

Neue diagnostische Aspekte bei kaninen Mastzelltumoren – Ein Überblick zur aktuellen Studienlage

Heike Aupperle, A. Kehl, T. Irrgang, C. Laik, G. Loesenbeck

Mastzelltumoren (MCT) gehören zu den häufigsten Hauttumoren des Hundes. Sie können solitär oder multipel vorkommen und zeigen klinisch sehr unterschiedliche Erscheinungsformen. Der folgende Artikel stellt einige aktuelle Studien zum Thema vor und erläutert ein neues zweistufiges Graduierungssystem.

Während die Zytologie meist nur der Diagnose eines Mastzelltumors (● Abb. 1) dient, können histologische und immunhistologische Untersuchungen (c-Kit, Ki-67 Antigen) sowie genetische Analysen zur genaueren Charakterisierung und prognostischen Beurteilung beitragen (Welle et al. 2007). Im letzten Jahr hat es hierzu neue Studien gegeben, deren Inhalte und Ergebnisse im Folgenden vorgestellt werden sollen.

Neues histologisches Graduierungssystem nach Kiupel et al. (2010)

Bislang erfolgt eine histologische Einteilung der Mastzelltumoren nach Patnaik et al. (1984) in 3 Grade (● Abb. 2):

- **Grad I:** Es handelt sich um eine gut differenzierte Tumorzellpopulation, die geringe Zellvariationen aufweist und deren Zytoplasma deutlich granuliert ist. Diese Tumoren sind meist auf die Dermis beschränkt.
- **Grad II:** Hier ist die Differenzierung weniger gut. Die Variationen sind ausgeprägter, die Granulierung des Zytoplasmas undeutlicher, und es finden sich einige Mitosen und vereinzelte mehrkernige Zellen. Auch tiefere Gewebeschichten können infiltriert sein.
- **Grad III:** Bei dieser Gruppe handelt es sich um schlecht differenzierte Tumoren, bei denen der histogenetische Ursprung von Mastzellen teils nur mittels Spezialfärbungen (z. B. Giemsa, Toluidinblau) erkennbar ist. Es finden sich sehr variable Zellformen und Kernpolymorphismen sowie multiple Mitosen.

Dabei gehen Mastzelltumoren Grad I mit einer guten Prognose (Mortalität 10%) und MCT Grad III mit einer schlechten Prognose (Mortalität 80%) einher, während MCT

Grad II sich variabel (Mortalität 20–50%) verhalten können (Beobachtungszeitraum 4,5 Jahre; Bostock 1986).

Aktuell (Kiupel et al., 2011,48:147-155, Vet.Pathol.) wird nur noch eine zweistufige Graduierung in gut differenzierte (**low-grade malignancy**) und schlecht differenzierte (**high-grade malignancy**) Tumoren vorgenommen.

Die Eingruppierung in „high-grade malignancy“ erfolgt, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien zutrifft:

- ≥ 7 Mitosen in 10 Gesichtsfeldern bei 40er Vergrößerung (HPF)
- ≥ 3 mehrkernige Tumorzellen
- ≥ 3 Tumorzellen mit bizarren Zellkernen
- Karyomegalie bei $\geq 10\%$ der Tumorzellen

Die **mediane Überlebenszeit** für gut differenzierte Mastzelltumoren wird mit 2 Jahren und die für schlecht differenzierte Mastzelltumoren mit 4 Monaten angegeben.

Aufgrund dieser sehr präzisen Kriterien ist eine objektivere Diagnostik möglich. Schlecht differenzierte Mastzelltumoren

