gyorsabb, költséghatékonyabb, de olyan megbízható módszer lehet, mint a szövettani vizsgálat. Eredményeink alapján az AgNOR festési eljárás hasznos kiegészítő eszközzé válhat a mastocytomák klinikai értékelésében.

2. Abstract

One of the most common types of skin tumors in dogs is mastocytoma, which presents significant diagnostic and therapeutic challenges. Histopathological examination is currently considered the gold standard for determining tumor prognosis, but proliferation markers, such as the AgNOR staining method, are gaining increasing importance. In our study, we compared histopathological and cytological samples from 29 dogs diagnosed with mastocytoma using the AgNOR method. The stained samples were analyzed using the ImageJ software for image processing. The results revealed a significant correlation between the cytological and histopathological data, particularly regarding AgNOR counts and areas. This confirms that cytological sampling could potentially replace histopathological sampling, making the computerized analysis of cytological samples a faster, more cost-effective, yet reliable method compared to histopathological examination. Based on our findings, the AgNOR staining technique could become a valuable supplementary tool in the clinical evaluation of mastocytomas.

Tartalomjegyzék

1. Absztrakt	1
2. Abstract	2
3. Rövidítések jegyzéke.....	4
4. Bevezetés.....	5
5. Szakirodalmi áttekintés	6
2.1. A mastocytomák ismertetése	6
2.2 A hízósejtek tulajdonságai.....	9
2.3 A mastocytomák besorolása	9
2.4 Genetika	13
2.5 Tünetek.....	14
2.6 Kezelés	15
2.7 AgNOR.....	16
6. Célkitűzések	18
7. Anyag és módszer	19
8. Eredmények.....	22
9. Megbeszélés	32
10. Összefoglalás	36
11. Irodalomjegyzék	37
12. Köszönetnyilvánítás.....	48

3. Rövidítések jegyzéke

AgNOR: argyrophilic nucleolar organizer region

ANOVA: analysis of variance

ÁHOK: Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ

bFGF: basic Fibroblast Growth Factor

GI/GII/GIII: grade I/grade II/grade III

GNB1: guaninnukleotid-kötő fehérje béta-1 alegység

H1, H2: hisztamin receptorok

HPF: high power fields (nagy látótér, vagyis 400x-os nagyítás)

IL: interleukin

ITD: internal tandem duplication (belső tandem duplikáció)

LTC4: leukotrién C4

MAP-kináz: mitogén-aktivált protein kináz

MCT: mastocytoma

MI: mitotikus index

PGD2: prosztaglandin D2

SC: subcutan

SCF: stem cell factor

TNF-2 α : tumor nekrosis faktor alfa

TP53: p53 tumorsuppresszor fehérje

VEGF: vascular endothelial growth factor

WHO: Egészségügyi Világszervezet

4. Bevezetés

Napjainkban egyre gyakrabban találkozhatunk daganatos megbetegedésekkel mind humán, mind állatorvosi vonalon. Kutyák esetében a három leggyakrabban előforduló daganattípus a lymphoma, a mastocytoma és az emlőtumor. Kutatásunk központi témája ezek közül a mastocytoma, másnéven hízósejtes daganat, amely kutyákban az összes bőrdaganat 16-21%-át teszi ki [1–4].

A daganatos megbetegedések számának növekedése megköveteli a rákgyógyítás és a különböző diagnosztikai módszerek folyamatos fejlődését. Ez a tanulmány a rákgyógyítás kezdeti fázisában, a prognózis megállapításában jelent újdonságot, ugyanis a betegség lefolyásának gyors és pontos meghatározása kulcsfontosságú a hatékony kezelés, és ezáltal a beteg túlélése szempontjából. A jól megválasztott és időben elkezdett kezeléssel nemcsak javíthatjuk a beteg életminőségét, és megelőzhetjük a beteg állapotának romlását, de sok esetben a teljes gyógyulást is elérhetjük.

A daganatok diagnosztizálása citológiai és szövettani vizsgálattal is lehetséges, ezek közül jelenleg a szövettan vizsgálatot tartják a gold standard vizsgálati módszernek a bőr mastocytomák esetében. Ez utóbbi előnye, hogy a daganatsejtek többnyire nagy számban vannak jelen a mintában, és a szövetek struktúrája is látszik. Ugyanakkor a metszetkészítés során egyes sejtek belső struktúrája kevésbé figyelhető meg. A citológiai vizsgálattal vett mintákban nem látszik a szövetek struktúrája, de a sejtek egyenként, bár ellapítva, teljes egészükben vizsgálhatók minden organellumukkal együtt. Mindezekon kívül a szövettani vizsgálat költségesebb és időigényesebb a citológiához képest.

A citológiai vizsgálat során fontos elkülöníteni a daganatos folyamatokat azoktól az esetektől, melyeknek a citológiai képe bár hasonló, de más természetűek (pl. reaktív folyamatok). Ehhez szükség lehet olyan egyéb módszerekre, amelyek ilyen kiegészítő információkkal szolgálnak. Ilyen például az AgNOR-módszer, amely ezen kívül a prognózis meghatározásában is segítséget nyújt.

Kísérletünkben mastocytomás kutyák daganataiból származó citológiai és szövettani mintákat festettük AgNOR-eljárással, majd egy számítógépes elemzőprogrammal vizsgáltuk őket a prognózis meghatározása céljából.

5. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A mastocytomák ismertetése

A hízósejtes daganatok olyan vérképzőszervi eredetű tumorok, amelyeket a daganatos hízósejtek kontrollálatlan proliferációja és/vagy felhalmozódása jellemez a különböző szervrendszerekben [5–7]. Klinikai szempontból ezek a daganatok a jóindulatú, sebészi kimetszéssel gyógyítható elváltozásoktól a potenciálisan halálos, áttétképző betegségekig terjedhetnek [8, 9].

Az Egyesült Királyságban a legmagasabb kockázatot a boxer, labrador retriever, golden retriever és staffordshire bullterrier fajtákban találták [10], míg az Egyesült Államokban a boxer, vizsla, rhodesiai ridgeback, boston terrier, weimari vizsla és kínai shar-pei voltak a leginkább érintett fajták [11]. A MCT előfordulásának eltérései a különböző fajtákban a földrajzi területtel és a kontrollpopuláció kiválasztásával hozhatók összefüggésbe [12]. A weimari vizsla megnövelt kockázatát több tanulmány is vizsgálta, és megerősítette a high grade MCT-k nagyobb arányú előfordulását ebben a fajtában [12, 13]. A földrajzi területtől és a kontrollpopulációtól függetlenül mindegyik vizsgálat kimutatta, hogy a Boxer fajtában nagyobb az MCT-k kialakulásának kockázata [10, 11, 13–15]. A mopszok és boxerek daganata általában jóindulatú, szövettanilag alacsony vagy közepes malignitást mutat, és kedvezőbb prognózissal rendelkezik [1, 16–18]. Ezzel szemben a shar-pei fajtában, különösen a fiatalokban, a MCT-k gyakran rosszul differenciáltak és biológiailag agresszívak [12, 16, 18, 19]. A labrador retriever fajtában gyakrabban találkozunk low grade MCT-val [12]. Ebben a fajtában egy vizsgálat megállapította, hogy az alacsony 25-hidroxi-D3-vitamin (kalcidiol) szint kockázati tényező lehet a MCT-k kialakulásában [20]. A daganatok általában soliterek (magányosan található egy-egy a bőrben), bár a kutyák jelentős részének többszörös (multiplex) daganata is lehet, és egyes fajtákban, például a boxerben és golden retrieverben gyakrabban alakulnak ki többszörös (multiplex) bőr hízósejtes daganatok [21, 22]. Néhány fajtánál viszont alacsonyabb a mastocytomák kialakulásának kockázata, ideértve a német juhászkutyát, a csivavát, az uszkárt, a yorkshire terriert és a cocker spánielt [12, 16].

A nemi predispozíciót illetően az eredmények ellentmondásosak, és eddig nem sikerült megbízható összefüggést találni [23]. A legtöbb tanulmány megerősíti, hogy nincs összefüggés az állat neme és a MCT kialakulása között [13, 19], azonban olyan vizsgálatokat is találunk, melyek szerint a nőstény kutyáknál nagyobb a multiplex bőr MCT kialakulásának kockázata,

mint a kanoknál [24, 25]. A prognózis tekintetében egy kutatásban a hím kutyák túlélési ideje rövidebbnek bizonyult a nőtényekéhez képest [21]. Ehhez hasonlóan, egy korábbi tanulmány kimutatta, hogy a multiagent kemoterápiás protokollal kezelt nőtény kutyák kedvezőbb prognózissal rendelkeztek, mint a kanok [26]. A kutyák MCT-iban találtak ösztrogén- és progeszteronreceptorokat, ami magyarázhatja ezt a különbséget a túlélési időben a nemek között [26, 27]. A nemi hormonok szerepe azonban nem teljesen tisztázott, és további vizsgálatokra van szükség ennek megértéséhez [12]. Azt több tanulmány is megállapította, hogy az ivartalanítás növelheti a MCT kialakulásának kockázatát [15, 21, 28].

Az életkort tekintve, hízósejtes daganat leggyakrabban a felnőtt és idősebb állatoknál (átlagéletkor 7,5-9 év) alakul ki [4, 12], de időnként 1 évnél fiatalabb kutyáknál is előfordulhat [6, 19, 29–31]. Az idősebb kutyák esetében gyakrabban alakul ki egyszerre több MCT, ami azzal magyarázható, hogy az életkor növekedésével a kutyák genomikus DNS-ében több mutáció halmozódik fel, így általánosságban nagyobb eséllyel alakul ki náluk daganatos megbetegedés [21]. Logikus feltételezés, hogy ezeknél a kutyáknál egyszerre több hízósejt átalakulása következik be, így a diagnózis időpontjában több MCT jelenik meg [21]. Egy tanulmány szerint az idősebb kutyákban nagyobb a high grade MCT-k kialakulásának kockázata, és alacsony a low grade daganatok esetében, míg a fiatalabb, 4-6 éves kutyákban a low grade MCT-k kialakulásának nagyobb a kockázata [12].

A hízósejtes daganatok biológiai viselkedése rendkívül változó. Klinikailag a kutyák MCT-i különböző méretű és megjelenésű elváltozásokként manifesztálódhatnak [23]. Lehetnek jól körülhatároltak, kiemelkedőek, kemények, lágyak, viszketőek, és erythemás területeket is mutathatnak, subcutan szöveti invázióval, és az esetek akár 30%-ában fekélyesedés is előfordulhat [23]. Néhány esetben szabálytalan, kiemelkedő, lágy tapintású elváltozások is megjelenhetnek, erythema és fekély nélkül, amelyek makroszkóposan bőrlipómáknak tűnhetnek [23]. Az érintett szerv(ek)től függően a kutyák MCT-ja cutan hízósejtes daganatokra (cMCT), subcutan hízósejtes daganatokra (scMCT), nyálkahártya-hízósejtes daganatokra (mMCT), extracutan/extramucosalis hízósejtes daganatokra (eMCT), és hízósejtes leukémiára (MCL) osztható [32]. A bőr MCT-kat cutan és subcutan hízósejtes daganatokra osztják, amelyeket a dermisben vagy a subcutisban való elhelyezkedésük határoz meg [32]. A cutan és a subcutan daganatok makroszkóposan hasonlóak, és csak szövettani vizsgálattal különíthetők el [23]. A subcutan MCT-k általában kevésbé agresszívak [23, 33]. A nyálkahártyát érintő hízósejtes daganatok ritkák, és leggyakrabban a szájüregben keletkeznek, amiket a bélrendszer más helyein kialakult daganatok követnek gyakoriságban [34–39], de subungualis és perianalis

MCT is előfordulhat [32]. Több tanulmány is azt találta, hogy az orális és a periorális MCT-k esetében nagyobb az áttétképződés kockázata (>50%), mint a bőr MCT-k esetében (10% alatt, de grade-tól függően növekvő mértékben) [36, 40, 41]. A mMCT-k agresszívabb biológiai viselkedése miatt gyakori a helyi terjedés [36, 37, 42]. A MCT-hoz kapcsolódó ritka terjedési formák a mastocytæmia (amikor a perifériás vérben hízósejtek vannak jelen) és a hízósejtes leukæmia (amikor a csontvelőben hízósejtek kontrollálatlan szaporodása zajlik), amelyek leginkább előrehaladott MCT esetén fordulhatnak elő [43, 44]. Ritkán extracutan/extramucosalis MCT-k (eMCT) is kialakulhatnak [34, 45, 46]. Ezek az MCT-k bármely vaszkularizált szervben, például a nyirokcsomókban, a lépben, a májban vagy a méhben is előfordulhatnak [32]. Nagyon ritka esetekben a csontvelő és a vér is érintett lehet, ami a hízósejtes leukæmia klinikai képéhez vezet [47, 48]. Mind az eMCT-k, mind a hízósejtes leukæmia (MCL) rendkívül ritka daganatok, és a bőr nem vagy csak a mucocutan átmeneteknél érintett [32]. A biológiai viselkedésre a klinikai stádiumbesorolás és a szövettani osztályozás alapján lehet következtetni. [8] Ez alapján a jól differenciált MCT-k enyhébb viselkedést mutatnak, míg a kevésbé differenciált daganatok agresszívabbak [23, 29]. A MCT-k áttétképző képessége a szövettani osztályozástól függ, jól differenciált hízósejtes daganatok esetén kevesebb mint 10%-ban, közepesen differenciált daganatoknál 5-22%-ban, míg rosszul differenciált esetekben 55-95%-ban fordulhat elő áttét [23]. Metasztázis leginkább a regionális nyirokcsomókban jelenik meg, majd később a lépben, a májban és más szervekben is kialakulhat [4, 23]. Azok a betegek, akiknek a hízósejtes daganaton kívül regionális nyirokcsomó érintettségük is van, általában rosszabb prognózissal rendelkeznek [1, 22, 25, 49]. Elhelyezkedésüket tekintve a kutyák MCT-i körülbelül 50%-ban a törzs, a perineum és a lágyéki-genitális régiókban alakulnak ki, 40%-ban a végtagokon, 10%-ban pedig a fej és nyak területén [4]. Az inguinalis, scrotalis és perianalis területeken, valamint a mucocutan átmeneteknél kialakult daganatok rosszabb prognózissal járnak [6, 9, 31, 50, 51]. Ez annak is köszönhető, hogy ezek a területek ki vannak téve a fokozott mechanikai irritációnak, ami hozzájárulhat a betegség súlyosabb lefolyásához [12, 52]. A törzsön kialakult MCT-k jellemzően low grade daganatok, a herezacskón és az orrháton találhatók pedig általában high grade MCT-k, és hajlamosabbak a korai áttétekre [12, 53]. A végtagokon található daganatok jobb túlélési időt mutattak a törzsön elhelyezkedőkhöz képest, viszont ez a végtagon lévő daganatok korábbi felismerésének is köszönhető [24, 54].

