

**Aus dem Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Wie unabhängig ist die Proliferationsaktivität  
kaniner Tumorzellen?**

**Assoziation des mittels digitaler Bildanalytik  
erhobenen Ki67-Labeling Index ausgewählter  
Hundetumore mit individuellen Patienten- sowie  
Tumorparametern**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von  
**Theresa Catharina Brömel, geb. Firsching**  
Tierärztin aus Fürstfeldbruck

Berlin 2023  
Journal-Nr.: 4394







Aus dem Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

---

**Wie unabhängig ist die Proliferationsaktivität kaniner Tumorzellen?**

**Assoziation des mittels digitaler Bildanalytik erhobenen Ki67-  
Labelling Index ausgewählter Hundetumore mit individuellen  
Patienten- sowie Tumorparametern**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Theresa Catharina Brömel, geb. Firsching**  
Tierärztin aus Fürstfeldbruck

**Berlin 2023**  
Journal-Nr.: 4394

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Betreuung: Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D.(Cornell Univ.)  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D.(Cornell Univ.)  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

age, cell proliferation, diagnostic techniques, dog breed, dogs, image analysis, image processing, neoplasm, sex, tumour cells

Tag der Promotion: 17.04.2023

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-207-7

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2023**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2023 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Für Philip*





# Inhalt

---

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
2.1 Zellzyklus und Mitose .....	3
2.2 Quantifizierung von Mitose und Zellproliferation .....	4
2.2.1 Klassische Mitoseindexe am HE-gefärbten Schnittpräparat .....	4
2.2.2 Immunhistochemische Detektion und AgNOR.....	6
2.2.3 Automatisierte digitale Systeme .....	8
2.2.3.1 Computergestützte Mitosenzählung .....	8
2.2.3.2 Digitale Bildanalyse immunhistochemisch markierter Gewebe .....	9
2.3 Zellteilung in der Veterinärpathologie .....	10
2.3.1 Proliferation als Malignitätskriterium .....	10
2.3.2 Beispiele relevanter Grading-Systeme .....	12
2.4 Proliferation in Abhängigkeit patientenbezogener Parameter in der Human- und Tiermedizin .....	15
2.4.1 Patientenalter .....	15
2.4.1.1 Gesunde Gewebe .....	15
2.4.1.2 Zellkulturen .....	15
2.4.1.3 Neoplasien .....	16
2.4.2 Geschlecht.....	17
2.4.3 Rasse.....	17
2.5 Einfluss der Probenprozessierung auf die Proliferation .....	17
2.6 Ausgewählte kanine Tumoren .....	18
2.6.1 Kutaner Mastzelltumor .....	18
2.6.2 Kanines kutanes Weichgewebssarkom .....	19

2.6.3	Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen .....	19
2.6.4	Plasmozytom .....	20
2.6.5	Trichoblastom .....	21
2.6.6	Leydigzelltumor .....	22
2.6.7	Sertolizelltumor .....	22
<b>3</b>	<b>Arbeitshypothese, Ziele und Versuchsplanung .....</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
4.1	Tumorauswahl.....	25
4.1.1	Einschlusskriterien .....	26
4.1.2	Ausschlusskriterien .....	26
4.2	Patienten- und Tumordaten.....	26
4.2.1	Alter, Geschlecht und Kastrationsstatus.....	26
4.2.2	Körpergewicht und -größe.....	26
4.2.3	Tumorgröße .....	27
4.2.4	Tumorlokalisierung .....	27
4.2.5	Resektionsrand .....	29
4.3	Immunhistochemie .....	29
4.3.1	Histologische Präparation .....	29
4.3.2	Die Antikörper .....	29
4.3.3	Immunhistochemische Markierung gegen Ki67 .....	30
4.3.4	Versuch der Färbung und Markierung von eosinophilen Granulozyten sowie Mastzellen in Mastzelltumoren .....	34
4.4	Zellkernzählung.....	37
4.4.1	Digitalisierung der immunhistochemischen Schnittpräparate.....	37
4.4.2	Software und Analyse der digitalisierten Schnittpräparate.....	38
4.4.3	Zellkernzählung in Mastzelltumoren .....	40
4.5	Statistik .....	40
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
5.1	Studienpopulation .....	42

---

5.2	Ki67-labelling index und Patientenalter.....	46
5.2.1	Assoziation des Ki67-labelling index mit dem Patientenalter, ohne Berücksichtigung des Geschlechts.....	46
5.2.2	Assoziation des Ki67-labelling index mit dem Patientenalter, mit Berücksichtigung des Geschlechts.....	49
5.3	Assoziation des Ki67-labelling index mit dem Geschlecht und Kastrationsstatus .....	53
5.4	Assoziation des Ki67-labelling index mit Körpergewicht und –größe .....	58
5.5	Ki67-labelling index und Tumorcharakteristika .....	61
5.5.1	Assoziation des Ki67-labelling index mit der Tumorgöße .....	61
5.5.2	Assoziation des Ki67-labelling Index mit der Tumorlokalisation.....	64
5.6	Resektionsränder unterschiedlicher Tumorarten .....	66
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>68</b>
6.1	Patienteneigenschaften und Tumorproliferation – besteht ein Zusammenhang?.....	70
6.1.1	Alter .....	70
6.1.2	Geschlecht.....	71
6.1.3	Körpergewicht und Körpergröße .....	72
6.2	Mit welchen Parametern des Tumors selbst ist die Proliferation assoziiert? .....	73
6.3	Assoziation der Proliferation mit Tumorgraden maligner Tumoren .....	74
6.4	Zusammenhänge zwischen Breite des Resektionsrands und Tumorart.....	75
6.5	Methodenkritik.....	76
6.6	Fazit zur Frage: Besteht die Notwendigkeit zur Berücksichtigung von patienten- oder tumorbezogenen Parametern in der Diagnostik?.....	77
6.7	Ausblick auf mögliche anschließende Untersuchungen .....	79
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Summary.....</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>99</b>
<b>11</b>	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>119</b>

<b>Danksagungen.....</b>	<b>120</b>
<b>Finanzierungsquellen und Interessenskonflikte .....</b>	<b>121</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>122</b>

# Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: Phasen des Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle.....	3
Abbildung 2: Immunhistochemische und histologische Detektion der Proliferation bzw. Mitose während des Zellzyklus .....	8
Abbildung 3: Kennzeichen von Krebs.....	10
Abbildung 4: Kutaner Mastzelltumor, Hund, HE.....	18
Abbildung 5: Weichgewebssarkom, Hund, HE .....	19
Abbildung 6: Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen, Hund, HE.....	20
Abbildung 7: Plasmozytom, Hund, HE.....	21
Abbildung 8: Trichoblastom, Hund, HE.....	21
Abbildung 9: Leydigzelltumor, Hund, HE .....	22
Abbildung 10: Sertolizelltumor, Hund, HE.....	23
Abbildung 11: Kategorisierung der anatomischen Tumorlokalisationen .....	28
Abbildung 12: Messung und Berechnung des Resektionsrandes. ....	29
Abbildung 13: Mastzelltumor, Hund, Immunhistochemie gegen Ki67.....	34
Abbildung 14: Spezialfärbungen für Mastzellen .....	35
Abbildung 15: Digitalisierung sowie Erstellung eines Nuclear v9 Algorithmus zur Zellkernzählung am Beispiel eines Plasmozytoms .....	39
Abbildung 16: Quantifizierung der Tumorzellen von kutanen MZT.....	40
Abbildung 17: Altersverteilung innerhalb der verschiedenen Gruppen.....	43
Abbildung 18: Ki67-labelling index (Ki67-LI) der verschiedenen untersuchten Tumorarten...44	
Abbildung 19: Ki67-labelling Index von Mastzelltumoren gruppiert nach Malignität .....	45
Abbildung 20: Assoziation des Ki67-labelling index von Adenomen der hepatoiden perianalen Duftdrüsen mit dem Patientenalter.....	46
Abbildung 21: Ki67-labelling index in Assoziation mit dem Alter von Hunden mit kutanen Mastzelltumoren.....	47
Abbildung 22: Assoziation des Ki67-labelling index mit dem Patientenalter bei Rüden und Hündinnen mit Adenomen der hepatoiden perianalen Duftdrüsen .....	49
Abbildung 23: Assoziation des Ki67-labelling Index mit dem Patientenalter bei Hündinnen mit kutanen Mastzelltumoren.....	50
Abbildung 24: Assoziation des Ki67-labelling Index mit dem Patientenalter bei Rüden mit kutanen Mastzelltumoren.....	51
Abbildung 25: Vergleich des Ki67-labelling index von kutanen Mastzelltumoren von unkastrierten und kastrierten Rüden und Hündinnen .....	54

Abbildung 26: Vergleich des Ki67-labelling index von Plasmazytomen von kastrierten und un- kastrierten Rüden und Hündinnen .....	55
Abbildung 27: Assoziation der Tumorgröße mit dem Ki67-labelling-Index von kutanen Mast- zelltumoren .....	62
Abbildung 28: Assoziation der Tumorgröße mit dem Ki67-labelling-Index von Adenomen der hepatoiden perianalen Duftdrüsen .....	62
Abbildung 29: Vergleich des Ki67-labelling Index von Trichoblastomen an verschiedenen Lo- kalisierungen .....	64
Abbildung 30: Resektionsränder der untersuchten Tumorarten .....	66
Abbildung 31: Assoziationen des Ki67-labelling Index mit dem Patientenalter von Hunden mit Weichgewebssarkomen, Plasmazytomen, Trichoblastomen und Hoden- tumoren. ....	105
Abbildung 32: Assoziationen des Ki67-labelling Index mit dem Patientenalter unter Berück- sichtigung des Geschlechts von Hunden mit Weichgewebssarkomen, Plasmazytomen und Trichoblastomen .....	107
Abbildung 33: Assoziation des Ki67-labelling Index mit dem Geschlecht oder Kastrationsstatus von Hunden mit Weichgewebssarkomen, Plasmazytomen, und Trichoblastomen .....	109
Abbildung 34: Assoziation des Ki67-labelling Index mit dem Körpergewicht der Hunde. ....	112
Abbildung 35: Assoziation des Ki67-labelling Index mit der Körpergröße der Hunde.....	115
Abbildung 36: Assoziationen des Ki67-labelling Index mit der Tumorgröße.....	116
Abbildung 37: Assoziation des Ki67-labelling Index mit der Tumorlokalisierung .....	118

# Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1: Empfohlene Anzahl der untersuchten Hauptgesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung .....	5
Tabelle 2: Ausgewählte Grading-Systeme für kanine Tumoren .....	12
Tabelle 3: Grading-System für kutane und subkutane Weichgewebssarkome beim Hund ..	14
Tabelle 4: Anzahl der für die Studie verwendeten Tumore nach Anwendung der Einschluss- und Ausschlusskriterien sowie Gesamtanzahl der beurteilten Tumore aus dem Archiv.....	25
Tabelle 5: Klassifizierung der Tiere nach geschätztem Körpergewicht sowie geschätzter Widerristhöhe basierend auf der Rassenomenklatur der FCI. ....	27
Tabelle 6: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper sowie Immunglobuline als Negativkontrolle. ....	30
Tabelle 7: Schema für das Deparaffinieren sowie einer absteigenden Alkoholreihe.....	31
Tabelle 8: Schema für das Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe sowie Vorbereitung für das Eindecken in Xylol. ....	32
Tabelle 9: Alphabetische Auflistung der verwendeten Substanzen und deren Hersteller. ...	32
Tabelle 10: Alphabetische Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung.....	33
Tabelle 11: Kurzprotokolle der Färbungen für eosinophile Granulozyten und Mastzellen. ....	36
Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Substanzen sowie deren Hersteller für die Färbung der eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. ....	37
Tabelle 13: Gruppengrößen sowie detaillierte Informationen zum Alter und Geschlecht aller untersuchter Gruppen. ....	42
Tabelle 14: Detaillierte Ergebnisse der Assoziation des Patientenalters mit dem Ki67-LI mittels linearer Regressionsanalyse. ....	48
Tabelle 15: Detaillierte Ergebnisse der Assoziation des Patientenalters mit dem Ki67-LI unter Berücksichtigung des Geschlechts der Hunde. ....	52
Tabelle 16: Detaillierte Ergebnisse zur Assoziation des Ki67-LI mit dem Kastrationsstatus der Hündinnen.....	56
Tabelle 17: Detaillierte Ergebnisse zur Assoziation des Ki67-LI mit dem Kastrationsstatus der Rüden. ....	57
Tabelle 18: Ergebnisse der statistischen Analyse der Assoziation des Ki67-LI mit dem geschätzten Körpergewicht der Hunde.....	59
Tabelle 19: Ergebnisse der statistischen Analyse der Assoziation des Ki67-LI mit der geschätzten Körpergröße der Hunde. ....	60

Tabelle 20: Detaillierte Ergebnisse der Assoziation der Tumorgröße mit dem Ki67-LI mittels linearer Regressionsanalyse. ....	63
Tabelle 21: Ergebnisse der statistischen Analyse der Assoziation des Ki67-LI mit der Lokalisation der Tumore. ....	65
Tabelle 22: Resektionsränder der untersuchten Tumorarten .....	67
Tabelle 23: Einstellungen des Aperio v9 Algorithm zur Quantifizierung verschiedener Tumorarten in immunhistochemisch gegen Ki67 gefärbten Schnitten. ....	99