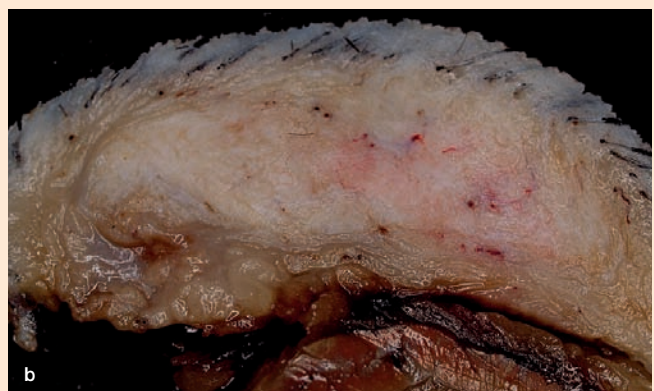
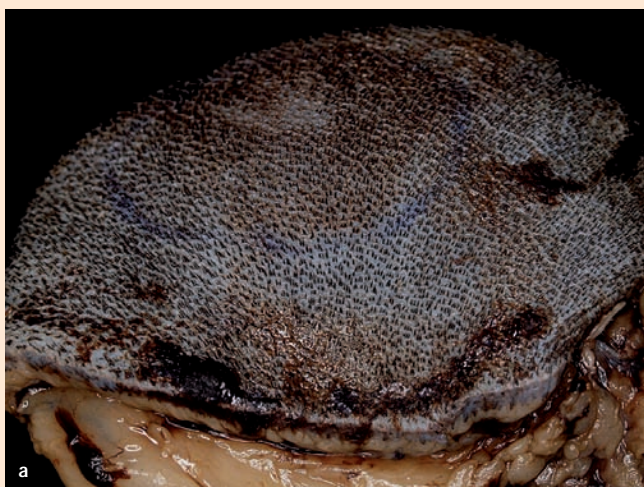


Abb. 1 Mastzelltumor eines 9-jährigen Hundes: Tumorexstirpation mit großzügigen Resektionsgrenzen (a); speckige weiße Schnittfläche des abgegrenzten Tumors in der Dermis (b). © Dr. Heike Aupperle.

können zudem mittels immunhistologischer Untersuchungen (c-Kit, Ki-67 Antigen) weiter charakterisiert werden (s.u.).

Unterschiede zwischen solitären und multiplen Mastzelltumoren

Das Ziel der eigenen Untersuchung war, herauszufinden, ob und inwieweit sich die Charakteristika solitärer Mastzelltumoren von den Fällen unterscheiden, bei denen 2 oder mehr Mastzelltumoren von einem Tier gleichzeitig eingesandt wurden.

Es wurden 265 solitäre MCT sowie multiple MCT (n = 65) von 30 Hunden aus den Routineeingsendungen ausgewählt. Diese wurden histologisch und immunhistologisch (c-Kit: n = 124, Ki-67 Antigen: n = 80) untersucht.

Entsprechend den Literaturangaben (Welle et al. 2007) fanden wir Mastzelltumoren in beiden Gruppen besonders häufig bei folgenden **Rassen**:

- Golden/Labrador Retriever (n = 68)
- Terrier (n = 31)
- Boxer (n = 24)

Es fand sich keine **Geschlechtsdisposition**; das mittlere **Alter** lag bei $8 \pm 2,9$ Jahren.

Die typischen Lokalisationen waren Gliedmaßen, Rücken und Kopf. Allerdings kamen in unserer Studie solitäre Mastzelltumoren signifikant häufiger an den Gliedmaßen vor als multiple Mastzelltumoren ($p = 0,004$).

Bei der Analyse der **Tumorgößen** fiel auf, dass solitäre MCT signifikant größer waren als multiple Mastzelltumoren ($p = 0,001$). Die multiplen Tumoren waren in

69% der Fälle < 2 cm, während 63% der solitären MCT > 2 cm waren. Die Ursache für diese Unterschiede könnte darin liegen, dass für den Besitzer die Multiplizität der Umfangsvermehrungen in diesen Fällen für die Entscheidung zur chirurgischen Exzision wichtiger ist, als die Größe bei einer solitären Umfangsvermehrung.

Da zum Zeitpunkt der eigenen Untersuchungen das zweistufige **histologische Graduierungssystem** von Kiupel et al. (2011) noch nicht erschienen war und um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu ermöglichen, wurden die Mastzelltumoren noch nach der dreistufigen Graduierung von Patnaik et al. (1984) eingeteilt. Es konnte festgestellt werden, dass bei multiplen Mastzelltumoren der Grad III relativ häufiger vorkam als bei solitären