2.2 A hízósejtek tulajdonságai

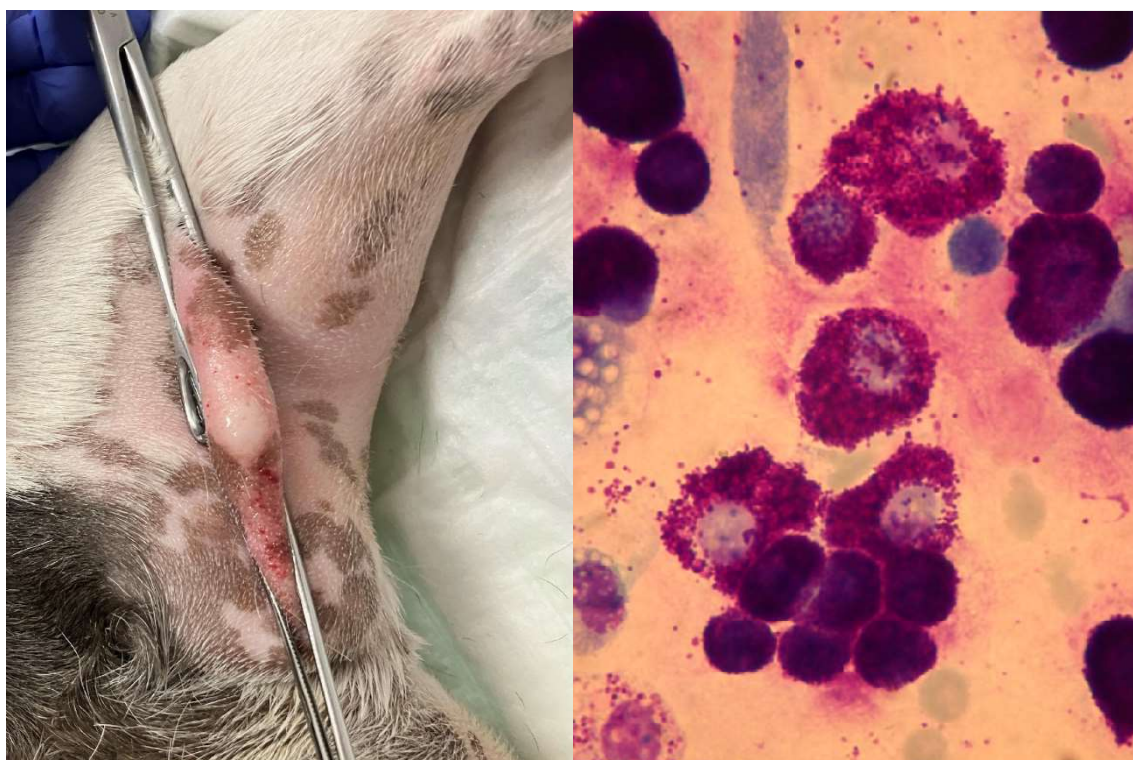
A kutyák hízósejtjei csontvelői eredetű hematopoetikus prekurzorokból, a canine bone marrow derived mastocytákból (cBMMC) származnak, amelyek a csontvelőt elhagyva különböző szövetekbe vándorolnak, és ott érett hízósejttekké differenciálódnak [55, 56]. Ezekben a sejtekben számos citoplazmatikus granulum található, amelyek bioaktív anyagokat tartalmaznak, például heparint, hisztamint, tumor nekrosis faktor-alfa-t (TNF- α) és különböző proteázokat [57]. A sejtek összetételét, tulajdonságait nagyban befolyásolja az a mikrokönyezet, amiben differenciálódtak, de növekedési faktorok, és citokinek is hatnak rájuk [4]. A gyomor-bél traktus hízósejtjei például elsősorban kimázt expresszálnak, míg a bőrben található mastocyták kimázt és triptázt is termelnek [58]. Stimulus hatására a hízósejtek gyorsan termelnek proteázokat (például kimázt és triptázt), citokineket (TNF- α , IL-6), kemokineket, növekedési faktorokat (VEGF, bFGF), valamint lipid mediátorokat (PGD₂, LTC₄), és számos biológiai folyamatban részt vesznek, beleértve a sebgyógyulást, a veleszületett immunválasz kiváltását és a paraziták elleni védekezést [57, 59]. A sejtek differenciálódásához szükséges a stem cell factor (SCF), amely a sejtmembránon lévő KIT-receptorhoz kötődik, és serkenti a sejtek növekedését, osztódását, migrációját, degranulációját, és gátolja az apoptózist [55, 56].

2.3 A mastocytomák besorolása

A kutyáknál előforduló bőr MCT-kat először Hottendorf és Nielsen osztályozta 1967-ben [60], majd ezt továbbfejlesztve Bostock és munkatársai 1973-ban készítettek egy új rendszert [61]. Patnaik és munkatársai 1984-ben állították fel a ma már gyakrabban használt háromfokozatú osztályozási rendszert, amely jól, közepesen és rosszul differenciált MCT-kat különböztetett meg (GI, GII és GIII) [29]. Ez a rendszer különféle szövettani jellemzők alapján kategorizálja a daganatokat, ideértve a sejtsűrűséget, a sejtmorfológiát, a mitotikus indexet (MI), a szöveti érintettség mértékét és a strómális reakciót [29]. A mitotikus index (MI) a daganat osztódási aktivitását jelzi, amit a mitózisok száma alapján határoznak meg nagy nagyítású látómezőnként (HPF) [29]. A szöveti érintettség mértéke azt mutatja, hogy a daganat mennyire invazív és milyen mértékben érinti a környező szöveteket [62], a strómális reakció pedig a daganatot körülvevő kötőszöveti válasz, beleértve a gyulladásos infiltrátumokat és a strómális kollagént [29].

1. táblázat: Patnaik grade szerinti osztályozás

Grade I	Jól differenciált daganatok. A kerek, monomorf, bőséges citoplazmával és intracitoplazmatikus granulumokkal rendelkező hízósejtek kis csoportokban az irhában és az interfollikuláris térben helyezkednek el, érett kollagénrostokkal elválasztva. A sejtmagok kerek, kondenzált kromatinnal. Mitotikus alakok nincsenek jelen, az ödéma és a nekrosis minimális.
Grade II	Közepesen differenciált daganatok. Előfordulhat a bőr felületes és mélyebb rétegében is, és infiltrálhatja a bőralját és az izomszövetet. Mérsékelt vagy erősen sejtdús daganatok, a sejtek pleomorfak, és vékony fibrovaszkuláris vagy vastag kötőszövetes stromával rendelkeznek. Egyes sejtek citoplazmája homályos, másokban nagy, hiperkromatikus granulumok találhatók. A sejtmagok lehetnek kerek vagy bemélyedtek, sejtmagvacskák vannak, a mitotikus sejtek száma több. Ödéma és nekrosis is előfordul.
Grade III	Rosszul differenciált, erősen sejtdús daganatok, amelyek a bőr alatti és mélyebb szöveteket érintik. A sejtek pleomorfak, oválisak vagy orsó alakúak, szorosan egymáshoz rendeződnek. A citoplazma homályos, finom intracitoplazmatikus granulumokkal. Sok a mitotikus alak. A sejtmagok szabálytalanok, egy vagy több magvacskával. Gyakoriak a binukleáris sejtek, de óriássejtek és többmagvú sejtek is láthatók. Ödéma, vérzés és nekrosis gyakori.



1. kép: Grade I mastocytoma



2. kép: Grade II mastocytoma



3. kép: Grade III mastocytoma

A grade I. daganatok rendszerint kedvező prognózissal járnak, és általában teljes sebészi kimetszéssel gyógyíthatók is [8]. Ezzel szemben a grade III daganatok agresszívbabbak, nagyobb az áttétképződésre és a távoli metasztázisra való hajlamuk, és gyakran igényelnek kemoterápiát

a sebészi eltávolítás mellett [8]. A grade II MCT-k túltreprezentáltak az grade I és grade III daganatokhoz képest, és a viselkedésük nehezen megjósolható [63]. Bár a legtöbb grade II MCT gyógyítható sebészi kimetszéssel, de 5-22%-uk metasztatizál [9]. Ezenkívül nagy a megfigyelők közötti eltérés (csak 62,1%-os egyezés) a Patnaik-féle osztályozási kritériumok alkalmazásakor [62].

Ezen korlátok leküzdésére 2011-ben Kiupel és munkatársai egy kétszintű osztályozási rendszert javasoltak, amely low és high grade-ként azonosítja a daganatokat [64]. Az osztályozás kvantitatív citológiai kritériumokon alapul, amelyeket objektív szempontok szerint határoznak meg [62]. High grade daganatként sorolják be azokat az eseteket, amelyekben az alábbi jellemzők közül legalább egy jelen van: legalább 7 mitotikus alak 10 nagy nagyítású látómezőben (HPF), legalább 3 többmagvú sejt 10 HPF-ben, legalább 3 bizarr sejtmag 10 HPF-ben, illetve a kariomegália, amely a sejtek 10%-ában legalább kétszeres eltérést mutat a sejtmagok átmérőjében [62].

2. táblázat: Kiupel kritériumai a high grade daganatokra

	High grade
Mitotikus alakok (db)	legalább 7db/10 HPF
Multinuclearis sejt (db)	legalább 3 db/10 HPF
Rendellenes sejtmag (db)	legalább 3 db/10 HPF
Kariomegália	jelen van

Ha ezek a kritériumok mind hiányoznak, a daganatot low grade kategóriába sorolják [62]. Bár egyetlen osztályozási rendszer sem rendelkezik 100%-os pontossággal a biológiai viselkedés előrejelzésében, ez a kétszintű rendszer magas prognosztikai értékkel bír, és minimális a megfigyelők közötti eltérés (akár 96,8%-os egyezés) [63, 64]. Ugyanakkor a low grade daganatok egy része (15%-a) agresszívabb biológiai viselkedést mutathat, ami esetenként nehézséget okozhat a prognózis pontos meghatározásában [12].

A klinikai stádium meghatározása szintén javasolt a bőr hízósejtes daganatok (MCT-k) prognózisának értékelésére [1]. A klinikai stádiumbeosztás magában foglalja a teljes fizikális vizsgálatot, a teljes vérképet és vérbiokémiát, a regionális nyirokcsomók vékonytű aspirációs citológiáját (még akkor is, ha fiziológias méretűek), a hasi ultrahangvizsgálatot és a mellkasi röntgenfelvételt [4, 29, 64, 65]. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) stádiumrendszere a szervi érintettség és a betegség terjedése alapján 4 stádiumba sorolja a daganatokat [66]. A multiplex tumorokat magasabb klinikai stádiumba osztja, ami rosszabb prognózist jelent,

azonban a több daganat jelenlétének hatása a prognózisra ellentmondásos [4, 66]. Egyes tanulmányok szerint nincs különbség a szoliter és a multiplex bőr MCT kimenetele között [22, 25, 67, 68], míg mások rosszabb prognózist írtak le több tumor esetén [21, 69].

3. táblázat: WHO szerinti stádiumbesorolás

Stádium	
0	Egy daganat, amelyet hiányosan távolítottak el a dermisből, szövettanilag azonosították, regionális nyirokcsomó érintettség nélkül.
	a. Szisztémás tünetek nélkül
	b. Szisztémás tünetekkel
I	Egy daganat, amely a dermisre korlátozódik, regionális nyirokcsomó érintettség nélkül
	a. Szisztémás tünetek nélkül
	b. Szisztémás tünetekkel
II	Egy daganat, amely a dermisre korlátozódik, regionális nyirokcsomó érintettséggel.
	a. Szisztémás tünet nélkül
	b. Szisztémás tünetekkel
III	Több nagy, infiltráló dermális daganat; regionális nyirokcsomó érintettséggel vagy anélkül.
	a. Szisztémás tünetek nélkül
	b. Szisztémás tünetekkel
IV	Daganat távoli áttéttel, beleértve a vér vagy csontvelő érintettségét.

Fontos megemlíteni, hogy a low grade cMCT-k és scMCT-k esetében nem mindig szükséges teljes stádiumbeosztást végezni a sebészi eltávolítás után, mivel ezek jellemzően jóindulatú biológiai viselkedést mutatnak [70–73]. Ugyanakkor a sentinel nyirokcsomók vizsgálata minden esetben ajánlott, mivel ezek az áttétek elsődleges helyei [32].

2.4 Genetika

A KIT-receptor a tirozin-kináz alcsalád III-as típusú receptorai közé tartozó transzmembrán fehérje, amelyet a c-kit proto-onkogén kódol. A receptor szerkezete extracelluláris, transzmembrán és intracelluláris doménre osztható, az utóbbi egy juxtamembrán és egy tirozin-kináz szakaszt tartalmaz. A KIT-receptor különböző sejtek felszínén, például mastocytákon,

melanocytákon és hematopoetikus őssejteken található meg. Ligandja a SCF (stem cell factor), amely a receptor dimerizációját és autofoszforilációját idézi elő, aktiválva ezzel olyan intracelluláris jelátviteli útvonalakat, amelyek a sejtek differenciálódását, proliferációját és hosszú távú túlélését eredményezik [74–77].

A kutyák bőr-MCT-inak 10–45%-ában találtak KIT génmutációkat [78]. A leggyakoribb mutációs típus egy belső tandem duplikáció (ITD), amely általában a 8-as vagy a 11-es exonokban fordul elő, ezt pontmutációk követik a 8-as, 9-es, 11-es és 17-es exonokban [79–86]. Ezek a mutációk képesek aktiválni a KIT-receptort SCF hiányában is [74, 87, 88]. A KIT mutációkat (a 8-as exonban lévők kivételével) összefüggésbe hozták a MCT-k agresszív viselkedésével, rövidebb túlélési idővel, illetve a daganat kiújulásának és az elhullásnak a fokozott kockázatával [53, 78, 80, 81, 89–91].

Ezenkívül a GNB1 (a MCT-k 17,3%-ában), a TP53 (a MCT-k 14,6%-ában), és egyéb más génen kialakult mutációt is kimutattak kutyák bőr MCT-iban, de alacsonyabb előfordulási gyakorisággal, mint a KIT mutációt [90, 92, 93]. A TP53 egy ismert tumorsuppresszor gén, amely bár számos emberi és állati daganatban is mutálódott, viszont a kutyák MCT-iban ezek a mutációk nem bizonyultak megbízható prognosztikai markereknek [90]. A GNB1 egy guanin nukleotid-kötő fehérje alegységét kódolja. Az emberi leukémiában a GNB1 mutációkat kapcsolatba hozták a MAP-kinázhoz és az anti-apoptotikus utakhoz [87]. Kutyákban egy tanulmány azonosította a GNB1 mutációkat bőr- és bőr alatti MCT-kban a pozitív prognózissal összefüggésben [90].

2.5 Tünetek

Az érintett kutyák körülbelül felében figyelhetők meg a daganatképződés mellett a MCT másodlagos klinikai tünetei, amelyek a hízósejt degranulációja, és a bioaktív anyagok felszabadulása miatt alakulnak ki [4, 31]. A degranuláció hatásai a fizikai vizsgálat során észlelhetők, amikor mechanikai tapintás után erythema, ödéma és papulák képződése figyelhető meg az érintett területen [23]. Ezt a jelenséget Darier-jelnek nevezik [4]. Ezenkívül késleltetett sebgyógyulás, véralvadási zavarok, ritkábban pedig hipotenzió és keringési összeomlás is előfordulhat [4, 9, 31].

Emésztőrendszeri szövődmények is megjelenhetnek, elsősorban fekélyekkel, amelyek leggyakrabban a gyomrot, ritkábban a duodenumot érintik. Ezek a eróziók általában multiplexek és felszínesek, bár egyes esetekben súlyosabb fekélyek is előfordulhatnak. Ezek

megjelenése a magas vérhisztaminszintnek tulajdonítható, ami az H₂ receptor stimulálása révén a parietális sejtekben túlzott gyomorsavtermelést és fokozott gyomormotilitást okoz. Ezenkívül a hisztamin károsítja az arteriolák és venulák falát, és fibrinolizint szabadít fel, ami intravaszkuláris trombózist és ischémiás gyomornyálkahártya-nekrózist eredményezhet [23]. A heparin ugyan gátolja a hisztamin hatásait, de alacsony koncentrációban van jelen [9, 31]. Ilyen esetekben hematemézis, anorexia, hematochezia, meléna, anaemia, hasi fájdalom, súlyos esetekben pedig bélperforáció, peritonitis és szepszis is kialakulhat [4, 9, 31]. Egy vizsgálat a MCT-val érintett kutyák 35–83%-ában talált gyomorfekélyt a boncolás során [31].