## Abkürzungen

---

a	Jahr, lateinisch <b>annus</b>
Abb.	<b>Abbildung</b>
AgNOR	Silber-( <b>Ag</b> )-färbung gegen <b>N</b> ukleolus- <b>o</b> rganisierende <b>R</b> egionen
AK	<b>Antikörper</b>
APD	<b>A</b> denom der hepatoïden <b>p</b> erianalen <b>D</b> uftdrüsen
Aqua dest.	Destilliertes Wasser, lat. <b>aqua destillata</b>
b	<b>Biotinyliert</b>
BSA	<b>B</b> ovines <b>S</b> erum <b>a</b> lbumin
d	Tag, engl. <b>Day</b>
DAB	3,3'- <b>D</b> iamino- <b>b</b> enzidintetrahydrochlorid
FCI	<b>F</b> édération <b>C</b> ynologique <b>I</b> nternationale
FFPE	<b>F</b> ormalin- <b>f</b> ixiert, <b>P</b> araffin- <b>e</b> ingebettet
FNA	<b>F</b> einnadelaspiration
HE	<b>H</b> ämatoxylin- <b>E</b> osin
hpf	Hauptgesichtsfeld, engl. <b>high-power field</b>
IHC	Immun <b>h</b> istochemie
IgG	Immunglobulin <b>G</b>
KI	<b>K</b> onfidenzintervall
Ki67-LI	<b>Ki67</b> -labelling index
LZT	<b>L</b> eydigzelltumor
MAI	Mitose-Aktivitätsindex, engl. <b>mitotic activity index</b>
MC	Mitosezählung, engl. <b>mitotic count</b>
MI	Mitoseindex, engl. <b>mitotic index</b>
mk	<b>M</b> onoklonal
Mo	<b>M</b> onate
M/V	Volumen-korrigierter Mitoseindex, engl. <b>volume corrected mitotic index</b>
MZT	<b>M</b> astzelltumor
MZT I	<b>M</b> astzelltumor Grad <b>I</b> (Patnaik)

MZT II	<b>M</b> astzelltumor Grad <b>II</b> (Patnaik)
MZT III	<b>M</b> astzelltumor Grad <b>III</b> (Patnaik)
MZT lg	<b>M</b> astzelltumor mit niedrigem Grad (Kiupel), engl. <b>low grade</b>
MZT hg	<b>M</b> astzelltumor mit hohem Grad (Kiupel), engl. <b>high grade</b>
n. a.	<b>N</b> icht <b>a</b> uswertbar
NGS	Ziegen-Normalserum, engl. <b>normal goat serum</b>
OD	Optische Dichte, engl. <b>optical density</b>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl. <b>phosphate-buffered saline</b>
PCNA	<b>P</b> roliferating <b>c</b> ell <b>n</b> uclear <b>a</b> ntigen
PHH3	<b>P</b> hosphoryliertes <b>H</b> iston <b>H3</b>
pk	<b>P</b> olyklonal
PLA	<b>P</b> lasmozytom
SZT	<b>S</b> ertolizelltumor
Tab.	<b>T</b> abelle
TRI	<b>T</b> richoblastom
V.L.	<b>V</b> ector <b>L</b> aboratories
WGS	Kanines kutanes <b>W</b> eichgewebssarkom
WGS I	Kanines kutanes <b>W</b> eichgewebssarkom Grad I
WGS II	Kanines kutanes <b>W</b> eichgewebssarkom Grad II
WSI	Vollständiges Schnittbild, engl. <b>whole slide image</b>
$\tilde{x}$	Median

# 1 Einleitung

---

Tumorerkrankungen spielen als Todesursache eine tragende Rolle in der Medizin. Auch in der Tieronkologie werden der Behandlung von Tumorpatienten innerhalb der letzten Jahre immer mehr Aufmerksamkeit und Ressourcen gewidmet. Dies begründet sich nicht nur in der intensiven Mensch-Haustier-Bindung, sondern auch in der Translation moderner molekularbiologischer, chemo- und strahlentherapeutischer Behandlungen aus der Human- in die Tiermedizin. Dies beinhaltet mittlerweile vermehrt den Ansatz einer personalisierten Präzisionsmedizin. Auf dem Weg zu einem optimierten Patientenmanagement entstehen somit, auch für Tierpathologen, neue Fragestellungen. Für Tierpathologen liegt der Fokus zur Unterstützung des behandelnden Praktikers auf einer möglichst präzisen Diagnosestellung und Prognoseformulierung. Bei zahlreichen Tumorarten stellt die Proliferation der Tumorzellen einen essentiellen Parameter für die Begutachtung des Malignitäts- oder Tumorgrads von Neoplasien bei Mensch und Tier dar und ist somit ausschlaggebend für die Prognose hinsichtlich Rezidivrisiko, Metastasierung und letztendlich Überlebenszeit. Unberücksichtigt bleiben derzeit bei der Proliferationsbeurteilung jedoch Faktoren, die einen Einfluss auf die Proliferationsaktivität von Tumorzellen haben können. Hierzu zählen auch Faktoren wie patienten- oder tumorbezogene Parameter. Zahlreiche Studien aus der Humanmedizin an verschiedenen Tumorarten haben gezeigt, dass die Proliferation von bestimmten Tumorarten beim Menschen mit dem Alter oder Geschlecht des Patienten assoziiert ist. In der Tiermedizin hingegen bleiben die persönlichen Merkmale in der Diagnostik und Prognose bisher noch unberücksichtigt. Vor dem Hintergrund der Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der Proliferation einzelner Tumorarten in der Humanmedizin sowie der vermehrten Integration einer individualisierten Tumorthherapie stellt sich auch in der Tiermedizin die Frage einer möglichen Assoziation der Proliferation entarteter Zellen mit patienten- oder tumorbezogenen Parametern. Hierauf basierend könnte eine Optimierung der Malignitätsbeurteilung oder von Tumorgradings durch beispielsweise eine Alters- oder Geschlechts-Korrektur der Proliferation erreicht werden. Von einer präziseren Diagnostik der Tierpathologen profitiert der behandelnde Tierarzt und selbstverständlich der Patient.

Daher wird in dieser explorativen Studie zur Annäherung an die Fragestellung eine Assoziation zwischen der Proliferation von häufigen kaninen Tumoren und patienten- sowie tumorbezogenen Parametern untersucht und deren Ausmaß beleuchtet. Eine möglicherweise notwendige Adaptation in der Diagnostik unter Berücksichtigung der patienten- und tumorbezogenen Parameter wird im Rahmen der Diskussion eingeschätzt.

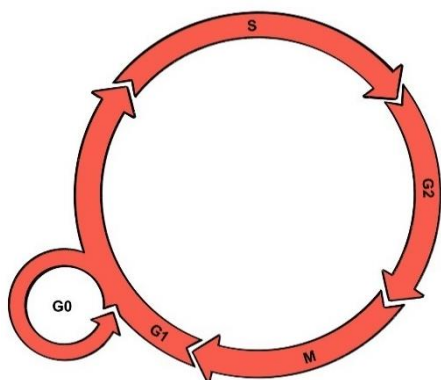
Wesentliche Teile dieser Dissertation wurden bereits vorab im Journal of Comparative Pathology publiziert (Firsching et al. 2022).