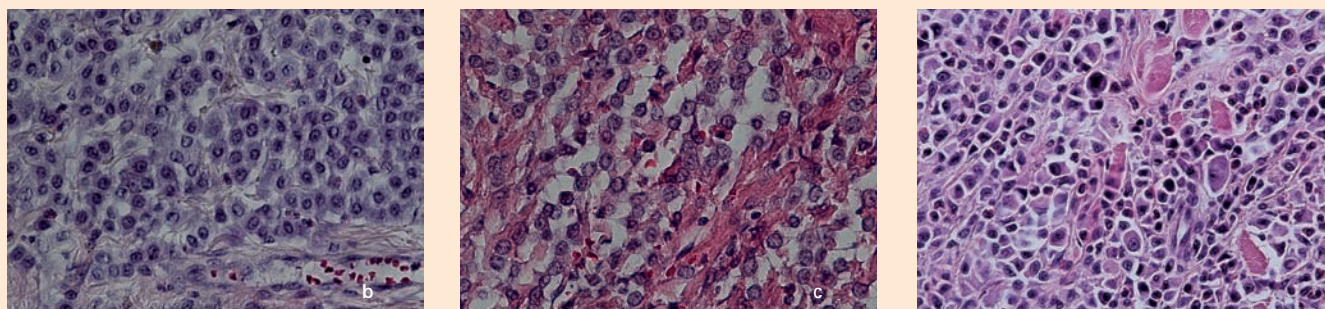


Abb. 2 Histologische Grade I-III nach Patnaik et al. (1984): Gut differenzierter Mastzelltumor Grad I (a); mäßige Differenzierung der Tumorzellen Grad II, Infiltration mit eosinophilen Granulozyten (b); schlecht differenzierter Mastzelltumor Grad III mit pleomorphen Tumorzellen, atypischen Kernformationen und zahlreichen Mitosen (c). © Dr. Heike Aupperle.

Mastzelltumoren. Interessant ist dabei, dass die verschiedenen Mastzelltumoren an einem Tier i. d. R. den gleichen histologischen Grad aufwiesen. Nur bei 5 von 30 Hunden fanden sich Mastzelltumoren von Grad I und Grad II am gleichen Tier.

Der **c-Kit-Rezeptor** ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor Typ III, der auch CD117 genannt wird. Er kommt in verschiedenen Geweben physiologischerweise vor, wie etwa in hämatopoetischen Stammzellen, epithelialen Geweben, Melanozyten sowie in Hoden und Ovarien und in Teilen des Gehirns (Morini et al. 2004). Eine c-Kit-Expression wurde dementsprechend auch bei den Tumoren, die aus diesen Geweben hervorgehen, nachgewiesen.

Eine Besonderheit bei den Mastzelltumoren ist, dass unterschiedliche **c-Kit-Expressionsmuster** mittels der Immunhistologie dargestellt werden können (da Costa et al. 2007). Dieses Phänomen ist auch bei Mastzelltumoren der Katze (Rodriguez-Carino et al. 2009) zu beobachten.

Immunhistologisch ist die c-Kit-Expression in normalen Mastzellen als perimembranöses Muster 1 darstellbar. In einem Teil der Mastzelltumoren kann man zwei von dem Normalbild abweichende pathologische Expressionsmuster beobachten (● Abb. 3): c-Kit-Muster 2 ist gekennzeichnet durch eine stippchenartige Akkumulation im perinukleären Bereich, der vermutlich dem Golgi-Apparat entspricht. Als c-Kit-Muster 3 wird ein Bild bezeichnet, bei dem eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas der Mastzellen auftritt (da Costa et al. 2007).

Aus der Literatur ist bekannt, dass es eine Korrelation des histologischen Grades mit dem c-Kit-Expressionsmuster gibt,

d.h., je schlechter ein Mastzelltumor histologisch differenziert ist, desto eher tritt ein atypisches Expressionsmuster auf (Preziosi et al. 2004).

Bislang ist aber unklar, wie diese Expressionsmuster zustande kommen und welche tatsächliche funktionelle Bedeutung diesen morphologischen Bildern zukommt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Nachweis eines atypischen c-Kit-Expressionsmusters mit einer schlechteren Prognose einhergeht (c-Kit 1: Mortalität 14,3 %, c-Kit 2: Mortalität 39,5 %, c-Kit 3: Mortalität 38,5 %; Kiupel et al. 2004).

Kritisch muss angemerkt werden, dass nicht alle Zellen eines Mastzelltumors unbedingt das gleiche Muster aufweisen. Hier entscheidet der Pathologe, welches Expressionsmuster überwiegt und für den Tumor repräsentativ erscheint.

In der eigenen Studie fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den solitären und den multiplen Mastzelltumoren. Die multiplen Mastzelltumoren Grad I zeigten fast immer (88,2 %) ein physiologisches c-Kit-Muster 1 auf (solitäre MCT nur 54,3%, $p = 0,016$). Außerdem wiesen multiple Mastzelltumoren Grad III fast immer (81,8%) c-Kit-Muster 3 auf (solitäre MCT nur 27 %, $p = 0,005$).