A sebgyógyulás késlekedése és a sebszétválás gyakran megfigyelhető a MCT sebészi eltávolítása után. Ez a hízósejtek által felszabadított vasoaktív aminok és proteolitikus enzimek hatásával magyarázható, amelyek, ha H₁ és H₂ receptorokhoz kapcsolódnak, a fibroblaszt növekedési faktor gátlásához vezethetnek, ezzel csökkentve a fibropláziát [23, 31]. Ezenkívül helyi vérzés is megfigyelhető a műtéti kimetszés során, valószínűleg a heparin okozta véralvadási zavarok miatt [31]. Ritkán keringési összeomlás is előfordulhat, különösen akkor, ha a daganatos sejtekből nagy mennyiségű hisztamin szabadul fel, főként kiterjedt betegségben szenvedő állatokban [9, 31]. A hypereosinofília jelenlétét a MCT-hoz kapcsolódó paraneoplasztikus szindróma részeként írják le, aminek megjelenése az eozinofil kemotaktikus faktorok felszabadulásával függ össze [23, 40, 48, 94].

2.6 Kezelés

A hízósejtes daganatok (MCT) kezelésében a leggyakoribb módszer a sebészi kimetszés, amely megfelelő kivitelezés esetén akár teljes gyógyulást is eredményezhet grade I-es vagy alacsony malignitású grade II-es tumoroknál, ha nincs nyirokcsomó áttét vagy csontvelői érintettség [95]. Az ilyen betegek gyógyulási aránya 92-100% között mozog [95]. A műtétnekél javasolt legalább 3 cm-es biztonsági zónát alkalmazni, és mélyebb rétegekből kezdeni a kimetszést. Ha a daganat ugyanazon a területen újul ki, nagyobb biztonsági zónát kell hagyni az ismételt beavatkozás során. Ha a teljes kimetszés nem kivitelezhető, a sugárterápia lehet a legjobb alternatíva, különösen a lábvégeken, bár a hízósejtek degranulálódása kockázatot jelenthet [95]. A sebészeti hatékonyságot inkább a daganat grade-je és proliferációs mutatói befolyásolják, mint a kimetszés teljes volta [96].

A neoadjuváns (műtét előtti) prednisolon-terápia csökkentheti a tumor méretét, így növelve a sikeres eltávolítás esélyét [95]. Egy tanulmány kimutatta, hogy mind az 1 mg/ttkg, mind a 2,2 mg/ttkg prednisolon dózis 70%-os sikerrel csökkentette a daganat méretét, és az alacsonyabb

dózis is elegendőnek bizonyult [97].

Kemoterápiát elsősorban akkor alkalmaznak, ha adjuváns (műtét utáni) kezelésre van szükség, a sebészi beavatkozás nem lehetséges, vagy a sugárterápia hatástalan [95]. Egy tanulmányban a vinblastin és prednisolon kombinációjával 12 héten át kezelt grade II-es és III-as daganattal rendelkező kutyák 90%-ának nem volt lokális recidívája 1 éven belül [98], míg egy másik vizsgálatban a betegségmentes idő átlagosan 1305 nap volt [67]. A prednisolon és lomustin kombinációja hatékony alternatívának bizonyult a sugárterápiához képest, az inkomplettan eltávolított, nem metasztatizáló grade II-es daganatok esetében [99].

Az alacsony grade-ű daganatok ritkán metasztatizálnak, így kezelésük alacsonyabb kockázattal jár [4]. A grade III-as vagy rossz prognózisú grade II-es MCT-k terápiája viszont kemoterápiát igényel, például vinblastin vagy paclitaxel alkalmazásával, míg a c-kit mutációknál a tirozin-kináz inhibitorok, például masitinib vagy toceranib-foszfát jelenthetnek hatékony megoldást [95]. A kezeléseket gyomorvédő szerekkel is célszerű kiegészíteni, a gyomorfekély kialakulásának megelőzése érdekében [4, 95].

2.7 AgNOR

A daganat egyik legfontosabb jellemzője a kontrollálatlan sejtprolifерáció, amelynek mértékét több tanulmány is vizsgálta a prognózis meghatározása céljából [100, 101]. Az állatorvoslásban az egyik leggyakrabban vizsgált proliferációs marker az AgNOR [102–104], amelyről kimutatták, hogy a sejtciklus időtartamának indikátora [105]. A proliferáló sejtekben az interfázisú AgNOR fehérjék mennyisége a korai G1 fázistól kezdve fokozatosan nő, az S fázis végére eléri a maximumát, és a késői G2 fázisig állandó szinten marad [106].

Az AgNOR-ok nukleoláris alstruktúrák, amelyek minden sejtmagban megtalálhatók, és a riboszomális RNS transzkripciójában vesznek részt [107, 108]. Citológiai és szövettani vizsgálati módszerrel is kimutathatók, és apró fekete nukleoláris góccokként jelennek meg az ezüst alapú festési módszerrel. Ennek oka, hogy az ezüst festi a diszulfidkötésekben gazdag riboszomális asszociált savas karakterű fehérjéket, amelyekhez a NOR-ok kapcsolódnak [109]. A magonkénti AgNOR-ok száma összefüggést mutat a sejtprolifерáció sebességével (generációs idő) vagy a sejt megduplázódási idejével in vitro [110–112] és a tumornövekedés sebességével in vivo [113, 114].

Crocker és munkatársai kimutatták, hogy az egy sejtmagra jutó AgNOR-ok átlagos száma szoros összefüggést mutat különböző emberi daganatok, például limfómák [115],

emlődaganatok [109] és melanomák [116] szövettani osztályozásával. Más kutatók pedig azt állapították meg, hogy az AgNOR-ok száma jobban megemelkedett a bél adenokarcinómákban a hiperplastikus polipokhoz képest [117]. Kutyák esetében a hízósejtes daganat miatt bekövetkező elhullás leggyakrabban az első műtéti eltávolítást követő 6 hónapon belül történik, a hegyszövetben kialakuló, sebészileg nem eltávolítható helyi kiújulás miatt, vagy nyirokrendszeri áttét következtében [61]. Így az AgNOR-ok prediktív értékelése sokkal hamarabb elvégezhető kutyák esetében, mint hasonló emberi daganatoknál, amelyeknél a nyomunkövetés rendszerint több mint 5 évig tart [107]. Embernél azt találták, hogy az AgNOR-ok száma általában magasabb, a méretük pedig kisebb a high grade malignus daganatokban, mint a low grade-ekben [107]. Kutyák esetében több tanulmány is kimutatta, hogy a magasabb AgNOR számú daganatok nagyobb kiújulási aránnyal és rövidebb túlélési idővel párosultak, mint az alacsonyabb számúak [107, 118]. Ezenkívül az AgNOR-ok átlagos magonkénti száma magasabbnak bizonyult a recidiváló, mint a nem recidiváló MCT-k esetében [107]. Hasonlóképpen, az AgNOR számot prognosztikusnak találták a metasztázis kialakulását illetően a cutan MCT-kban szenvedő kutyáknál [118]. Ezzel szemben subcutan MCT esetében az AgNOR-számok alacsonyabbak voltak, és nem álltak szignifikáns összefüggésben az áttétképződés megnövekedett kockázatával [71]. Az AgNOR-módszer objektivitása nagyban javíthatja az osztályozást, és pontosabban azonosíthatja azokat a kutyákat, akiknél megelőző terápiára van szükség [107]. További előnye a technikának, hogy könnyen alkalmazható citológiai készítményeknél is, amelyek hagyományos festési módszerekkel nehezebben osztályozhatóak [107].

6. Célkitűzések

A tumor gyógyítása során nagyon fontos annak megállapítása, hogy a daganatok milyen malignitási fokkal rendelkeznek, hogy utána sebészeti, kemoterápiás, sugárterápiás vagy immunterápiás módszerrel meg lehessen gyógyítani.

Kutatásunkban arra a problémára kerestük a választ, hogy miképp lehetne a költséges és meglehetősen időigényes szövettani és citológiai minták elemzéseit egy sokkal gyorsabb és kevésbé költséges, grafikai módon történő számítógépes elemzéssel helyettesíteni. Szándékunkban állt találni egy olyan eljárást, amely gyorsan és nagy pontossággal képes diagnosztizálni a daganat malignitási fokát.

Kutatásunk során összehasonlító vizsgálatokat végeztünk a sejtek szaporodóképességét meghatározó módszerrel, amely alkalmazható szövettani és a citológiai minták esetében egyaránt. Ez az AgNOR módszer, vagyis a sejtek nucleolaris organizáló régiójának (NOR) ezüstkolloiddal történő festése. A módszer nem új, a mastocytomáknál is alkalmazták már, de nem ilyen összehasonlító célzattal [107]. Előnye, hogy az ezüst látványosan feketére festi a sejtek magvacskáját, és azon belül a NOR-t, és így számítógépes képfeldolgozással (image analysis) hatékonyan lehet vizsgálni. Ugyanakkor, a mintákat a hagyományosan elfogadott szövettani [29, 64] és citológiai módszerekkel [8] is vizsgáltuk.

7. Anyag és módszer

Kutatásunkban az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ 2020. július 1-je és 2023. június 1-je között mastocytomával diagnosztizált 29 betegét vizsgáltuk. A kutyák adatai, kórlapjai és leletei a klinika betegnyilvántartó rendszeréből (DokiforVets program) származnak.

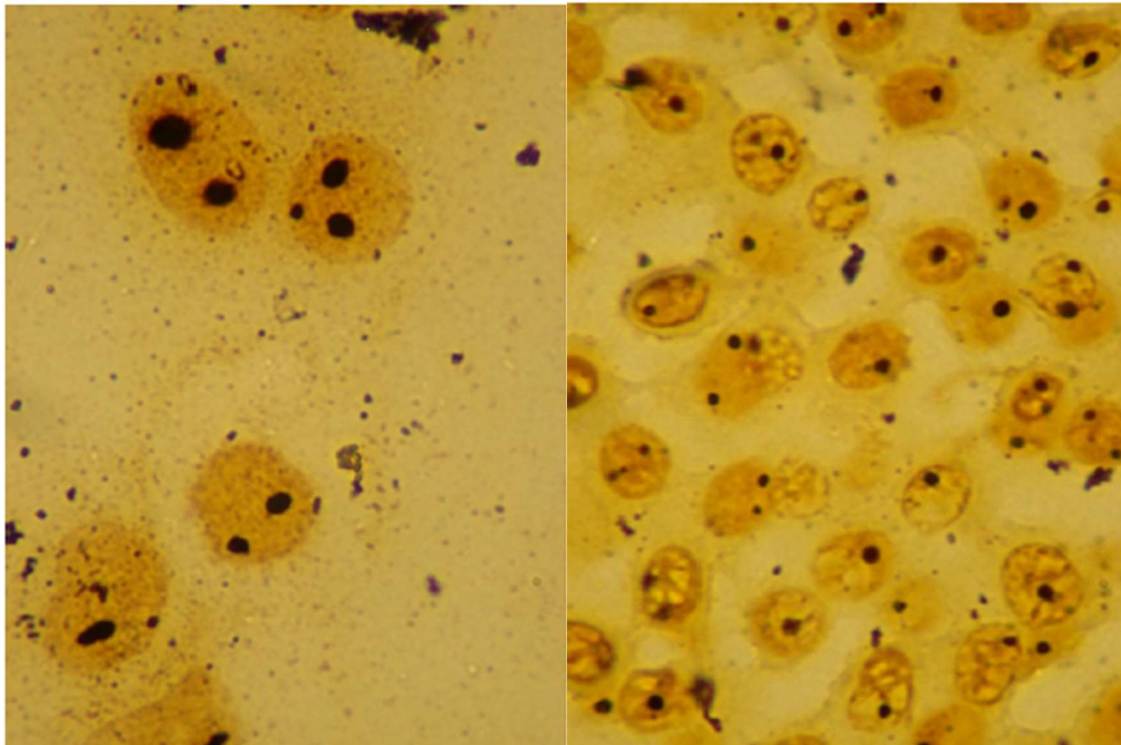
Minden daganatból szövettani és tűaspirációs citológiai mintát vettünk a betegek gazdáinak beleegyezésével. A mintavételek előtt a daganatok pontos helyzetét és méretét is feljegyeztük. A citológiai mintavételt vékonytű aspirációs technikával végeztünk bódítás nélkül. Ehhez először egy steril tűt egy fecskendőre erősítettünk, majd a fertőtlenített felületű duzzanatba szúrtuk, és a vákuum segítségével több irányba bevezettük a tűt, annak kihúzása nélkül. Ezután a vákuumot először visszaengedve húztuk ki a tűt a duzzanatból. Ez azért fontos, mert, ha vákuum alatt húzzuk ki a tűt, akkor hirtelen nagy erővel áramlik be a minta a fecskendőbe, és ez a sejtek károsodását okozhatja. Ezt követően levettük a tűt a fecskendőről, amibe levegőt szívtunk, majd visszahelyeztük a tűre, és a tárgylemezre fújtuk a tű tartalmát. Ezután a mintából kenetet készítettünk, amelyet festettünk a megfelelő festékekkel, majd mikroszkópos vizsgálat keretében értékeltük a daganatokat. Amennyiben a citológiai vizsgálattal igazolódott a hízósejtes daganat diagnózisa, a tumorok sebészi eltávolításra kerültek.

Amikor a daganatok műtéti kimetszése megtörtént, a kimetszett mintából citológiai feldolgozásra tűaspirációs mintát vettünk, majd abból lenyomati készítményt csináltuk, ezt követően a kimetszett szövetdarab további feldolgozásra került. A minta egy részét -80 °C-ra hűtve tárolták további molekuláris biológiai vizsgálatokra, a másik részét pedig 4%-os neutralizált formaldehid-oldatba tettük, amit szövettani feldolgozásra küldtünk. A szövettani vizsgálat során a formalinban történő fixálás után a minták paraffinba történő beágyazása következett, és ezt követte a metszetkészítés, majd a metszetek festése.