## 2 Literaturübersicht

---

### 2.1 Zellzyklus und Mitose

Der Zellzyklus von eukaryontischen Zellen ist ein kontinuierlicher und penibel koordinierter Prozess, der in die zwei grundlegenden und morphologisch differenzierbaren Abschnitte der Interphase und der Mitose oder M-Phase eingeteilt werden kann (Abbildung 1). In der Interphase vergrößert sich die Zelle konstant, bis sie kurz vor der darauffolgenden Mitose etwa ihre doppelte Größe erreicht. Dabei lässt sich die Interphase in die Phasen  $G_1$ , S und  $G_2$  aufteilen (Cooper 2000). Die  $G_1$ -Phase oder Gap1 entspricht der Lücke zwischen einer vorangegangenen Mitose und der darauffolgenden DNA-Replikation. In dieser Phase hat die Zelle eine hohe metabolische Aktivität und sie dient als Vorbereitung auf die S-Phase oder Synthese, innerhalb der die DNA-Replikation stattfindet. Während die Zelle in der  $G_1$ -Phase noch einen diploiden Chromosomensatz besitzt, ist dieser nach der S-Phase durch Verdopplung der Chromosomen tetraploid. An die S-Phase schließt sich die  $G_2$ -Phase oder Gap2 an, in der die Zelle weiterhin wächst und die Mitose vorbereitet wird. Für die Interphase benötigt die Zelle etwa 95 % der gesamten Dauer eines Zellzyklus (Cooper 2000, Schafer 1998). Im Anschluss an eine Interphase folgt die vergleichsweise kurze Mitose, die wiederum in die vier Abschnitte Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase unterteilt wird und lichtmikroskopisch am Hämatoxylin-Eosin (HE) -gefärbten Schnitt detektierbar ist (Donovan et al. 2020). In der Prophase erfolgt die Kondensation des Chromatins zu Chromosomen sowie die Ausbildung des Spindelapparates. Die Metaphase ist durch die Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle mit Hilfe des Spindelapparates gekennzeichnet. Anschließend wandern die Chromatiden der einzelnen Chromosomen in der Anaphase zu den gegenüberliegenden Zellpolen und die Mitose wird in der Telophase mit der Ausbildung der Kernmembranen der Tochterkerne abgeschlossen (McIntosh 2016). Nach Abschluss der Mitose besitzen beide Tochterzellkerne wieder einen diploiden Chromosomensatz. Die anschließende Zytokinese wird nicht mehr zur Mitose gezählt und die Tochterzellen können im Anschluss jeweils eine neue Interphase beginnen (Cooper 2000).



Neben den beschriebenen Phasen des Zellzyklus können Zellen auch in den proliferatorischen Ruhezustand der  $G_0$ -Phase eintreten.

*Abbildung 1: Phasen des Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle; Illustration: Dr. Sina Lorani, modifiziert nach Cooper (2000).*

## **2.2 Quantifizierung von Mitose und Zellproliferation**

### **2.2.1 Klassische Mitoseindexe am HE-gefärbten Schnittpräparat**

Die Quantifizierung von Mitosefiguren am HE-gefärbten Schnitt erfolgt routinemäßig in der Diagnostik und Forschung und ist aufgrund des geringen Bedarfs an technischer und finanzieller Ausstattung nach wie vor ein wichtiger Baustein bei der Befundung von tumorösen Veränderungen (Avallone et al. 2021, Dennis et al. 2011, Kiupel et al. 2011, Elston und Ellis 1991). Besonders häufig Verwendung finden hier der Mitotic Count sowie der Mitotic Index (Meuten et al. 2016). Für beide Mitoseindexe wurde in zahlreichen Studien eine prognostische Relevanz nachgewiesen (Laver et al. 2018, Romansik et al. 2007, Meyer et al. 2005). Weitere Hilfsmittel zur Einschätzung der Mitosehäufigkeit in Geweben sind der Mitotic Activity Index und der volumenkorrigierte Mitotic Index (Meuten et al. 2016). Generell sind die Kriterien für die Identifizierung einer Mitosefigur mit Hilfe eines Mikroskops erstmals von van Diest et al. beschrieben als Verlust der Kernmembran um Kernmaterial mit einem klar umschriebenen, haarigen Erscheinungsbild als Umschreibung der Chromosomen (van Diest et al. 1992). Zellen in der Telophase werden hierbei lediglich als eine Mitose gezählt.

Mitotic Count (MC): Der MC ist als die Anzahl der Mitosefiguren in 10 aufeinanderfolgenden Hauptgesichtsfeldern (hpf) bei 400-facher Vergrößerung definiert (Meuten et al. 2016). Empfohlen ist dabei die Betrachtung und Auswertung einer standardisierten Fläche, welche sich aus der Sehfeldzahl des Okulars ergibt (Haapasalo et al. 1989). Die Verwendung von Standardokularen mit einer Sehfeldzahl von 22 entspricht in Kombination mit einem Objektiv 40-facher Vergrößerung einem einzelnen Sichtfeld von 0,237 mm<sup>2</sup>. Nach Evaluation von 10 hpf wird somit eine Gesamtfläche von 2,37 mm<sup>2</sup> für die Quantifizierung von Mitosefiguren herangezogen. Weicht die Sehfeldzahl des Okulars ab, wird die Anpassung der Anzahl der untersuchten hpf empfohlen (Meuten et al. 2016) (Tabelle 1). Vorteile des MC sind die einfache Anwendbarkeit sowie ein geringer zeitlicher Aufwand (Sarli et al. 1999). Allerdings berücksichtigt der MC weder die Zellgröße noch die Zelldichte. Die Vergleichbarkeit von Tumoren mit unterschiedlicher Zellgröße und/oder Zelldichte ist somit beeinträchtigt (Alison 1995).

Tabelle 1: Empfohlene Anzahl zu untersuchender Hauptgesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung abhängig von der Sehfeldzahl des Okulars (modifiziert nach Meuten et al. 2016).

Sehfeldzahl (engl. field number – FN)	Diameter Hauptgesichtsfeld (mm)	Anzahl zu untersuchenden Hauptgesichtsfelder
FN 18	0.45	15
FN 20	0.5	12
<b>FN 22<sup>1</sup></b>	<b>0.55</b>	<b>10</b>
FN 24	0.6	8
FN 26.5	0.66	7

<sup>1</sup> Standardokular

Mitotic Index (MI): Der MI steht entweder für die in Mitose befindlichen Zellen in Prozent oder die in Mitose befindlichen Zellen pro 1000 Zellen (Meuten et al. 2016). Damit ergibt sich für die Ermittlung des MI eines Gewebes ein erhöhter zeitlicher Aufwand im Vergleich zum MC (Alison 1995). Jedoch beeinflussen Zellgröße und –dichte durch die Zählung aller Zellen, auch der nicht in Mitose befindlichen Zellen, den Index nicht (Alison 1995). Als weiterer Vorteil ist für den MI eine höhere Korrelation mit anderen Mitoseindizes oder auch immunhistochemischen Markern zur Quantifizierung der Proliferation beschrieben, als dies beim MC der Fall ist (Sarli et al. 1999).

Mitotic Activity Index (MAI): Für die Ermittlung des MAI wird der Mitotic Count durch die beurteilte Fläche geteilt, welche abhängig von der Sehfeldzahl des jeweiligen Okulars ist (Sarli et al. 1999, van Diest et al. 1992) (Tabelle 1). Wie für den MC ist auch für den MAI eine geringere Korrelation mit anderen Indizes zur Proliferationsquantifizierung beschrieben (Sarli et al. 1999).