Entsprechend dem klinischen Stagingssystem der WHO und den Untersuchungen von Kiupel et al. (2005) sollen multiple Mastzelltumoren (Stadium 3) eine schlechtere Prognose haben. Mehrere andere Studien fanden aber keine Unterschiede in den Überlebenszeiten zwischen solitären und multiplen MCT (Murphy et al. 2006, Mullins et al. 2006, Romansik et al. 2007). In all diesen Studien wurden die histologischen Grade der Mastzelltumoren aber

nicht in die Untersuchungen mit einbezogen.

Basierend auf den Ergebnissen der eigenen Studie kann vermutet werden, dass die multiplen Mastzelltumoren Grad I trotz ihrer Multiplizität häufig besser differenziert sind (88,2 % c-Kit 1) als solitäre Mastzelltumoren.

Im Gegensatz dazu kommen aber Tumoren Grad III bei den multiplen Mastzelltumoren häufiger vor, als bei den solitären MCT, und sie sind im Vergleich zu den solitären MCT Grad III offenbar deutlich schlechter differenziert (81,8% c-Kit 3).

Es ist daher nicht auszuschließen, dass die relativ häufiger vorkommenden und schlechter differenzierten Mastzelltumoren Grad III eine Statistik, die die histologischen Grade nicht berücksichtigt, verfälschen. Dies bedeutet, dass möglicherweise ein Umdenken bzw. ein differenzierteres Staging und Grading bei multiplen Mastzelltumoren notwendig ist, um die Prognose fallbezogener einschätzen zu können.

Die **Proliferationsaktivität** innerhalb eines Mastzelltumors kann auf verschiedene Arten ermittelt werden:

- Zum einen kann man die Anzahl der **Mitosenzählen**. Hier gelten > 5 Mitosen je Gesichtsfeld als prognostisch ungünstiger (Romansik et al. 2007).
- Das **Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)** wird nicht nur während der Mitose, sondern auch im Rahmen von Reparatursprozessen exprimiert. Für die PCNA-Expression konnte bislang keine signifikante prognostische Relevanz ermittelt

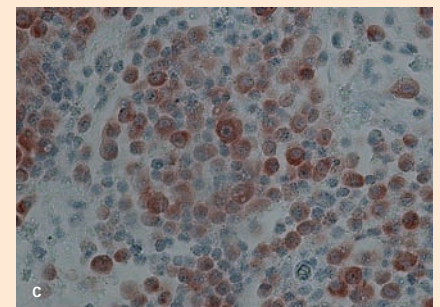
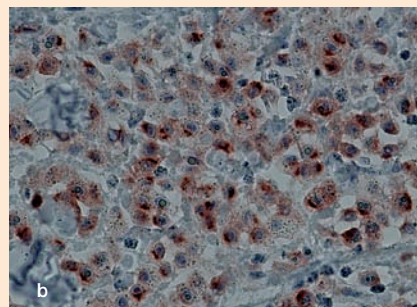
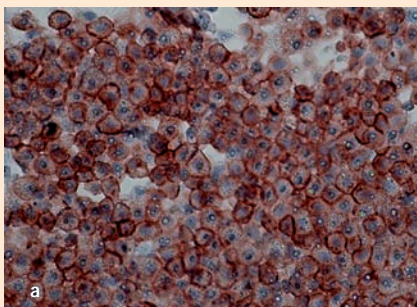


Abb. 3 Immunhistologische Expressionsmuster des c-Kit-Rezeptors: normales, perimembranöses c-Kit-Muster 1 (a); atypisches, „stippchenartiges“ c-Kit-Muster 2 (b); atypisches, diffuses c-Kit-Muster 3 (c). © Dr. Heike Aupperle.