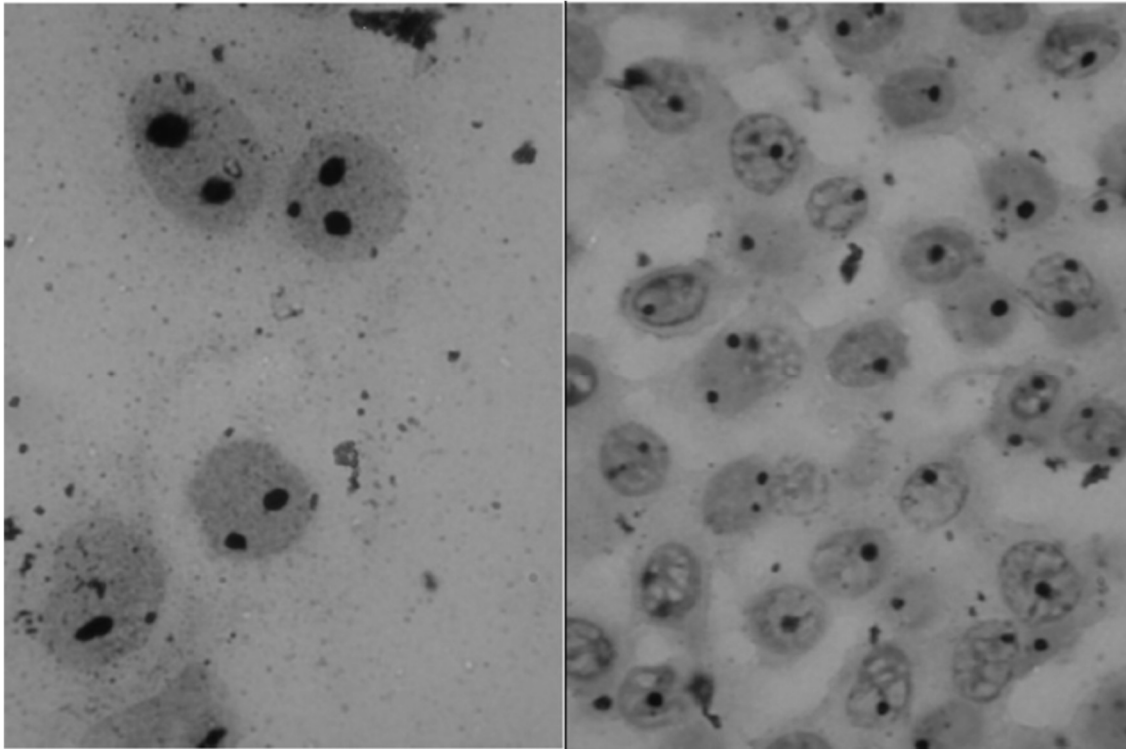
A citológiai és a szövettani mintákból is elvégeztük a grade meghatározást és az AgNOR festési módszert. A kenetek megfestése előtt a mintákat levegőn megszárítottuk, majd 70%-os etanollal fixáltuk. A festékkoldatot két komponensből állítottuk össze. Az egyik alkotóelem egy zselatinoldat, amelyet 0.5 g zselatin (Sigma-Aldrich), 0.5 g 88%-os hangyasav (Sigma-Aldrich) és 25 ml desztillált víz elegyítésével készítettük. A zselatinhoz először a desztillált vizet adtuk, nem a hangyasavat (ellenkező esetben a zselatin nem oldódott fel, hanem nyúlós állagú anyagból álló csomót alkotott a lombikban). A megfelelő oldódás elősegítésére a keveréket tartalmazó lombikot 30 percre 37°C-os vízfürdőbe helyeztük. A zselatinoldatot mindig frissen készítettük. A festékkoldat másik komponense 1 g ezüst-nitrátot (Sigma-Aldrich) és 1 ml

desztillált vizet tartalmazó ezüst-nitrát oldat. Az oldatot közvetlenül festés előtt, a külső fény mérséklése mellett készítettük, mert az fényérzékeny. Törekedtünk az ezüst-nitrát kristályok maximális feloldódására. Ezt követően az oldatot 2:1 arányban elegyítettük a zselatinos keverékkel, majd 1-2 cseppet a kenetekre cseppentettünk. A festés ideje 40 percet tett ki. Ezután a keneteket tökéletesen sötét körülmények közé helyeztük. Miután végeztünk a minták festésével, lefényképeztük őket egy trinokuláris mikroszkóp segítségével. A felvételek alapján hajtottuk végre a számítógépes elemzéseket, amelyek során összevetettünk a magonkénti AgNOR felületet és AgNOR számot, a száz sejt átlagában lévő AgNOR felülettel és számmal. A grafikus és a statisztikai elemzéseket az ImageJ nevű programmal végeztük el. Az értékelés során a szövettani elemzést és a citológiai mintákat is úgy elemeztük, hogy nem tudtuk melyek az összetartozó minták.

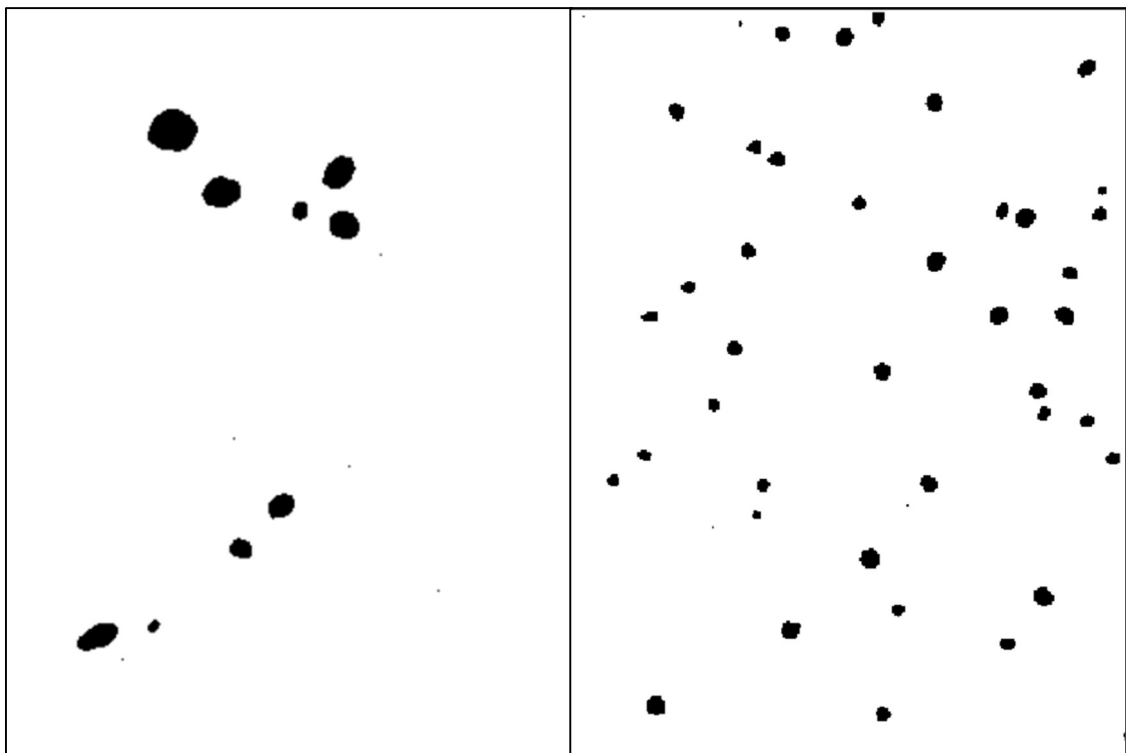
A módszer megbízhatóságának számszerű kifejezésére, ill. a parametrikus vs. nem parametrikus számsorok vizsgálatára statisztikai próbákat (Student féle t-próba, Pearson korrelációs analízis, ANOVA, regressziós analízis, Mann-Whitney U-test és F-próba) alkalmaztunk az alábbi számítógépes programokkal: Microsoft 365 Excel; DATAtab: Online Statistics Calculator (URL: <https://datatab.net>).



4. kép: A bal oldali kép egy citológiai minta, a jobb oldali pedig szövettani.
A fekete foltok jelölik az ezüst-nitráttal megfestett NOR-okat.



5. kép: ImageJ programban átalakított képek. A bal oldali itt is a citológiai, a jobb pedig a szövettani minta.
Az előzőhöz hasonlóan, itt is az AgNOR-okat a fekete foltok jelölik.



6. kép: ImageJ programban átalakított képek. A bal oldali kép a citológiai, a jobb pedig a szövettani. A fekete foltok jelölik az AgNOR-okat.

8. Eredmények

Kutatásunk során 29 állat citológiai és szövettani mintát hasonlítottunk össze. Az állatok és a daganatok alapvető adatait az 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: Alapadatok

Fajta	Életkor (év)	Daganat nagysága (legnagyobb átm.)	Tumor helyeződése	Patnaik Grade	Kiupel grade
boxer	11,89	7,50	emlő	2,00	2,00
keverék	6,20	2,50	comb	3,00	2,00
shar-pei	10,67	3,00	végbélnyílás	2,00	1,00
keverék	12,36	2,56	nyak	2,00	1,00
keverék	9,98	3,00	szegycsont	2,00	1,00
yorkshire terrier	4,76	2,00	comb	2,00	1,00
yorkshire terrier	6,67	0,30	faroktő	2,00	1,00
francia bulldog	13,44	2,00	mellkas	3,00	2,00
keverék	10,28	4,00	comb	2,00	1,00
shar-pei	9,26	2,00	szájszél	1,00	1,00
francia bulldog	15,39	1,50	mellső láb	2,00	1,00
berni pásztor	10,52	2,50	mellső láb	2,00	2,00
beagle	13,45	3,70	mellkas	2,00	1,00
staffordshire-keverék	9,10	1,30	comb	3,00	2,00
malinois	17,87	2,50	comb	2,00	1,00
keverék	13,28	5,50	mellkas	1,00	1,00
berni pásztor	7,34	2,00	horpasz	1,00	1,00
amerikai staffordshire terrier	12,49	2,00	hátsó láb	3,00	2,00
angol szetter	14,47	2,50	comb	2,00	1,00
francia bulldog	2,60	13,00	emlő	3,00	2,00
fox terrier jellegű	7,75	3,00	has	2,00	1,00
berni pásztor	7,89	0,40	mellkas	2,00	1,00
keverék	12,0	7,00	fültő	2,00	1,00
amerikai staffordshire terrier	6,0	4,40	váll	2,00	1,00
tacskó	7,0	1,50	szemhéj	2,00	1,00
boston terrier	8,2	0,70	végbélnyílás	1,00	1,00
yorkshire terrier	8,1	4,00	nyak	2,00	1,00
weimari magyar vizsla keverék	10,3	10,65	váll	2,00	1,00
golden retriever	10,7	0,35	comb	2,00	1,00

A kutyák életkorára és ivari állapotára vonatkozó adatok az 5. táblázatban találhatók. Összesen 13 kan, és 16 szuka vett részt a kutatásban, 17-en közülük ivartalanítottak. A kankutyák között 6 ivaros, és 7 kasztrált, míg a szukakutyák között 10 ivartalanított és 6 ivaros állat volt. A kutyák átlagéletkora 10 év volt, a legfiatalabb 2,6 éves, a legidősebb pedig 17,87 éves volt a vizsgálatkor.

5. táblázat: A kutyák ivari állapota és életkora

	Ivar (kan:1, szuka:0)	Ivartalanított (igen: 1, nem: 0)	Kor (év)
Átlag	0,45	0,59	10,00
Szórás	±0,51	±0,50	±3,40
Összeg	29	17,00	289,94

A 6. táblázat tartalmazza az allergiás tüneteket, a diétát és hogy részesültek-e kemoterápiában. A 19 allergiás tüneteket nem mutatók közül egyik kutya sem kapott hipoallergén eleséget, míg a 10 allergiás kutya közül hatan kaptak hipoallergén diétát. A kemoterápia a prednizolon, masivet és vinblastin egyidejű, vagy önálló alkalmazását jelenti.

6. táblázat: Tünetek, diéta, kemoterápia

	Allergiás panaszok (igen: 1, nem: 0)	Hipoallergén diéta (igen: 1, nem: 0)	Kemoterápia (igen: 1, nem: 0)
Átlag	0,34	0,21	0,31
Szórás	±0,48	±0,41	±0,47
Összeg	10,00	6,00	9,00

A kutyák daganataira vonatkozó adatok a 7. táblázatban találhatók. A legkisebb daganat 0,30, a legnagyobb 13 cm volt. Hét kutya esetében recidivált a daganat a műtét után, 2 esetben pedig második recidíva is történt. Továbbá hat esetben tapasztaltuk, hogy a daganat nyirokcsomó áttétet képzett. Ezek közül ketten a vizsgálataink befejezésének idejére elpusztultak, de rajtuk kívül egy nyirokcsomó áttétet nem adó daganattal rendelkező kutya is elpusztult.

Minden daganatot osztályoztak a Patnaik és a Kiupel féle osztályozási rendszer alapján is. A Patnaik-féle osztályozási rendszer a legtöbb daganatot a grade II osztályba, a Kiupel-féle rendszer pedig a low grade osztályba sorolta. Öt esetben volt mindkét osztályozási rendszer szerint high grade (grade 3) daganat.

Az általunk vizsgált daganatok közül a bőr masztocitóma (cutan mastocytoma) volt a gyakoribb. A subcutan mastocytoma pedig, amely a bőr alatti kötőszövetben fejlődik, és klinikailag jelentősen jobbindulatúnak számít, összesen 11 esetben jelentkezett.

7. táblázat: Tumorra vonatkozó adatok

	Nagyság (legnagyobb átm.)	Recidivált eleve (igen: 1, nem: 0)	Nyirokcsomó áttét (igen: 1, nem: 0)	Patnaik grade (1, 2, 3)	Kiupel grade (1, 2)	Cutan MCT	SC MCT
Átlag	3,36	0,24	0,21	2,03	1,24	0,62	0,38
Szórás	±2,94	±0,44	±0,41	±0,57	±0,44	±0,49	±0,49
Összeg	97,36	7,00	6,00	59,00	36,00	18,00	11,00

Az AgNOR festéses vizsgálatok adatait, amelyeket a citológiai és a szövettani minták elemzésével nyertünk az 8. táblázat tartalmazza.

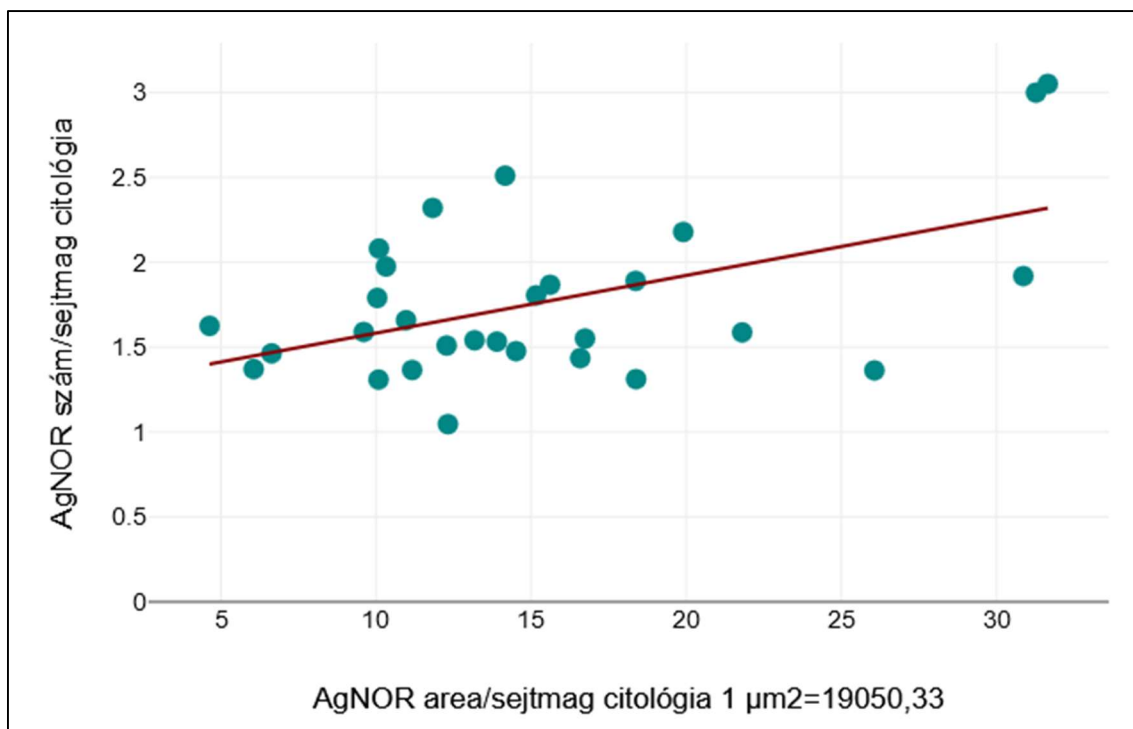
8. táblázat: AgNOR-mérésre vonatkozó adatok

	Citológiai AgNOR area/ sejtmagok száma	Citológiai AgNOR szám/ sejtmagok száma	Citológiai AgNOR area/ AgNOR szám	Szövettani AgNOR area/ sejtmagok száma	Szövettani AgNOR szám/ sejtmagok száma	Szövettani AgNOR area/ AgNOR szám
Átlag	15,32	1,76	8,82	7,87	1,77	6,30
Szórás	±7,21	±0,48	±3,72	±5,04	±0,39	±2,24
Összeg	444,14	51,13	255,74	220,45	49,68	176,33