Volumenkorrigerter Mitoseindex (M/V): Der M/V beschreibt die Summe der beobachteten Mitosen von Tumorzellen in einer bestimmten Anzahl von hpf, entsprechend dem MC, dividiert durch den geschätzten Volumenanteil neoplastischen Gewebes in Prozent vom gesamten Gewebe innerhalb der untersuchten hpf (Meuten et al. 2016). Obwohl der M/V von Haapasalo et al. als belastbarer und objektiver als der MC eingeschätzt wird (Haapasalo et al. 1989), wird er vergleichsweise selten in der Diagnostik oder wissenschaftlichen Studien verwendet.

Allen am HE-gefärbten Schnitt erhobenen Mitoseindizes ist gemein, dass Ergebnisse dieser manuellen Quantifizierungstechniken teils erheblichen Schwankungen zwischen verschiedenen Untersuchenden, aber auch zwischen zwei Untersuchungen durch denselben Untersuchenden unterliegen (Maier et al. 2020, Bertram et al. 2018, Meyer et al. 2009, Meyer

et al. 2005). In einer Studie von Malon et al. wurden Schwankungen zwischen zwei verschiedenen Untersuchenden von bis zu 35 % festgestellt (Malon et al. 2012).

### **2.2.2 Immunhistochemische Detektion und AgNOR**

Im Vergleich zur visuellen Erfassung und Zählung von Mitosen am Lichtmikroskop vereinfachen eine Reihe von immunhistochemischen Markern die Quantifizierung der Proliferation.

Ki67: Aufgrund der breiten Anwendbarkeit auf unterschiedlichen Geweben verschiedener Tierarten bei guter Reproduzierbarkeit gelangen Antikörper gegen das Kernprotein Ki67 besonders häufig in der Diagnostik und Forschung zur Anwendung (Goodlad 2017, Berlato et al. 2015, Bergin et al. 2011). Des Weiteren weist die immunhistochemische Markierung gegen Ki67 in der überwiegenden Anzahl der Studien eine gute Korrelation mit anderen Mitoseindexen oder Proliferationsmarkern auf, wie dem MC, dem MI oder dem Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) (Peralta et al. 2019, Kandefer-Gola et al. 2015, Gillespie et al. 2011, Laprie et al. 2001). Ki67 wird mit Ausnahme der G<sub>0</sub>-Phase in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert (Gerdes et al. 1984) (Abbildung 2) und eignet sich aufgrund seines ausgeprägten Kernsignals besonders gut für eine Auswertung mittels digitaler Bildanalysesysteme (Dietert et al. 2018, Domanitskaya et al. 2014, Northey et al. 2013, Pereira et al. 2013, Millanta et al. 2002). Neben der bloßen Beurteilung der Proliferation von Geweben besitzt das Antigen auch prognostische Relevanz für eine Reihe verschiedener Tumorarten beim Hund, wie beispielsweise von Melanomen in der Haut oder in der Maulhöhle (Bergin et al. 2011, Laprie et al. 2001), Mammakarzinomen (Santos et al. 2013), Tumoren der hepatoiden perianalen Duftdrüsen (Pereira et al. 2013) und Mastzelltumoren (Berlato et al. 2015, Maglennon et al. 2008, Webster et al. 2007, Scase et al. 2006, Abadie et al. 1999).

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA): Einen weiteren häufig verwendeten Marker stellt, trotz verschiedener Defizite, das PCNA dar. Es wird wie Ki67 im überwiegenden Anteil des Zellzyklus exprimiert und Antikörper gegen das Protein werden ebenso zu den Proliferations- oder Zellzyklusmarkern gezählt. Allerdings steigt die Expression erst ab der Mitte der G<sub>1</sub>-Phase an, erreicht während der G<sub>2</sub>-Phase mit anschließender Mitose ihren Höhepunkt bevor die Expression rapide abfällt (Bolton et al. 1992, Celis und Celis 1985) (Abbildung 2). Neben der Expression während der Zellproliferation wird eine erhöhte Expression von PCNA auch während DNA-Reparaturprozessen beobachtet (Maga und Hubscher 2003). Des Weiteren weist das Protein eine vergleichsweise lange Halbwertszeit auf, sodass ein Nachweis auch in postmitotischen Zellen noch möglich ist (Maga und Hubscher 2003) und im Vergleich zu anderen Markern in einer deutlich höheren Proliferation von Geweben resultiert (Kandefer-Gola et al. 2015, Webster et al. 2007, Scase et al. 2006). Einen weiteren Störfaktor können



Varianzen in der Gewebefixierung darstellen, was auch für andere Marker beschrieben ist. Die Anzahl PCNA-positiver Zellen variiert jedoch recht stark auch bei kleineren Abweichungen bezüglich der Dauer der Gewebefixierung und -prozessierung, was eine möglichst standardisierte Probennahme voraussetzt (Goodlad 2017). Darüber hinaus konnte in einer Studie von Hall et al. nach Exposition mit UV-Licht eine steigende PCNA-Expression beobachtet werden, jedoch bei gleichbleibender Ki67-Expression, was die uneingeschränkte Anwendbarkeit insbesondere bei Hautbiopsien in Frage stellt (Hall et al. 1993). Ungeachtet dessen findet der Marker in der Onkologie Anwendung, auch wenn die prognostische Aussagekraft sowie die Korrelation mit Tumorgraden, beispielsweise beim Mastzelltumor des Hundes, je nach Studie variieren können (Kandefer-Gola et al. 2015, Webster et al. 2007, Scase et al. 2006, Simoes et al. 1994) und einige Autoren von der Anwendung in der Pathologie abraten (Jurikova et al. 2016, Kandefer-Gola et al. 2015).

Phosphoryliertes Histon H3 (PHH3): PHH3 kann lediglich in der M-Phase des Zellzyklus detektiert werden, weshalb Antikörper gegen das Protein auch als Mitosemarker und nicht als Proliferationsmarker bezeichnet werden (Juan et al. 1998) (Abbildung 2). Trotz dieses Vorteils kommen Marker gegen PHH3 in der Veterinär-onkologie vergleichsweise selten zur Anwendung und es fehlt an Studien mit Betrachtung der prognostischen Relevanz.

Minichromosome Maintenance Proteine (MCM): MCM gelten als Schlüsselfaktoren für die Initiation der Zellreplikation (Jurikova et al. 2016) und werden aufgrund dessen ebenfalls zur Detektion der Proliferation von Geweben angewandt. Die Expression der Proteine steigt in der G<sub>1</sub>-Phase drastisch an und bleibt anschließend während des restlichen Zellzyklus mit einer Halbwertszeit von 24 h konstant (Musahl et al. 1998) (Abbildung 2). MCM weisen in kaninen Mastzelltumoren eine signifikante Korrelation mit den bereits genannten Markern Ki67 und PCNA auf (Kandefer-Gola et al. 2015) und sind in dieser Tumorart auch prognostisch relevant.