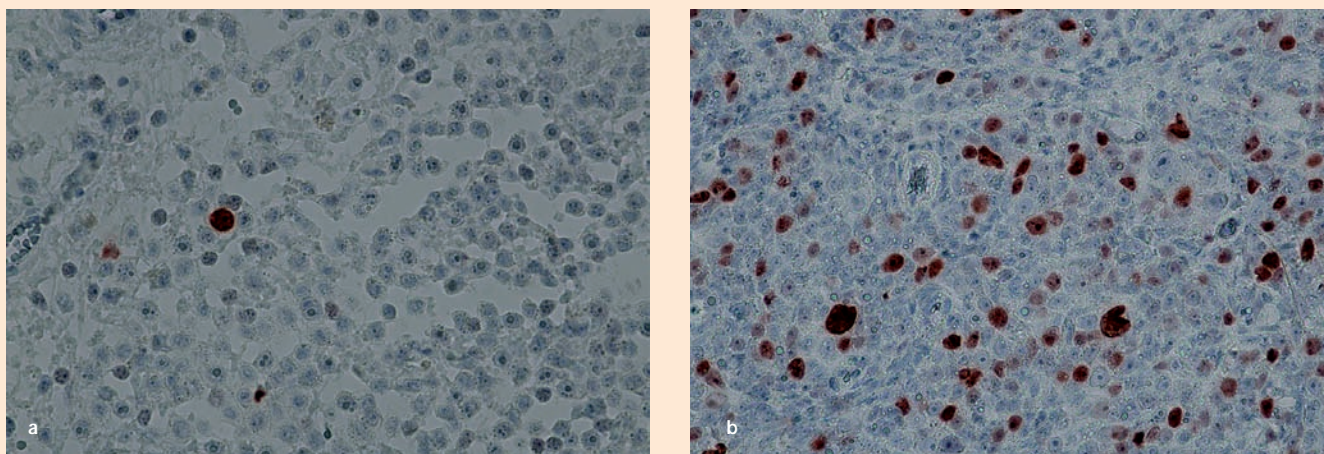


Abb. 4 Expression von Ki-67 Antigen in Mastzelltumoren: geringe Proliferationsaktivität (a); hohe Proliferationsaktivität (b). © Dr. Heike Aupperle.

werden (Romansik et al. 2007, Webster et al. 2007).

- Mittels einer Versilberungsmethode können die sog. **Nuclear Organizer regions (AgIMORs)** markiert werden, in denen ribosomale RNA kodiert ist. Sie sind Ausdruck der Transkriptionsaktivität und korrelieren mit der Proliferationsaktivität. Hier wurde ein Grenzwert von 4 AgNORs/Kern festgestellt (Bostock et al. 1989, Webster et al. 2007).

Ki-67 Antigen ist ein nukleäres Protein, das sehr eng mit den Mitosephasen assoziiert ist. Es wird ausschließlich während der Zellteilung, nicht aber im Rahmen von Reparaturvorgängen exprimiert. Die Ki-67 Antigen-Expression korreliert mit dem histologischen Grad der Mastzelltumoren (Romansik et al. 2007). Die Prognose bei mehr als 23 positiven Zellen je 1 cm² ist schlechter (med. Überlebenszeit < 24 Monate) als bei einem MCT mit geringerer Prolife-

rationsaktivität (med. Überlebenszeit > 24 Monate) (Webster et al. 2007).

Die immunhistologische Bestimmung der Ki-67 Antigen-Expression hat sich mittlerweile aufgrund der besten Durchführbarkeit und Aussagekraft in der Routine durchgesetzt (● **Abb. 4**). Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass sowohl bei den solitären als auch bei den multiplen Mastzelltumoren etwa die Hälfte der Fälle eine erhöhte Ki-67 Antigen-Expression aufwies. In beiden Gruppen war der Anteil der Tumoren mit einer hohen Proliferationsaktivität bei schlechter differenzierteren Mastzelltumoren (Grad II und III) signifikant erhöht.

Zum Vorkommen von Mutationen des c-Kit-Rezeptors in Deutschland

Mutationen des c-Kit-Rezeptors haben unterschiedliche Folgen, da diese entweder eine Hemmung („loss of function“) oder

eine Verstärkung („gain of function“) der Rezeptorwirkung zur Folge haben, die zu Pigmentierungsstörungen, Sterilität oder Mastozytose, myeloischen Leukämien und Anämien auf der einen Seite und Mastozytose, myeloischen Leukämien und Anämien auf der anderen Seite führen können (Konieczny 2003, Fridrich 2004).

Beim Menschen wurde festgestellt, dass der überwiegende Teil aller erwachsenen Patienten mit Mastozytose innerhalb des c-Kit-Gens eine somatische KIT-Mutation in dem Exon 17 trägt. Der Aminosäureaustausch führt dann zu einer Konformationsänderung des aktiven Zentrums der Tyrosinkinase. Daraus resultiert eine Autostimulation, die eine ligandenunabhängige Mastzellproliferation induziert (Fridrich 2004).

Beim Hund wurden mittlerweile Punktmutationen, Deletionen und Duplikationen auf dem Exon 11 (London 1999, Ma 1999, Riva 2005, Webster et al. 2006, Zemke 2002) sowie den Exons 8 und 9 (Letard et al. 2008) nachgewiesen. Allerdings konnten keine Mutationen in den Exons 16 bis

20 nachgewiesen werden, die für die Phospho-Transferase Domäne kodieren und die beim Menschen die Mastzellproliferation auslösen (Webster et al. 2007).