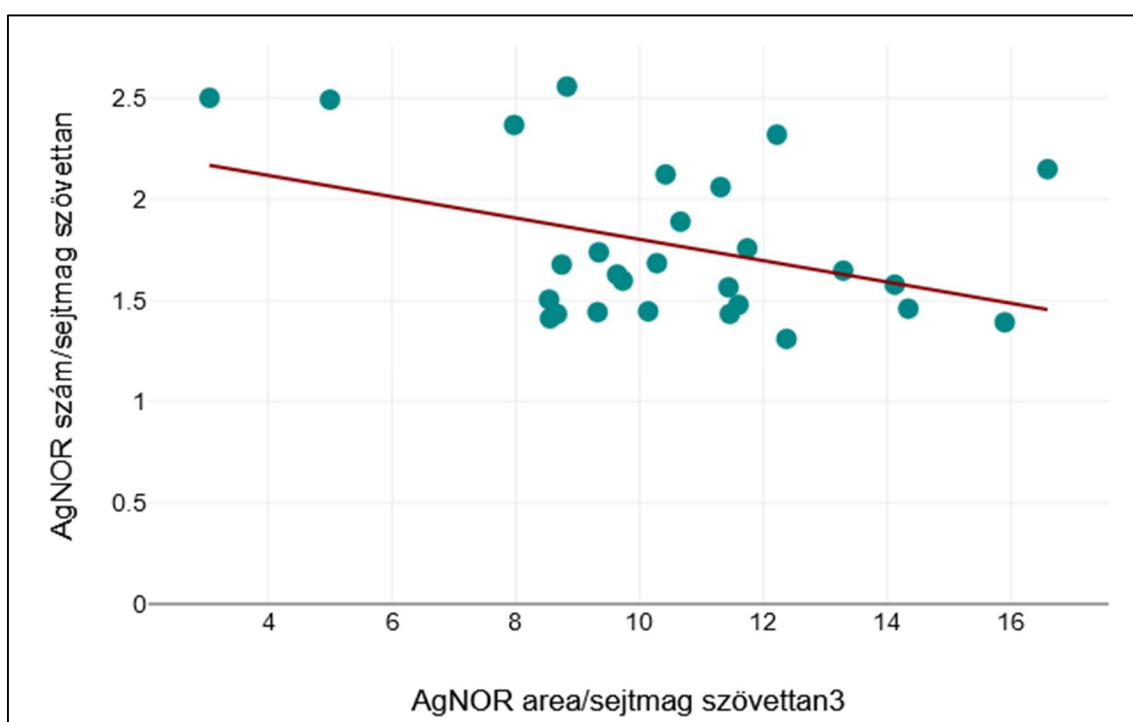
A korrelációs analízis eredményeit a 9. táblázat tartalmazza. A citológiai magonkénti AgNOR szám és az AgNOR felület egymással korrelálnak, és ez a kapcsolat statisztikailag szignifikáns ($p=0,004$) is (1. ábra). Ez azt jelenti, hogy minél nagyobb a citológiai magonkénti AgNOR szám, annál nagyobb az AgNOR felület. Ezzel együtt a szövettani magonkénti AgNOR szám és a szövettani AgNOR felület között fordított korreláció figyelhető meg, de ez az összefüggés is szignifikáns ($p=0,037$) (2. ábra).

9. táblázat: Az AgNOR festések elemzéseinek összehasonlítása citológiai és szövettani mintákon

Változó 1	Változó 2	R-érték (korrelációs koefficiens)	P-érték (szignifikancia)
Citológiai magonkénti AgNOR szám (Citológiai AgNOR szám/sejtmagok száma)	Citológiai magonkénti AgNOR felület (Citológiai AgNOR area/sejtmagok száma)	0,51	0,004
Citológiai magonkénti AgNOR felület (Citológiai AgNOR area/sejtmagok száma)	Szövettani magonkénti AgNOR felület (Szövettani AgNOR area/sejtmagok száma)	0,11	0,561
Citológiai magonkénti AgNOR szám (Citológiai AgNOR szám/sejtmagok száma)	Szövettani magonkénti AgNOR szám (Szövettani AgNOR szám/sejtmagok száma)	0,72	<0,001
Szövettani magonkénti AgNOR szám (Szövettani AgNOR szám/sejtmagok száma)	Szövettani magonkénti AgNOR felület (Szövettani AgNOR area/sejtmagok száma)	-0,39	0,037
Életkor	Citológiai magonkénti AgNOR szám (Citológiai AgNOR szám/sejtmagok száma)	0,4	0,032
Nagyság	Szövettani magonkénti AgNOR szám (Szövettani AgNOR szám/sejtmagok száma)	0,36	0,058

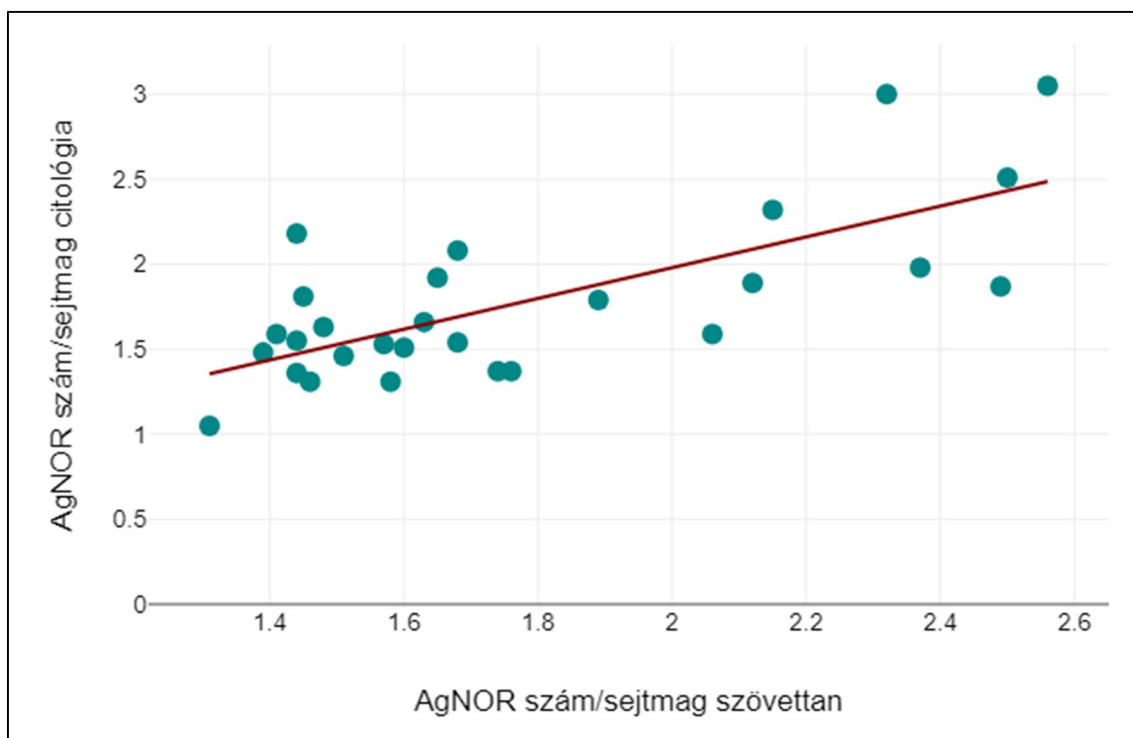


1. ábra: A citológiai magonkénti AgNOR szám és a citológiai magonkénti AgNOR felület összehasonlítása



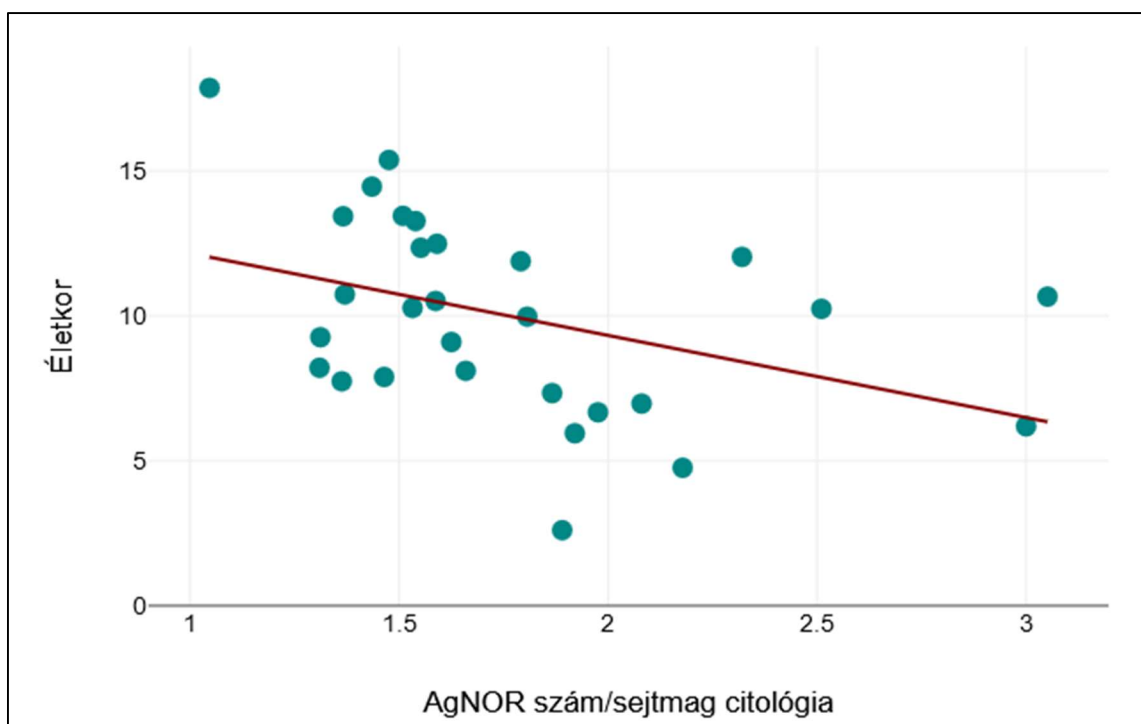
2. ábra: A szövettani magonkénti AgNOR szám összevetése a szövettani magonkénti AgNOR felülettel

A szövettani és a citológiai AgNOR-számok jól korreláltak egymással, és ez az összefüggés szignifikáns is ($p < 0,001$) (3. ábra), de az AgNOR-felületi értékek a két minta esetében nem mutattak korrelációt (9. táblázat).



3. ábra: A szövettani magonkénti AgNOR szám összevetése a citológiai magonkénti AgNOR-számmal

Az életkor és a citológiai magonkénti AgNOR szám között statisztikailag szignifikáns korreláció áll fenn, ami arra utalhat, hogy az idősebb sejtekben magasabb proliferációs aktivitás lehet (4. ábra). A daganat nagysága és a szövettani magonkénti AgNOR szám egymással korrelál, de ez nem éri el a statisztikai szignifikancia szintjét. A többi változó között a korrelációs együtthatók alacsonyak, és a p-értékek sem utalnak statisztikai szignifikanciára.



4. ábra: Az életkor és a citológiai magonkénti AgNOR szám összefüggése

A 10-12 táblázat tartalmazza a Student t-próba eredményeit, illetve az eltérő AgNOR értékeket a különböző osztályozási rendszerek, és nyirokcsomó érintettség szempontjából. A t-próbás statisztikai vizsgálatok nem igazoltak szignifikáns különbségeket. Az AgNOR-értékek magasabbnak bizonyultak nyirokcsomó metasztázis esetén, de a szórásaik hasonlóak voltak, és ezek a különbségek sem voltak statisztikailag szignifikánsak. A szövettani magonkénti AgNOR felület értékei a grade I és II daganatok között jelentősebb különbséget mutatnak (0,06), de nem szignifikánsak.

10. táblázat: AgNOR értékek összehasonlítása a nyirokcsomó metasztázis és a t-próba szempontjából

		AgNOR area/sejtmag citológia	AgNOR area/AgNOR szám citológia	AgNOR area/sejtmag szövettan	AgNOR area/AgNOR szám szövettan
Nyecs metasztázis nincs	Átlag	14,34	8,32	9,92	5,92
	Szórás	6,74	3,33	2,59	2,12
Nyecs metasztázis van	Átlag	19,05	10,72	12,82	7,69
	Szórás	7,11	4,19	2,59	1,89
P-érték		0,22	0,27	0,06	0,10

A Patnaik grade esetében a citológiai magonkénti AgNOR szám és AgNOR felület értékei növekvő tendenciát mutatnak a grade-ek előrehaladtával, de a különbségek nem szignifikánsak. A szövettani magonkénti AgNOR értékek esetében is megfigyelhető ez a növekvő tendencia, de kevésbé kifejezett.

11. táblázat: Patnaik grade-ek összehasonlítása az AgNOR értékek szempontjából, t-próbával

<u>Patnaik Grade</u>		AgNOR szám/ sejtmag citológia	AgNOR area/ sejtmag citológia	AgNOR area/ AgNOR szám citológia	AgNOR szám/ sejtmag szövettan	AgNOR area/ sejtmag szövettan	AgNOR area/ AgNOR szám szövettan
Grade I	Átlag	1,57	14,73	9,38	1,71	10,53	6,19
	Szórás	0,06	4,21	2,66	0,20	0,84	0,67
Grade II	Átlag	1,73	14,12	8,28	1,79	10,70	6,39
	Szórás	0,46	6,79	3,41	0,39	3,37	2,52
Grade III	Átlag	2,04	20,56	10,52	1,75	9,95	6,02
	Szórás	0,57	7,66	4,57	0,44	1,07	1,52
P-érték Grade I vs Grade II		0,16	0,84	0,55	0,61	0,85	0,78
P-érték Grade I vs Grade III		0,18	0,24	0,69	0,88	0,45	0,85
P-érték Grade II vs Grade III		0,36	0,18	0,40	0,87	0,44	0,71

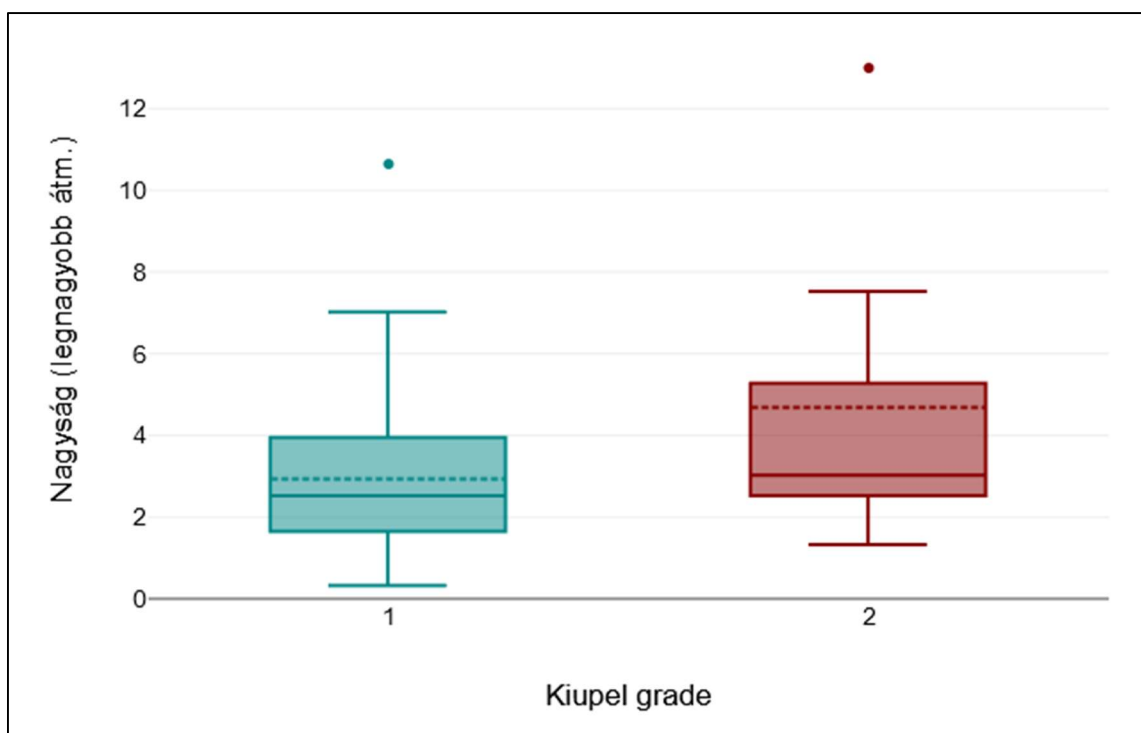
A Kiupel grade esetében a Grade II. csoportban magasabb a citológiai magonkénti AgNOR szám és AgNOR felület, de ezek a különbségek nem szignifikánsak. A szövettani AgNOR mutatók közötti különbségek minimálisak.