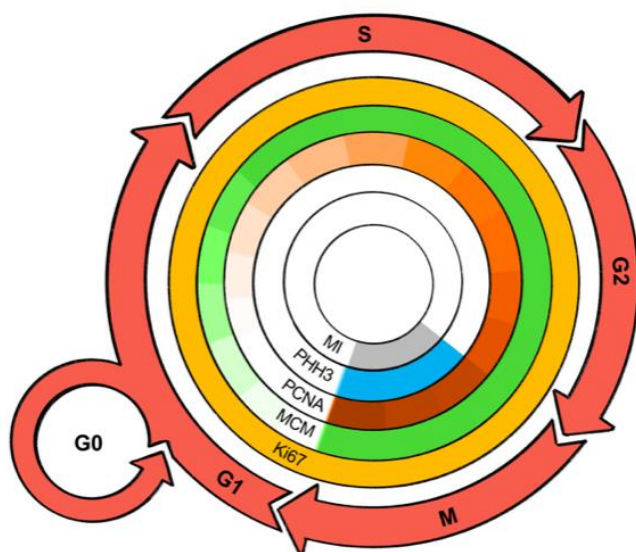


Abbildung 2: Immunhistochemische und histologische Detektion der Proliferation bzw. Mitose während des Zellzyklus; Illustration: Dr. Sina Loriani, modifiziert nach Sledge et al. (2016).

**AgNOR:** Die Färbung mit AgNOR stellt keine immunhistochemische Detektion dar, sondern eine histochemische Spezialfärbung. Mittels Silber (Ag)-Ionen werden Nukleolusorganisierende Regionen (NOR) im aktiven Zustand angefärbt (Trere 2000). Die Evaluation der Proliferation mittels AgNOR hat prognostischen Wert in kaninen Mastzelltumoren (Webster et al. 2008, Scase et al. 2006) und kann in perianalen Umfangsvermehrungen des Hundes belastbar zwischen benignen und malignen Tumoren diskriminieren (Preziosi et al. 1995).

## 2.2.3 Automatisierte digitale Systeme

### 2.2.3.1 Computergestützte Mitosenzählung

Um den zeitlichen Aufwand der klassischen Mitosenzählung am Lichtmikroskop zu reduzieren und das Problem der schwankenden Ergebnisse zwischen verschiedenen Untersuchungen und Untersuchenden auszuschließen, wurden für einzelne Tumorarten Datensets erstellt, welche als Grundlage für automatisierte Erkennungssysteme basierend auf maschinellem Lernen, sog. deep learning, zur Erkennung von Mitosefiguren dienen. In einer Studie mit humanen Mammatumoren von Roux et al. wurden hierfür 50 hpf von fünf verschiedenen Gewebestücken durch einen Pathologen manuell annotiert und alle Mitosefiguren gezählt (Roux et al. 2013). Anhand des Trainingsdatensets entwickelten 17 Teams unabhängig voneinander Algorithmen zur Detektion der mitotischen Zellen mit teils zufriedenstellender Übereinstimmung mit dem manuell ermittelten MI. Jedoch konnte insgesamt geschlussfolgert werden, dass das Datenset für belastbarere Ergebnisse sowohl um eine größere Tumorfläche in Form einer größeren Anzahl von hpf als auch insgesamt um weitere Gewebestücken von verschiedenen Patienten erweitert werden sollte. Aufgrund dessen wurden in einer anderen Studie, ebenfalls mit Mammatumoren, vollständige Schnittbilder, sog. whole slide images

(WSI), für das Training und das Austesten der Algorithmen zur Verfügung gestellt (Veta et al. 2019). Die besten Teams erreichten hier eine moderate Übereinstimmung zwischen dem automatisiert ermittelten Mitosescore und der manuellen Beurteilung der Mitosen durch einen Pathologen. Eine veterinärmedizinische Studie mit kutanen Mastzelltumoren beim Hund entwickelte ein besonders umfangreiches Datenset mit komplett annotierten WSI, welches neben Mitosefiguren auch Strukturen mit ähnlicher Morphologie wie Mitosefiguren sowie eosinophile Granulozyten, nicht-mitotische Mastzellen und nicht eindeutige Zellen beinhaltet (Bertram et al. 2019). Das ermöglichte erstmals die Bewertung von Mitose-Erkennungsalgorithmen auf einem vollständigen Schnittpräparat. Die Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus zeigen, dass die Leistung des Modells mit zunehmender Größe der annotierten Fläche sowie größerer Anzahl verschiedener WSI signifikant zunahm. Dennoch sind solche Datensets bisher die Ausnahme und nur für einzelne Tumorarten verfügbar.

#### *2.2.3.2 Digitale Bildanalyse immunhistochemisch markierter Gewebe*

Ein wesentlicher Vorteil der immunhistochemischen Markierung ist die Möglichkeit der Auswertung mittels digitaler Bildanalyzesysteme (Dietert et al. 2018, Chen et al. 2014, Domanitskaya et al. 2014, Northey et al. 2013). Die zu untersuchenden Schnittpräparate werden hierzu mit einem Scanner für Glasobjektträger digitalisiert und die Analyse ist mittels kommerzieller Software möglich, beispielsweise Aperio® oder Visiopharm®. Für die Auswertung immunhistochemischer Präparate kommt meist ein Algorithmus zur Zell-/Kernzählung oder zur Pixelzählung zum Einsatz (Dietert et al. 2018, Chen et al. 2014, Domanitskaya et al. 2014). Neben dem teils enormen Zeitaufwand einer manuellen Auszählung entfallen hierbei auch die bereits erwähnten Schwankungen zwischen unterschiedlichen Untersuchenden oder unterschiedlichen Untersuchungen durch dieselbe Person. Darüber hinaus lassen sich vollständige Schnittbilder von Geweben im Hochdurchsatzverfahren analysieren. Die erhobenen Daten sind mit sehr hoher Übereinstimmung reproduzierbar (Dietert et al. 2018, Chen et al. 2014) und für eine statistische Auswertung geeignet.

## 2.3 Zellteilung in der Veterinärpathologie

### 2.3.1 Proliferation als Malignitätskriterium

Das Aufrechterhalten proliferativer Signalwege sowie die Vermeidung von Wachstumssuppressoren gelten als zwei der acht Kennzeichen von Krebs in der Onkologie (Hanahan und Weinberg 2011) (Abbildung 3).