In einigen amerikanischen Studien an kaninen Mastzelltumoren wurde eine Korrelation zwischen dem histologischen Grad und der Häufigkeit der Mutationen festgestellt. Mutationen der Exons 11/12 fanden sich in 0-8% der Mastzelltumoren Grad I, in 13-35 % der Grad-II- und in 33-66 % der Grad-III-Tumoren (Downing et al. 2002, Zemke et al. 2002).

Der Nachweis von Mutationen korreliert mit dem immunhistologischen c-Kit-Expressionsmuster. Mutationen wurden am häufigsten bei Fällen mit c-Kit-Muster 3 und nur selten bei c-Kit-Muster 1 gefunden (Webster et al. 2006). Bei Vorliegen einer Mutation soll die Prognose kaniner Mastzelltumoren schlechter sein als bei Fällen ohne Mutation (Webster et al. 2006).

Die Tatsache, dass Mutationen auch bei Fällen mit c-Kit-Muster 1 gefunden wurden, zeigt aber, dass die Zusammenhänge zwischen Mutationen, immunhistologischem Expressionsmuster und Tumorentstehung noch nicht vollständig verstanden sind. Daher basiert der Einsatz der Tyrosinkinase-Inhibitoren bei kaninen Mastzelltumoren zurzeit eher auf der Lokalisation, dem klinischen Verlauf und dem histologischen Grad als auf dem Nachweis von Mutationen oder c-Kit-Expressionsmustern (Kessler 2010).

Eigene Untersuchungen

Die eigenen molekulargenetischen Untersuchungen hatten das Ziel, eben diese Korrelation von histologischem Grad, Immunhistologie und Mutationen zu untersuchen und zu analysieren, ob und inwieweit diese Mutationen zwischen solitären und multiplen Mastzelltumoren variieren. Wie auch in der Literatur beschrieben, wurde die DNA aus dem paraffin-eingebetteten Material isoliert und die entsprechenden Genabschnitte sequenziert und ausgewertet.

Zu unserer großen Überraschung war bei den 65 untersuchten Hunden nur ein positiver Fall mit einer Duplikation im Exon 11 dabei. Es handelt sich dabei um einen solitären Mastzelltumor Grad III von einem 7-jährigen Labrador.

Bei keinem der übrigen untersuchten solitären (n = 38) und multiplen (n = 27) Mastzelltumoren war eine biologisch relevante Mutation nachweisbar.

Lediglich zahlreiche stumme „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) in den Introns 10 und 11 und den Exons 8 und 11 wurden identifiziert, die auch in der Literatur beschrieben sind (Zemke et al. 2002). Dies zeigt eindeutig, dass nicht methodische Fehler die Ursache für die geringe Anzahl identifizierter Mutationen sind. Da es bislang nur aus den USA Studien gibt, die hinsichtlich der Auswahl von Patientengut und Methodik der eigenen Studie vergleichbar sind, könnte spekuliert werden, ob und inwieweit möglicherweise genetische Unterschiede zwischen den Populationen in den USA und Deutschland für diese Unterschiede verantwortlich sind.

Fazit

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das aktualisierte histologische Graduierungssystem (Kiupel et al. 2011) und die immunhistologische Charakterisierung des c-Kit-Rezeptors und der Ki-67 Antigen-Expression zur präzisierenden Einschätzung der Prognose von Mastzelltumoren beitragen.

Insbesondere bei multiplen Mastzelltumoren erscheint die immunhistologische Untersuchung sinnvoll, auch wenn aktuell noch keine präzisierenden Angaben zu den korrelierenden Überlebenszeiten vorliegen. Hierzu sind umfangreiche weitere Untersuchungen notwendig.

Molekularbiologische Untersuchungen zur Identifikation einer c-Kit-Rezeptor-Mutation in kaninen Mastzelltumoren scheinen in dem von uns untersuchten Tiergut hingegen keine diagnostische Bedeutung zu haben. ●

Online zu finden unter

<http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1275551>

Literatur

Literatur bei den Autoren.

PD Dr. Heike Aupperle (für die Autoren)
Laboklin GmbH & Co KG
Steubenstr. 4 • 97688 Bad Kissingen
E-Mail: aupperle@laboklin.de