12. táblázat: Kiupel grade-ek összehasonlítása az AgNOR értékek szempontjából, t-próba segítségével

<u>Kiupel</u> <u>Grade</u>		AgNOR szám/ sejtmag citológia	AgNOR area/ sejtmag citológia	AgNOR area/ AgNOR szám citológia	AgNOR szám/ sejtmag szövettan	AgNOR area/ sejtmag szövettan	AgNOR area/ AgNOR szám szövettan
Grade I	Átlag	1,70	14,47	8,66	1,78	10,64	6,36
	Szórás	0,44	6,34	3,25	0,37	3,22	2,38
Grade II	Átlag	1,96	17,97	9,31	1,77	10,25	6,12
	Szórás	0,50	8,50	4,69	0,41	1,07	1,51
P-érték		0,29	0,38	0,76	0,96	0,65	0,78

A parametrikus számsorok esetében elvégzett Student-féle t-próba esetében az eredmények a 11-12. táblázatban láthatók a Patnaik és Kiupel osztályozási rendszerekre. A Patnaik rendszer 3 grade-je között a citológiai és szövettani AgNOR értékek sem mutatnak statisztikailag szignifikáns eltéréseket. A citológiai AgNOR szám/sejtmag értékek nem parametrikus számsorokat mutattak. Itt a Kruskal-Wallis Teszt-tel végeztük az elemzést és a p-érték 0,491-nek adódott. Csakúgy, mint a szövettani AgNOR area/sejtmag esetében, ahol a p-érték 0,814 volt.

A kétfokozatú Kiupel rendszer esetében a daganat nagyságában figyelhető meg jelentősebb eltérés a low grade (1) (átlag: $2,93 \pm 2,4$ cm) és high grade (2) ($4,69 \pm 4,17$ cm) daganatok között, és ez a különbség közel szignifikáns (5. ábra) ($p=0,074$). A szövettani sejtmagonkénti AgNOR felület (nem parametrikus Mann-Whitney U-Test-tel) és a szövettani AgNOR számonkénti AgNOR felület sem mutat szignifikáns eltérést a két osztály között (12. táblázat).



5. ábra: A daganat nagysága és a Kiupel grade összehasonlítása

További tapasztalat volt, hogy az allergiás tünetekkel kapcsolódó mastocytomás esetekben a daganat nagysága és malignitási foka a Patnaik és a Kiupel grade rendszerekben nem mutatott összefüggést. A nem allergiások közül a citológiai AgNOR szám/sejtmag értékek magasabbak voltak (átlag: $1,82 \pm 0,53$), mint az allergiásoké (átlag: $1,66 \pm 0,30$) ($p=0,343$). A szövettani AgNOR szám/sejtmag és a citológiai valamint a szövettani AgNOR area/sejtmag értékek nem ezt a tendenciát mutatták, tehát a nem allergiások értékei voltak kisebbek (13. táblázat).

13. táblázat: Allergiás tüneteket mutató és nem mutató kutyák AgNOR-értékeinek összehasonlítása t-próba segítségével

		AgNOR szám/ sejtmag citológia	AgNOR area/sejtmag citológia	AgNOR szám/ sejtmag szövettan	AgNOR area/sejtmag szövettan
Nem allergiás n=19	Átlag	1,82	14,66	1,77	10,40
	Szórás	0,53	6,66	0,42	3,26
Allergiás (n=10)	Átlag	1,66	16,56	1,78	10,79
	Szórás	0,30	7,67	0,29	1,87
P-érték		0,343	0,536	0,967	0,700

9. Megbeszélés

A kutyafajtákat illetően a boxerek, az amerikai staffordshire terrier, a francia bulldogok, a labrador és golden retrieverek, a staffordshire bullterrier, a weimari vizslák, a magyar és német vizslák, a shar-peiek, a rodéziai ridgeback-ek, és a boston terrier esetében alakul ki leggyakrabban hízósejtes daganat [10–12]. A mi kutatásunkban ezek közül a labrador retriever és a rodéziai ridgebacken kívül az összes fajta megtalálható, de ezeken kívül a beagle, malinois, angol szetter és tacsó fajtákból is 1-1 állat vizsgálatra került. A kutyák 28%-a keverék volt, a yorkshire terrier, francia bulldog és berni pásztor fajták pedig 3-3 egyeddel szintén nagyobb arányban fordultak elő. Ez arra utalhat, hogy ezekben a fajtákban nagyobb lehet a MCT kialakulásának kockázata. Itt külön kiemelve a yorkshire terrier fajtát, amelynél a mi eredményeink ellentétben álltak az előzetes kutatásokkal, miszerint ebben a fajtában alacsonyabb a kialakulás kockázata [12, 16]. Ezeken kívül még kettő egyed került vizsgálatra a shar-pe és staffordshire terrier fajtákból. A korábbi tanulmányokkal megegyezően, itt is azt tapasztaltuk, hogy golden retrieverben nagyobb a multiplex MCT kialakulásának kockázata [21, 22]

Az ivararányt tekintve a mastocytoma valamivel gyakrabban fordult elő szukákban, mint kanokban [12], és ezt a mi eredményeink is megerősítik, mert 16 szuka (55%) és 13 kan (45%) került vizsgálatra. A mi eseteink arra utalnak, hogy az ivartalanítás növelheti a hízósejtes daganat kialakulásának kockázatát, mert a kutyák 59%-a ivartalanított volt. Ezt az összefüggést több korábbi tanulmány is megállapította [15, 21, 28].

Az életkor vonatkozásában a mastocytoma a felnőtt és idősebb állatoknál gyakoribb [4, 12], és ezt a mi kutatásunkban is tapasztaltuk, az átlagéletkor 10 év volt. A 7-12 éves korosztályba 16 beteg került (gyakoriság: 55%), 12 évnél idősebb állat pedig 8 db volt (gyakoriság: 28%). 4 kutya volt 4-7 éves kor között (gyakoriság: 14%), 1 kutya pedig 4 évnél fiatalabb volt. A legfiatalabb egyedet kivéve mindenhol a low grade daganat volt gyakoribb, szemben a szakirodalommal, amely szerint az idősebbekben a high grade MCT-k gyakrabban fordulnak elő [12]. Előzetes kutatásokkal megegyezően az idősebb korosztályban gyakrabban alakultak ki multiplex daganatok [21]. A mi vizsgálatunkban az életkor és a citológiai magonkénti AgNOR szám között szignifikáns összefüggést találtunk, ezért kijelenthetjük, hogy az életkor növekedésével nagyobb a malignusabb MCT-k kialakulásának a kockázata.

A daganatok elhelyezkedését tekintve a kapott eredményeink nagyjából alátámasztják a szakirodalmi adatokat, miszerint leggyakrabban a törzs, a perineum és a lágyéki-genitális

régiókban (50%), majd a végtagokon (40%), és ritkábban a fej-nyak területén (10%) alakulnak ki hízósejtes tumorok [4]. A mi kutatásunkban a törzsi területeken és a végtagokon is 41%-ban fordult elő MCT, a fej-nyaki régióban pedig az esetek 12%-ban láttunk daganatot. Cutan mastocytoma 18 esetben, subcutan pedig 11 esetben alakult ki. A szakirodalomban leírt kevésbé agresszív subcutan MCT-k jelen tanulmányban nem voltak ennyire egyértelműek [23, 33], mert cutan és subcutan esetben is több volt a low grade daganat, mint a high grade.

A tumorméretetek a szakirodalomban is nagyon változatosak, és a tolómércével mérve a daganatot 1, 2 vagy 3 átmérőt adnak meg. A mi kutatásunkban a legnagyobb átmérőt adtuk meg, amelynek mérete 0,3 cm-től 13 cm-ig változott. A legtöbb daganat nagysága 1-3 cm között volt (55%), 1 cm-nél kisebb, illetve 3-5 cm közötti daganatból 4-4 db volt, 5 cm felett pedig 5 db tumor volt a vizsgálatban. A tanulmányunkban összefüggést találtunk a daganat mérete és malignitása között (minél nagyobb a tumor, annál malignusabb), azonban statisztikai módszerrel ezek az eredmények nem szignifikánsak. Egy publikációban arról számoltak be, hogy a multiplex MCT-k 1/3-ának a mérete < 3 cm [24]. A mi kutatásunkban a multiplex daganatok 50%-a volt 3 cm alatti.

A multiplex tumorok gyakoriak a kutyák mastocytomái esetén. A WHO jelenlegi stádium meghatározási sémája szerint a multiplex megjelenés III. stádiumú betegség, és rosszabb prognózist jelent, mint a soliter típusok [21]. Ugyanakkor más szerzők szerint a multiplex megjelenésnek nincs hatása a túlélésre [24]. A mi vizsgálataink azt mutatják, hogy a daganatok multiplex volta fordított arányosságban van a malignitási fokkal, 60%-uk low grade volt, ami utalhat arra, hogy az egyszerre több helyen való megjelenés inkább a kevésbé malignus daganatokra jellemző. Ez persze nem jelenti azt, hogy ez a tény biztosan jobb kórjóslatot is jelent.

A citológiai grade [8] és a szövettani grade [32] egyezése különösebben nem tér el a szakirodalmi adatokban leírtakhoz képest. Ha a szövettani grading-et vesszük alapul, „arany sztandard”-nak, akkor a citológiai grading pontossága („accuracy”) 94% (szenzitivitása 84.6%; specificitása 97.3%) [119]. A daganatok hozzávetőleg egyharmada (31,8%) volt fals pozitív (azaz citológiaiilag magas fokozatú, de szövettanilag alacsony fokozatú), míg nagyon kevés (1,6%) volt fals negatív (azaz citológiaiilag alacsony, de szövettanilag magas fokozatú) [8]. A citológusok közötti konzisztencia 75,5% volt, a 129-ből 95 (73,6%) alacsony grade daganat és a 22-ből 18 (81,8%) magas grade daganat esetében van egyetértés [119].

A nyirokcsomó metasztázis rossz prognózist jelent mastocytoma esetén is [1, 22, 25, 49]. Nyirokcsomó áttétes betegből összesen 6 db került vizsgálatra. Már eleve recidivált, korábban

már műtött eset 7 volt, ezek közül 2 nyirokcsomó metasztázissal is rendelkezett. A vizsgálat óta 3 beteg elhullásáról van információnk, ezek közül az egyiknek nyirokcsomó-áttéte volt, a másik recidivált és nyirokcsomó metasztázissal is rendelkezett, a harmadiknál pedig egyiket sem állapították meg. Kutatásunkban nyirokcsomó metasztázis esetén a magonkénti és az AgNOR számonkénti AgNOR felület értékek magasabbnak bizonyultak a citológiai és szövettani mintákban egyaránt. Ez a kapcsolat azonban nem volt szignifikáns, de arra utalhat, hogy a metasztázissal érintett sejtek fokozott proliferációt vagy metabolikus aktivitást mutathatnak.

A daganatok kialakulásának hátterében a hízósejtes gócok kialakulásánál egyidejű, ill. egyszerre jelentkező folyamatok (pl. allergia) állhatnak. Ezt a megfigyelésünket alátámasztja más kutatás is, amely leírja, hogy a multiplex daganatokkal rendelkező kutyákban több a kis malignitású daganat, és gyakori az allergiás háttér [24].

Az AgNOR értékeket tekintve azt találtuk, hogy az allergiás tüneteket mutató betegeknek a szövettani AgNOR szám/sejtmag és AgNOR area/sejtmag, illetve a citológiai AgNOR area/sejtmag értékeik magasabbak voltak, mint az allergiás tüneteket nem mutató állatoknál. Ez az allergiás gyulladás és a sejtek fokozott metabolikus aktivitása miatt lehet. Ennek tudatában az lenne várható, ha a citológiai magonkénti AgNOR szám is nőne allergia esetén. Azonban a mi kutatásunkban ez az érték alacsonyabb volt az allergiás állatoknál. Ennek az eltérésnek lehet az az oka, hogy a szövettani előkészítés megváltoztathatta a struktúrákat, a NOR fehérjék károsodhattak a formalinban és a paraffinban, és ez befolyásolta az AgNOR számot. De az is egy magyarázat, hogy az allergiás folyamatok során a sejtekben a nukleoláris régiók mérete (AgNOR area) nőhet anélkül, hogy több különálló régió (AgNOR szám) jelenne meg.

A Patnaik grade esetében azt találtuk, hogy a grade növekedésével nőttek az AgNOR értékek is, jelezve a magasabb malignitású daganatok fokozott proliferációs aktivitását. A Kiupel grade vizsgálatokor azonban ez a növekvő tendencia csak a citológiai AgNOR értékeknél figyelhető meg. A különbség oka lehet, hogy a Patnaik grade részletesebb osztályozást nyújt (3 grade), így a finomabb különbségeket is ki tudja mutatni, míg a Kiupel rendszer egyszerűbb, kevesebb kategóriával (2 grade), és így a szövettani AgNOR értékek kisebb változásai elmosódhatnak a statisztikai elemzésben, míg a citológiai AgNOR értékek jobban tükrözik az aktivitást.

A citológiai magonkénti AgNOR szám és felület között statisztikailag igazolt összefüggést találtunk, tehát ha egy sejtmagban több NOR van jelen, azok egyenként is nagyobb méretűek lesznek. Ez a citológiai mintákban megjelenő proliferációs aktivitás intenzitására utalhat, hiszen a magasabb NOR-szám és -méret a sejtek fokozott riboszóma-szintézisét és metabolikus aktivitását jelezheti. A szövettani magonkénti AgNOR értékek között is szignifikáns az

összefüggés, azonban ezek között fordított korreláció van, tehát minél több NOR van a sejtmagban, azok annál kisebb méretűek lesznek. Ez a korábban már említett feltevésre utalhat, miszerint a szövettani feldolgozás során a NOR-ok károsodhattak.

Az AgNOR paraméterek AgNOR felületet érintő összefüggései csak a szövettani és a citológiai mintákon belüli AgNOR paraméterek között bizonyultak szignifikánsnak, de a citológia és a szövettan között nem. Ezzel szemben a magonkénti AgNOR szám a citológiai és a szövettani minták között is statisztikailag szignifikáns korrelációt mutat ($r=0,72$; $p<0,001$). Ez a kutatásunk legfontosabb összefüggése. Ez alapján igazolni tudtuk, hogy van értelme az összehasonlításoknak, és citológiai mintavétellel esetleg helyettesíthetjük a szövettani mintavételezést. Így a szövettani értékelés helyett, amely 2-3 napba is beletelhet, a citológiai minták számítógépes értékelése 2 órára csökkentheti a vizsgálatok idejét.