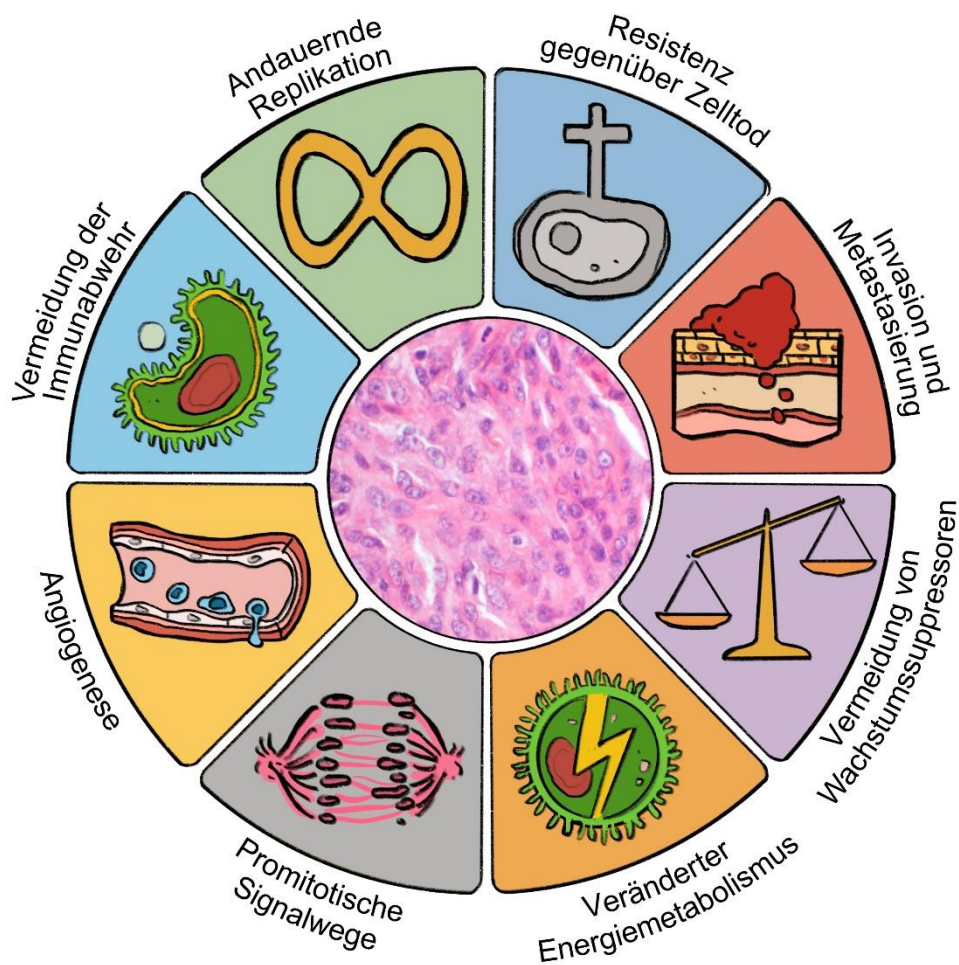


Abbildung 3: Kennzeichen von Krebs; Illustration: Dr. Sina Loriani, modifiziert nach Hanahan und Weinberg (2011).

Aufgrund der teils deutlich erhöhten Proliferation von Neoplasien im Vergleich zum Ursprungsgewebe, kann dieser Parameter bei bestimmten Tumorarten des Hundes, wie Lymphomen (Bauer et al. 2007) oder Mammatumoren (Gerald et al. 2000), belastbar zur Differenzierung zwischen gesundem und entartetem Gewebe herangezogen werden. Darüber hinaus lassen sich anhand der Proliferation auch benigne und maligne Varianten eines Tumors unterscheiden. Ein Beispiel beim Hund stellen Tumore der hepatoïden perianalen Duftdrüsen

dar. In zwei unabhängigen Studien wiesen Adenokarzinome der hepatoiden perianalen Duftdrüsen eine signifikant höhere Proliferation im Vergleich zu Adenomen in dieser Lokalisation auf (Pereira et al. 2013, Preziosi et al. 1995). Ebenso konnten maligne und benigne Tumore der Speicheldrüsen mit Hilfe des MC sowie des Ki67-LI differenziert werden (Sabattini et al. 2015). Auch akanthomatöse Ameloblastome und Plattenepithelkarzinome in der Maulhöhle lassen sich beim Hund anhand der Proliferation unterscheiden. Hierbei handelt es sich zwar nicht um benigne und maligne Varianten eines Tumors, sondern um zwei verschiedene Entitäten mit unterschiedlichem, biologischem Verhalten, welche sich jedoch klinisch, radiologisch und histologisch sehr ähnlich darstellen können (Peralta et al. 2019). Die Proliferation wies jedoch in einer Studie von Peralta et al. mit einem Ki67-LI von 2,2 % von akanthomatösen Ameloblastomen und einem Ki67-LI von 23,8 % von Plattenepithelkarzinomen signifikante Unterschiede auf und kann helfen, zwischen den beiden Entitäten zu unterscheiden (Peralta et al. 2019).

Anhand der Proliferation lässt sich bei ausgewählten Tumorarten nicht nur auf das Vorliegen einer Neoplasie oder ihren Malignitätsgrad schließen, sondern auch belastbar die wahrscheinlichste Prognose für den Patienten bestimmen. Beispielsweise konnte Hunden mit Melanomen in der Haut oder in der Maulhöhle anhand eines höheren MC bzw. Ki67-LI mit hoher Genauigkeit eine kürzere Überlebenszeit prognostiziert werden (Laver et al. 2018, Bergin et al. 2011, Laprie et al. 2001). Interessanterweise hatte in der Studie von Laprie et al. der Ki67-LI mit dem Grenzwert von  $< 15\%$  versus  $\geq 15\%$  als unabhängige Variable sogar einen höheren prognostischen Wert (97 %) als die klassische Histologie (91 %). Bei Mastzelltumoren erweist sich ebenfalls Ki67 als wertvoller Marker für die Malignitätsbeurteilung. Ein hoher Ki67-LI ist in dieser Tumorart signifikant mit einer kürzeren Überlebenszeit der Hunde assoziiert (Berlato et al. 2015, Maglennon et al. 2008, Abadie et al. 1999). Dies ist insbesondere für Grad II Mastzelltumore (Patnaik et al. 1984) relevant, welche sich bezüglich der Malignität als sehr variabel erweisen können und mit Hilfe des Ki67-LI zwischen guter und vorsichtiger Prognose differenzieren lassen (Maglennon et al. 2008, Scase et al. 2006). Auch für kanine Mammakarzinome erwies sich ein hoher Ki67-LI ( $\geq 40\%$ ) als unabhängiger prognostischer Faktor für lokale Rezidive, Fernmetastasen und eine signifikant kürzere, krankheitsfreie Überlebenszeit (Santos et al. 2013). Ähnlich dazu hat die Proliferation von Nierenzellkarzinomen (Edmondson et al. 2015), Weichgewebssarkomen (Dennis et al. 2011) und Osteosarkomen (Coyle et al. 2015) beim Hund prognostischen Wert.

Eine besondere Ausnahme stellt das kanine kutane Histiozytom dar. Diese Tumorart ist durch eine hohe Proliferation jedoch mit benignem Verhalten und spontaner Regression gekennzeichnet (Moore 2014).

### 2.3.2 Beispiele relevanter Grading-Systeme

Wie in der Humanmedizin werden auch in der diagnostischen Tierpathologie Grading-Systeme für eine möglichst belastbare Aussage über den Krankheitsverlauf und die Prognose für den Tumorpatienten herangezogen (Avallone et al. 2021). Dabei stellt die Proliferation der Tumorzellen bei den meisten Gradings einen wichtigen Baustein dar (Tabelle 2).