10. Összefoglalás

Kutatásunkban kutyák mastocytomáinak diagnosztikai és prognosztikai értékelésével foglalkoztam, különös tekintettel az AgNOR festési módszer alkalmazására. A daganatok diagnosztizálására jelenleg a szövettani vizsgálat számít arany standardnak, de a citológiai mintavétel kevésbé invazív alternatívaként szintén fontos szerepet játszik. A szövettani és citológiai vizsgálatok kiegészítésére az AgNOR festési módszer egy objektív és gyorsan kivitelezhető technika, amely a sejtprolifерációt méri a nukleoláris szervező régiók számának és méretének meghatározásával. Kutatásunkban az AgNOR módszert alkalmaztuk 29 mastocytomás kutya szövettani és citológiai mintáin, hogy összehasonlítsuk a kétféle minta eredményeit, és meghatározzuk a módszer alkalmazhatóságát a daganatok prognózisának megítélésében.

A vizsgálatban az AgNOR-értékek növekvő tendenciát mutattak a daganatok Patnaik grade-jének emelkedésével, míg a Kiupel grade esetében ez a tendencia csak a citológiai mintákban volt megfigyelhető. Bár ezek az eltérések nem minden esetben bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak, a különbségek jelzik a daganatok progressziójával összefüggő proliferációs aktivitást. A citológiai és szövettani minták AgNOR számai között erős korreláció ($r=0,72$; $p<0,001$) figyelhető meg, ami alátámasztja a citológiai minták megbízhatóságát és alkalmazhatóságát.

Fontos megfigyelés, hogy a citológiai mintákban a magonkénti AgNOR szám és felület pozitív korrelációt mutatott, azaz több nukleoláris régióval nagyobb méret is társult. Ezzel szemben a szövettani mintákban fordított korreláció volt tapasztalható: a több AgNOR kisebb méretekkkel párosult. Ez az eltérés a két mintavételi módszer eltérő technikáira utalhat.

Az életkor és az AgNOR-értékek között szignifikáns összefüggés volt kimutatható, ami az idősebb állatokban fokozott proliferációs aktivitásra utalhat. Az eredmények alapján az AgNOR festési módszer hasznos kiegészítő eszköz lehet a mastocytomák prognosztikai értékelésében, különösen a kevésbé invazív citológiai minták esetében. Ez a technika gyors és költséghatékony alternatívát nyújthat a hagyományos szövettani módszerekkel szemben, hozzájárulva a daganatok pontosabb diagnosztikájához és a kezelési stratégiák tervezéséhez.

11. Irodalomjegyzék

1. Bostock DE (1986) Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *British Veterinary Journal* 142:1–19. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(86\)90002-3](https://doi.org/10.1016/0007-1935(86)90002-3)
2. Finnie J w., Bostock D e. (1979) Skin Neoplasia in Dogs. *Australian Veterinary Journal* 55:602–604. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1979.tb07068.x>
3. Rothwell TLW, Howlett CR, Middleton DJ, Griffiths DA, Duff BC (1987) Skin neoplasms of dogs in Sydney. *Australian Veterinary Journal* 64:161–164. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1987.tb09673.x>
4. London CA, Thamm DH (2020) Mast Cell Tumors. In: Vail DM, Thamm DH, Liptak JM (eds) *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*, Sixth edition. Elsevier, Edinburgh ; New York, pp 382–397
5. London CA, Seguin B (2003) Mast cell tumors in the dog. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 33:473–489. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(03)00003-2)
6. Misdorp W (2004) Mast cells and canine mast cell tumours. A review. *Veterinary Quarterly* 26:156–169. <https://doi.org/10.1080/01652176.2004.9695178>
7. Sledge DG, Webster J, Kiupel M (2016) Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *The Veterinary Journal* 215:43–54. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.06.003>
8. Camus MS, Priest HL, Koehler JW, Driskell EA, Rakich PM, Ilha MR, Krimer PM (2016) Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome. *Vet Pathol* 53:1117–1123. <https://doi.org/10.1177/0300985816638721>
9. Blackwood L, Murphy S, Buracco P, De Vos JP, De Fornel-Thibaud P, Hirschberger J, Kessler M, Pastor J, Ponce F, Savary-Bataille K, Argyle DJ (2012) European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology* 10:e1–e29. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00341.x>
10. Warland J, Dobson J (2013) Breed predispositions in canine mast cell tumour: A single centre experience in the United Kingdom. *The Veterinary Journal* 197:496–498. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.02.017>
11. Villamil JA, Henry CJ, Bryan JN, Ellersieck M, Schultz L, Tyler JW, Hahn AW (2011) Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. <https://doi.org/10.2460/javma.239.7.960>
12. Śmiech A, Ślaska B, Łopuszyński W, Jasik A, Bochyńska D, Dąbrowski R (2018) Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification. *Acta Vet Scand* 60:70. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0424-2>
13. Shoop SJ, Marlow S, Church DB, English K, McGreevy PD, Stell AJ, Thomson PC, O'Neill DG, Brodbelt DC (2015) Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs

in England. *Canine Genetics and Epidemiology* 2:1. <https://doi.org/10.1186/2052-6687-2-1>

14. Leidinger EF, Freeman K, Kirtz G, Hooijberg EH, Sick K (2014) Breed related odds ratio and anatomic distribution of canine mast cell tumours in Austria: Retrospective study of cases in the years 2000–2010. *Tierarztl Prax Ausg K* 42:367–373. <https://doi.org/10.15654/TPK-140165>
15. White CR, Hohenhaus AE, Kelsey J, Procter-Gray E (2011) Cutaneous MCTs: Associations with Spay/Neuter Status, Breed, Body Size, and Phylogenetic Cluster. *Journal of the American Animal Hospital Association* 47:210–216. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5621>
16. Mochizuki H, Motsinger-Reif A, Bettini C, Moroff S, Breen M (2017) Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 15:829–839. <https://doi.org/10.1111/vco.12225>
17. McNiel EA, Prink AL, O'Brien TD (2006) Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. *Veterinary and Comparative Oncology* 4:2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5810.2006.00085.x>
18. Dobson JM (2013) Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. *International Scholarly Research Notices* 2013:941275. <https://doi.org/10.1155/2013/941275>
19. Miller DM (1995) The Occurrence of Mast Cell Tumors in Young Shar-Peis. *J VET Diagn Invest* 7:360–363. <https://doi.org/10.1177/104063879500700311>
20. Wakshlag JJ, Rassnick KM, Malone EK, Struble AM, Vachhani P, Trump DL, Tian L (2011) Cross-sectional study to investigate the association between vitamin D status and cutaneous mast cell tumours in Labrador retrievers. *British Journal of Nutrition* 106:S60–S63. <https://doi.org/10.1017/S000711451100211X>
21. Kiupel M, Webster JD, Miller RA, Kaneene JB (2005) Impact of Tumour Depth, Tumour Location and Multiple Synchronous Masses on the Prognosis of Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 52:280–286. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2005.00726.x>
22. Murphy S, Sparkes AH, Blunden AS, Brearley MJ, Smith KC (2006) Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. *Veterinary Record* 158:287–291. <https://doi.org/10.1136/vr.158.9.287>
23. De Nardi AB, Dos Santos Horta R, Fonseca-Alves CE, De Paiva FN, Linhares LCM, Firmo BF, Ruiz Sueiro FA, De Oliveira KD, Lourenço SV, De Francisco Strefezzi R, Brunner CHM, Rangel MMM, Jark PC, Castro JLC, Ubukata R, Batschinski K, Sobral RA, Da Cruz NO, Nishiya AT, Fernandes SC, Dos Santos Cunha SC, Gerardi DG, Challoub GSG, Biondi LR, Laufer-Amorim R, De Oliveira Paes PR, Lavallo GE, Hupperts RR, Grandi F, De Carvalho Vasconcellos CH, Dos Anjos DS, Luzo ACM, Matera JM, Vozdova M, Dagli MLZ (2022) Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Cells* 11:618. <https://doi.org/10.3390/cells11040618>

24. O'Connell K, Thomson M (2013) Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. *Vet Comparative Oncology* 11:51–62. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00301.x>
25. Mullins MN, Dernell WS, Withrow SJ, Ehrhart EJ, Thamm DH, Lana SE (2006) 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). <https://doi.org/10.2460/javma.228.1.91>
26. Gerritsen RJ, Teske E, Kraus JS, Rutteman GR (1998) Multi-agent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. *Veterinary Quarterly* 20:28–31. <https://doi.org/10.1080/01652176.1998.9694832>
27. Elling H, Ungemach FR (1982) Sexual hormone receptors in canine mast cell tumour cytosol. *Journal of Comparative Pathology* 92:629–630. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(82\)90016-0](https://doi.org/10.1016/0021-9975(82)90016-0)
28. Zink MC, Farhooody P, Elser SE, Ruffini LD, Gibbons TA, Rieger RH (2014) Evaluation of the risk and age of onset of cancer and behavioral disorders in gonadectomized Vizslas. <https://doi.org/10.2460/javma.244.3.309>
29. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG (1984) Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. *Vet Pathol* 21:469–474. <https://doi.org/10.1177/030098588402100503>
30. Kupfer J (2010) Cutaneous mast cell tumours in dogs. *Veterinary Record* 166:407–408. <https://doi.org/10.1136/vr.c1657>
31. Welle MM, Bley CR, Howard J, Rüfenacht S (2008) Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology* 19:321–339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2008.00694.x>
32. Willmann M, Yuzbasiyan-Gurkan V, Marconato L, Dacasto M, Hadzijasufovic E, Hermine O, Sadovnik I, Gamperl S, Schneeweiss-Gleixner M, Gleixner KV, Böhm T, Peter B, Eisenwort G, Moriggl R, Li Z, Jawhar M, Sotlar K, Jensen-Jarolim E, Sexl V, Horny H-P, Galli SJ, Arock M, Vail DM, Kiupel M, Valent P (2021) Proposed Diagnostic Criteria and Classification of Canine Mast Cell Neoplasms: A Consensus Proposal. *Front Vet Sci* 8:755258. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.755258>
33. Pakhrin B, Kang M-S, Bae I-H, Park M-S, Jee H, You M-H, Kim J-H, Yoon B-I, Choi Y-K, Kim D-Y (2007) Retrospective study of canine cutaneous tumors in Korea. *Journal of Veterinary Science* 8:229–236. <https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.3.229>
34. Iwata N, Ochiai K, Kadosawa T, Takiguchi M, Umemura T (2000) Canine Extracutaneous Mast-cell Tumours Consisting of Connective Tissue Mast Cells. *Journal of Comparative Pathology* 123:306–310. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0420>
35. Patnaik AK, Twedt DC, Marretta SM (1980) Intestinal mast cell tumour in a dog. *Journal of Small Animal Practice* 21:207–212. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1980.tb01237.x>

36. Hillman LA, Garrett LD, Lorimier L-P de, Charney SC, Borst LB, Fan TM (2010) Biological behavior of oral and perioral mast cell tumors in dogs: 44 cases (1996-2006). <https://doi.org/10.2460/javma.237.8.936>
37. Ozaki K, Yamagami T, Nomura K, Narama I (2002) Mast Cell Tumors of the Gastrointestinal Tract in 39 Dogs. *Vet Pathol* 39:557–564. <https://doi.org/10.1354/vp.39-5-557>
38. Culp WTN, Ehrhart N, Withrow SJ, Rebhun RB, Boston S, Buracco P, Reiter AM, Schallberger SP, Aldridge CF, Kent MS, Mayhew PD, Brown DC (2013) Results of surgical excision and evaluation of factors associated with survival time in dogs with lingual neoplasia: 97 cases (1995–2008). <https://doi.org/10.2460/javma.242.10.1392>
39. Khoo A, Lane A, Wyatt K (2017) Intranasal mast cell tumor in the dog: A case series. *Can Vet J* 58:851–854. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5508967/> Access 04 October 2024
40. Endicott MM, Charney SC, McKnight JA, Loar AS, Barger AM, Bergman PJ (2007) Clinicopathological findings and results of bone marrow aspiration in dogs with cutaneous mast cell tumours: 157 cases (1999–2002). *Veterinary and Comparative Oncology* 5:31–37. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2006.00115.x>
41. Hahn KA, King GK, Carreras JK (2004) Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade-III mast cell tumors in dogs: 31 cases (1987–1998). <https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.79>
42. Willmann M, Hadzijušufovic E, Hermine O, Dacasto M, Marconato L, Bauer K, Peter B, Gamperl S, Eisenwort G, Jensen-Jarolim E, Müller M, Arock M, Vail DM, Valent P (2019) Comparative oncology: The paradigmatic example of canine and human mast cell neoplasms. *Veterinary and Comparative Oncology* 17:1–10. <https://doi.org/10.1111/vco.12440>
43. Stockham SL, Basel DL, Schmidt DA (1986) Mastocytemia in Dogs With Acute Inflammatory Diseases. *Veterinary Clinical Pathology* 15:16–21. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.1986.tb00862.x>
44. Hikasa Y, Morita T, Futaoka Y, Sato K, Shimada A, Kagota K, Matsuda H (2000) Connective Tissue-Type Mast Cell Leukemia in a Dog. *Journal of Veterinary Medical Science* 62:187–190. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.187>
45. Cartagena-Albertus JC, Moise A, Moya-García S, Cámara-Fernández N, Montoya-Alonso JA (2019) Presumptive primary intrathoracic mast cell tumours in two dogs. *BMC Veterinary Research* 15:204. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1950-5>
46. Matsuda K, Sakaguchi K, Kobayashi S, Tominaga M, Hirayama K, Kadosawa T, Taniyama H (2009) Systemic Candidiasis and Mesenteric Mast Cell Tumor with Multiple Metastases in a Dog. *Journal of Veterinary Medical Science* 71:229–232. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.229>
47. Allan GS, Watson AD, Duff BC, Howlett CR (1974) Disseminated mastocytoma and mastocytemia in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 165:346–349. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4211931/> Access 02 October 2024

48. Takahashi T, Kadosawa T, Nagase M, Matsunaga S, Mochizuki M, Nishimura R, Sasaki N (2000) Visceral mast cell tumors in dogs: 10 cases (1982–1997). <https://doi.org/10.2460/javma.2000.216.222>
49. Weisse C, Shofer FS, Sorenmo K (2002) Recurrence Rates and Sites for Grade II Canine Cutaneous Mast Cell Tumors Following Complete Surgical Excision. *Journal of the American Animal Hospital Association* 38:71–73. <https://doi.org/10.5326/0380071>
50. Dobson JM, Scase TJ (2007) Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *Journal of Small Animal Practice* 48:424–431. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2007.00366.x>
51. Sfiligoi G, Rassnick KM, Scarlett JM, Northrup NC, Gieger TL (2005) Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990–2001). <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1368>
52. Govier SM (2003) Principles of treatment for mast cell tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 18:103–106. <https://doi.org/10.1053/svms.2003.36624>
53. Horta RS, Lavallo GE, Monteiro LN, Souza MCC, Cassali GD, Araújo RB (2018) Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Vet Pathol* 55:212–223. <https://doi.org/10.1177/0300985817747325>
54. Turrel JM, Kitchell BE, Miller LM, Théon A (1988) Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. *J Am Vet Med Assoc* 193:936–940. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3142828/> Access 07 October 2024
55. Lin T-Y, Rush LJ, London CA (2006) Generation and characterization of bone marrow-derived cultured canine mast cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113:37–52. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.024>
56. Lin T-Y, London CA (2006) A functional comparison of canine and murine bone marrow derived cultured mast cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114:320–334. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.09.001>
57. Kumar V, Sharma A (2010) Mast cells: Emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Molecular Immunology* 48:14–25. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.07.009>
58. Noviana D, Mamba K, Makimura S, Horii Y (2004) Distribution, Histochemical and Enzyme Histochemical Characterization of Mast Cells in Dogs. *Histochem J* 35:123–132. <https://doi.org/10.1023/B:HIJO.0000023377.70443.08>
59. Metz M, Piliponsky AM, Chen C-C, Lammel V, Åbrink M, Pejler G, Tsai M, Galli SJ (2006) Mast Cells Can Enhance Resistance to Snake and Honeybee Venoms. *Science* 313:526–530. <https://doi.org/10.1126/science.1128877>
60. Hottendorf GH, Nielsen SW (1967) Pathologic Survey of 300 Extirpated Canine Mastocytomas. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 14:272–281. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1967.tb00235.x>

61. Bostock DE (1973) The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *Journal of Small Animal Practice* 14:27–40. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1973.tb06891.x>
62. Northrup NC, Harmon BG, Gieger TL, Brown CA, Carmichael KP, Garcia A, Latimer KS, Munday JS, Rakich PM, Richey LJ, Stedman NL, Cheng A-L, Howerth EW (2005) Variation among Pathologists in Histologic Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *J VET Diagn Invest* 17:245–248. <https://doi.org/10.1177/104063870501700305>
63. Sabattini S, Scarpa F, Berlato D, Bettini G (2015) Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor: Is 2 Better Than 3? *Vet Pathol* 52:70–73. <https://doi.org/10.1177/0300985814521638>
64. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, DeLay J, Detrisac CJ, Fitzgerald SD, Gamble D, Ginn PE, Goldschmidt MH, Hendrick MJ, Howerth EW, Janovitz EB, Langohr I, Lenz SD, Lipscomb TP, Miller MA, Misdorp W, Moroff S, Mullaney TP, Neyens I, O'Toole D, Ramos-Vara J, Scase TJ, Schulman FY, Sledge D, Smedley RC, Smith K, W. Snyder P, Southorn E, Stedman NL, Steficek BA, Stromberg PC, Valli VE, Weisbrode SE, Yager J, Heller J, Miller R (2011) Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Vet Pathol* 48:147–155. <https://doi.org/10.1177/0300985810386469>
65. Stefanello D, Buracco P, Sabattini S, Finotello R, Giudice C, Grieco V, Iussich S, Tursi M, Scase T, Palma SD, Bettini G, Ferrari R, Martano M, Gattino F, Marrington M, Mazzola M, Vasconi ME, Annoni M, Marconato L (2015) 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). <https://doi.org/10.2460/javma.246.7.765>
66. Owen LN (1980) TNM Classification of Tumours in Domestic Animals. World Health Organization, Geneva. <https://iris.who.int/handle/10665/68618> Access 04 October 2024
67. Thamm DH, Turek MM, Vail DM (2006) Outcome and Prognostic Factors Following Adjuvant Prednisone/Vinblastine Chemotherapy for High-Risk Canine Mast Cell Tumour: 61 Cases. *Journal of Veterinary Medical Science* 68:581–587. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.581>
68. Thamm DH, Mauldin EA, Vail DM (1999) Prednisone and Vinblastine Chemotherapy for Canine Mast Cell Tumor—41 Cases (1992–1997). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13:491–497. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1999.tb01468.x>
69. Preziosi R, Sarli G, Paltrinieri M (2007) Multivariate Survival Analysis of Histological Parameters and Clinical Presentation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. *Vet Res Commun* 31:287–296. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3427-9>
70. Newman SJ, Mrkonjich L, Walker KK, Rohrbach BW (2007) Canine Subcutaneous Mast Cell Tumour: Diagnosis and Prognosis. *Journal of Comparative Pathology* 136:231–239. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.02.003>
71. Thompson JJ, Yager JA, Best SJ, Pearl DL, Coomber BL, Torres RN, Kiupel M, Foster RA (2011) Canine Subcutaneous Mast Cell Tumors: Cellular Proliferation and KIT

Expression as Prognostic Indices. Vet Pathol 48:169–181.
<https://doi.org/10.1177/0300985810390716>

72. Thompson JJ, Pearl DL, Yager JA, Best SJ, Coomber BL, Foster RA (2011) Canine Subcutaneous Mast Cell Tumor: Characterization and Prognostic Indices. Vet Pathol 48:156–168. <https://doi.org/10.1177/0300985810387446>
73. Donnelly L, Mullin C, Balko J, Goldschmidt M, Krick E, Hume C, Brown DC, Sorenmo K (2015) Evaluation of histological grade and histologically tumour-free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumours. Veterinary and Comparative Oncology 13:70–76. <https://doi.org/10.1111/vco.12021>
74. Ohmori K, Kawarai S, Yasuda N, Tanaka A, Matsuda H, Nishimura R, Sasaki N, Tsujimoto H, Masuda K (2008) Identification of *c-kit* mutations-independent neoplastic cell proliferation of canine mast cells. Veterinary Immunology and Immunopathology 126:43–53. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.06.014>
75. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN (1993) The kit Ligand, Stem Cell Factor. In: Dixon FJ (ed) Advances in Immunology. Academic Press, pp 1–96. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60508-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60508-8)
76. Roskoski R (2005) Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase—The stem cell factor receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications 338:1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.150>
77. Roskoski R (2005) Signaling by Kit protein-tyrosine kinase—The stem cell factor receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications 337:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.055>
78. Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe M, Takahashi M, Nakagawa T, Takeuchi A, Bonkobara M, Kobayashi T, Ohno K, Uchida K, Asano K, Nishimura R, Nakayama H, Sugano S, Ohashi Y, Tsujimoto H (2013) Validation of the prognostic value of histopathological grading or *c-kit* mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A retrospective cohort study. The Veterinary Journal 196:492–498. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.11.018>
79. London CA, Galli SJ, Yuuki T, Hu Z-Q, Helfand SC, Geissler EN (1999) Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene *c-kit*. Experimental Hematology 27:689–697. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(98\)00075-7](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(98)00075-7)
80. Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V (2002) Mutations in the Juxtamembrane Domain of c-KIT Are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs. Vet Pathol 39:529–535. <https://doi.org/10.1354/vp.39-5-529>
81. Ma Y, Jack Longley B, Wang X, Blount JL, Langley K, Caughey GH (1999) Clustering of Activating Mutations in *c-KIT*'s Juxtamembrane Coding Region in Canine Mast Cell Neoplasms. Journal of Investigative Dermatology 112:165–170. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00488.x>
82. Downing S, Chien MB, Kass PH, Moore PF, London CA (2002) Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of *c-kit* in mast cell tumors of dogs. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.1718>

83. Webster JD, Kiupel M, Yuzbasiyan-Gurkan V (2006) Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer* 6:85. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-85>
84. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, Miller R, Resau JH, Kiupel M (2006) The Role of *c-KIT* in Tumorigenesis: Evaluation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Neoplasia* 8:104–111. <https://doi.org/10.1593/neo.05622>
85. Letard S, Yang Y, Hanssens K, Palmérini F, Leventhal PS, Guéry S, Moussy A, Kinet J-P, Hermine O, Dubreuil P (2008) Gain-of-Function Mutations in the Extracellular Domain of KIT Are Common in Canine Mast Cell Tumors. *Molecular Cancer Research* 6:1137–1145. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0067>
86. London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, Boucher JF, Rusk AW, Rosenberg MP, Henry CJ, Mitchener KL, Klein MK, Hintermeister JG, Bergman PJ, Couto GC, Mauldin GN, Michels GM (2009) Multi-center, Placebo-controlled, Double-blind, Randomized Study of Oral Toseranib Phosphate (SU11654), a Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, for the Treatment of Dogs with Recurrent (Either Local or Distant) Mast Cell Tumor Following Surgical Excision. *Clinical Cancer Research* 15:3856–3865. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1860>
87. Yoda A, Adelmant G, Tamburini J, Chapuy B, Shindoh N, Yoda Y, Weigert O, Kopp N, Wu S-C, Kim SS, Liu H, Tivey T, Christie AL, Elpek KG, Card J, Gritsman K, Gotlib J, Deininger MW, Makishima H, Turley SJ, Javidi-Sharifi N, Maciejewski JP, Jaiswal S, Ebert BL, Rodig SJ, Tyner JW, Marto JA, Weinstock DM, Lane AA (2015) Mutations in G protein β subunits promote transformation and kinase inhibitor resistance. *Nat Med* 21:71–75. <https://doi.org/10.1038/nm.3751>
88. Mochizuki H, Thomas R, Moroff S, Breen M (2017) Genomic profiling of canine mast cell tumors identifies DNA copy number aberrations associated with KIT mutations and high histological grade. *Chromosome Res* 25:129–143. <https://doi.org/10.1007/s10577-016-9543-7>
89. Tamlin VS, Bottema CDK, Peaston AE (2020) Comparative aspects of mast cell neoplasia in animals and the role of KIT in prognosis and treatment. *Veterinary Medicine and Science* 6:3–18. <https://doi.org/10.1002/vms3.201>
90. Vozdova M, Kubickova S, Fictum P, Fröhlich J, Jelinek F, Rubes J (2019) Prevalence and prognostic value of c-kit and TP53 mutations in canine mast cell tumours. *The Veterinary Journal* 247:71–74. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.03.005>
91. Brocks BAW, Bertram CA, Bartel A, Kirpensteijn J, Collins-Webb A, Catlin C, Thaiwong T, Kiupel M (2021) Internal Tandem Duplication of Exon 8 of c-kit Is Associated With Longer Total Survival in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol* 58:315–324. <https://doi.org/10.1177/0300985820973463>
92. Kanaya N, Okuda M, Toyama N, Oikawa T, Inokuma H, Morimoto M, Hayashi T, Une S, Nakaichi M, Taura Y, Tsujimoto H, Onishi T (2002) Detection of the Anti-P53 Antibodies in Dogs with Tumors. *Journal of Veterinary Medical Science* 64:973–979. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.973>

93. Zorzan E, Hanssens K, Giantin M, Dacasto M, Dubreuil P (2015) Mutational Hotspot of TET2, IDH1, IDH2, SRSF2, SF3B1, KRAS, and NRAS from Human Systemic Mastocytosis Are Not Conserved in Canine Mast Cell Tumors. *PLOS ONE* 10:e0142450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142450>
94. Musser M, Berger E, Flaherty HA, Fox L, Johannes CM (2018) Marked paraneoplastic hypereosinophilia associated with a low-grade, metastatic canine mast cell tumour. *Veterinary Record Case Reports* 6:e000563. <https://doi.org/10.1136/vetreccr-2017-000563>
95. Dank G (2016) Review of the Treatment of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 71:3–9. <https://www.ijvm.org.il/sites/default/files/dank.pdf> Access 04 October 2024
96. Scarpa F, Sabattini S, Marconato L, Capitani O, Morini M, Bettini G (2012) Use of histologic margin evaluation to predict recurrence of cutaneous malignant tumors in dogs and cats after surgical excision. <https://doi.org/10.2460/javma.240.10.1181>
97. Stanclift RM, Gilson SD (2008) Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors in dogs. <https://doi.org/10.2460/javma.232.1.53>
98. Davies DR, Wyatt KM, Jardine JE, Robertson ID, Irwin PJ (2004) Vinblastine and Prednisolone as Adjunctive Therapy for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association* 40:124–130. <https://doi.org/10.5326/0400124>
99. Hosoya K, Kisseberth WC, Alvarez FJ, Lara-Garcia A, Beamer G, Stromberg PC, Couto CG (2009) Adjuvant CCNU (Lomustine) and Prednisone Chemotherapy for Dogs With Incompletely Excised Grade 2 Mast Cell Tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association* 45:14–18. <https://doi.org/10.5326/0450014>
100. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M (2007) Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication. *Vet Pathol* 44:298–308. <https://doi.org/10.1354/vp.44-3-298>
101. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100:57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
102. Scase TJ, Edwards D, Miller J, Henley W, Smith K, Blunden A, Murphy S (2006) Canine Mast Cell Tumors: Correlation of Apoptosis and Proliferation Markers with Prognosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20:151–158. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2006.tb02835.x>
103. Séguin B, Besancon MF, McCallan JL, Dewe LL, Tenwolde MC, Wong EK, Kent MS (2006) Recurrence Rate, Clinical Outcome, and Cellular Proliferation: Indices as Prognostic Indicators after Incomplete Surgical Excision of Cutaneous Grade II Mast Cell Tumors: 28 Dogs (1994–2002). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20:933–940. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2006.tb01808.x>
104. Romansik EM, Reilly CM, Kass PH, Moore PF, London CA (2007) Mitotic Index Is Predictive for Survival for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol* 44:335–341. <https://doi.org/10.1354/vp.44-3-335>

105. Diest PJ van, Brugal G, Baak JP (1998) Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *Journal of Clinical Pathology* 51:716–724. <https://doi.org/10.1136/jcp.51.10.716>
106. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D (2000) The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron* 31:121–126. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00068-2](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00068-2)
107. Bostock D, Crocker J, Harris K, Smith P (1989) Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *Br J Cancer* 59:915–918. <https://doi.org/10.1038/bjc.1989.193>
108. Derenzini M (2000) The AgNORs. *Micron* 31:117–120. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00067-0](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00067-0)
109. Smith R, Crocker J (1988) Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy. *Histopathology* 12:113–125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1988.tb01923.x>
110. Derenzini M, Pession A, Trerè D (1990) Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab Invest* 63:137–140. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1695695/> Access 04 October 2024
111. Öfner D, Hittmair A, Marth C, Öfner C, Totsch M, Daxenbichler G, Mikuz G, Margreiter R, Schmid KW (1992) Relationship Between Quantity of Silver Stained Nucleolar Organizer Regions Associated Proteins (Ag-NORs) and Population Doubling Time in Ten Breast Cancer Cell Lines. *Pathology - Research and Practice* 188:742–746. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(11\)80171-8](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(11)80171-8)
112. Trerè D, Pession A, Derenzini M (1989) The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Experimental Cell Research* 184:131–137. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(89\)90371-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(89)90371-6)
113. Ogura S, Abe S, Sukoh N, Kunikane H, Nakajima I, Kawakami Y, Inoue K (1992) Correlation between nucleolar organizer regions visualized by silver staining and the growth rate in lung adenocarcinoma. *Cancer* 70:63–68. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19920701\)70:1<63::AID-CNCR2820700111>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19920701)70:1<63::AID-CNCR2820700111>3.0.CO;2-V)
114. Trerè D, Gramantieri L, Siringo S, Melchiorri C, Barbara L, Bolondi L, Derenzini M (1996) In hepatocellular carcinoma AgNOR protein expression correlates with tumour mass doubling time. *Journal of Hepatology* 24:60–65. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(96\)80187-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(96)80187-5)
115. Crocker J, Nar P (1987) Nucleolar organizer regions in lymphomas. *The Journal of Pathology* 151:111–118. <https://doi.org/10.1002/path.1711510203>
116. Crocker J, Skilbeck N (1987) Nucleolar organiser region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *Journal of Clinical Pathology* 40:885–889. <https://doi.org/10.1136/jcp.40.8.885>
117. Derenzini M, Romagnoli T, Mingazzini P, Marinozzi V (1987) Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from

malignant epithelial tumors of human intestine. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 54:334–340. <https://doi.org/10.1007/BF02899231>

118. Simoes JPC, Schoning P, Butine M (1994) Prognosis of Canine Mast Cell Tumors: A Comparison of Three Methods. *Vet Pathol* 31:637–647. <https://doi.org/10.1177/030098589403100602>
119. Scarpa F, Sabattini S, Bettini G (2016) Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comparative Oncology* 14:245–251. <https://doi.org/10.1111/vco.12090>

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Vajdovich Péternek a közös munkát, a rengeteg segítséget és támogatást.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a tanszék munkatársainak. Külön köszönöm Dr. Berta Annának, aki a minták feldolgozásában, és a dolgozat elkészítésében is segített.

Köszönet illeti az ÁHOK csapatát a segítségükért és együttműködésükért.

Hálás vagyok közeli hozzátartozóim támogatásáért, türelméért is.