*Tabelle 2: Ausgewählte Grading-Systeme für kanine Tumoren, absteigend sortiert nach diagnostischer und prognostischer Relevanz (+++, sehr hoch; ++, moderat; +, gering; +/-, fraglich/kontrovers).*

Tumor	Parameter Proliferationsaktivität	Diagnostische u. prognostische Relevanz <sup>1</sup>	Literaturquelle
<b>Kutane Mastzelltumore</b>	Mitosen / hpf	+++	(Patnaik et al. 1984)
	MC	+++	(Kiupel et al. 2011)
<b>Weichgewebs-sarkom</b>	MC	+++	(Dennis et al. 2011)
<b>Mammakarzinom</b>	MC	++	(Pena et al. 2013)
<b>Lungenkarzinom</b>	MC	+	(McNiel et al. 1997)
<b>Lymphom</b>	Mitosen / hpf (Mittelwert aus 10 hpf)	+	(Valli et al. 2011)
<b>Hämangiosarkom der Milz</b>	MC	+/-	(Ogilvie et al. 1996)
<b>Osteosarkom</b>	MC	++	(Loukopoulos und Robinson 2007)
	Mitosen / 3 hpf	+	(Kirpensteijn et al. 2002)
<b>Nierenzellkarzinom</b>	(MC) <sup>2</sup>	+/-	(Edmondson et al. 2015)
<b>Prostatakarzinom</b>	-	+/-	(Palmieri und Grieco 2015)
<b>Cortisol-sezernierende adrenokortikale Tumore</b>	Ki67-LI	++	(Sanders et al. 2019)
<b>Meningiom</b>	MC	+/-	(Louis et al. 2016)

<sup>1</sup>Avallone et al. 2021; <sup>2</sup>nicht Bestandteil des Gradings, jedoch unabhängiger, prognostischer Parameter; hpf: high power field; MC: mitotic count; Ki67-LI: Ki67-labelling index.

Ergänzend zu Tabelle 2 sei darauf hingewiesen, dass auch für die histologische Beurteilung von Gliomen beim Hund ein Grading-System existiert, für das jedoch noch ein belastbarer Grenzwert der Proliferation zur Differenzierung zwischen benignen (low grade) und malignen (high grade) Tumoren fehlt (Koehler et al. 2018).

Auf das Grading von kutanen Mastzelltumoren und Weichgewebssarkomen, beide Tumorarten sind Bestandteil dieser Studie, wird im Folgenden detailliert eingegangen.

Für das Grading von kutanen Mastzelltumoren existieren zwei häufig verwendete, unabhängige Grading-Systeme (Kiupel et al. 2011, Patnaik et al. 1984). Das System von Patnaik et al. berücksichtigt für Mastzelltumoren von Grad I bis III die Tumorausdehnung, die Zellularität und Zellmorphologie, die Mitosen pro hpf und weitere, morphologische Veränderungen (Tumorstroma, Nekrose, Ödem, Hämorrhagien). Für die Mitoserate sind für Grad I 0, für Grad II 0-2 und für Grad III  $\geq 3$  Mitosefiguren pro hpf beschrieben. In der ursprünglichen Studienpopulation korrelierten die Tumorgrade außerdem bei zunehmender Malignität signifikant mit einer kürzeren Überlebenszeit. Das zweistufige System von Kiupel et al. fordert eine Hochstufung eines niedrig malignen (low grade) auf einen hoch malignen (high grade) Mastzelltumor sobald eines der folgenden Kriterien im Tumorareal mit der höchsten Proliferation und Anisokaryose erfüllt ist: (a)  $MC \geq 7$ ; (b)  $\geq 3$  mehrkernige Tumorzellen; (c)  $\geq 3$  bizarr geformte Tumorzellkerne in 10 hpf; (d) Karyomegalie. Auch bei der Entwicklung dieses Grading-Systems wies die ursprüngliche Studienpopulation eine signifikant kürzere Überlebenszeit mit kürzerem Zeitintervall bis zum Tumorrezidiv und Ausbildung von Metastasen von Tieren mit high grade Mastzelltumoren auf. Ein weiteres Grading-System aus dem Jahr 1973 diente bezüglich der definierten Kriterien für die Tumorgade 1 bis 3 als Grundbaustein für die Gradings von Patnaik und Kiupel, jedoch findet dieses heute kaum noch Verwendung (Bostock 1973).

Kanine Weichgewebssarkome werden ebenfalls in die Grade I bis III unterteilt. Das Grading, welches aus der Humanonkologie stammt (Trojani et al. 1984) und in den späten 1980er Jahren identisch in die Tiermedizin übernommen wurde (Dennis et al. 2011), umfasst lediglich drei Parameter: Tumorzellendifferenzierung, Nekroseareale in Prozent vom Tumorgewebe und Mitosescore (Tabelle 3). Letzteres wird als MC mit den Werten 0-9/10 hpf für einen Score von 1, 10-19/10 hpf für einen Score von 2 und  $\geq 20/10$  hpf für einen Score von 3 erfasst. Die erreichten Punkte im Scoring der drei Parameter ergeben nach Addition die Tumorgade I bis III. Dabei ist ein höher maligner Tumograd mit einem steigenden Rezidivrisiko verbunden (Bray et al. 2014, McSporran 2009). Zudem konnte die Proliferation von Weichgewebssarkomen in mehreren unabhängigen Studien als prognostischer Parameter

unabhängig vom Tumorgrad identifiziert werden (McSporran 2009, Simon et al. 2007, Bostock und Dye 1980).

*Tabelle 3: Grading-System für kutane und subkutane Weichgewebssarkome beim Hund, nach Trojani et al. (1984).*

<b>Differenzierungsscore</b>	
<b>1</b>	Sarkome je nach Tumorart weitestgehend gesundem, adultem, mesenchymalem Gewebe entsprechend
<b>2</b>	Sarkome mit bestimmbarer Tumorart, jedoch insgesamt mit schlechter Differenzierung
<b>3</b>	Entdifferenzierte Sarkome, Tumorart nicht bestimmbar
<b>Mitosescore: Mitosen pro 10 hpf (400 x)</b>	
<b>1</b>	0-9
<b>2</b>	10-19
<b>3</b>	>19
<b>Nekrosescore</b>	
<b>0</b>	Keine Tumornekrose
<b>1</b>	≤ 50 % Tumornekrose
<b>2</b>	> 50 % Tumornekrose
<b>Histologischer Grad: zusammengesetzt aus Differenzierung, Mitose- und Nekrosescore</b>	
<b>I</b>	≤ 3
<b>II</b>	4-5
<b>III</b>	≥ 6

hpf: high power field



## **2.4 Proliferation in Abhängigkeit patientenbezogener Parameter in der Human- und Tiermedizin**

### **2.4.1 Patientenalter**

#### *2.4.1.1 Gesunde Gewebe*

In verschiedenen Studien der human- und tiermedizinischen Forschung konnte eine Altersabhängigkeit der Proliferation in unterschiedlichen gesunden Geweben, wie beispielsweise Dünndarm (Corazza et al. 1998), Dickdarm (Kil et al. 2010, Xiao et al. 2001, Roncucci et al. 1988) und Knochenmark (Ogawa et al. 2000) nachgewiesen werden. In der Studie von Corazza et al. wiesen Patienten über 65 Jahre eine signifikant höhere PCNA Expression verglichen mit Patienten unter 65 Jahren auf (Corazza et al. 1998). Dieser Effekt war sowohl im Kryptepithel als auch bei Epithelzellen der Dünndarmzotten zu beobachten. Darüber hinaus konnte ein Anstieg der Proliferation bei älteren Menschen auch im Kolonepithel nachgewiesen werden (Roncucci et al. 1988). Korrespondierend dazu zeigten Fischer-344 Ratten im Alter von 22-24 Monaten (Mo) ebenfalls eine signifikant höhere Expression von PCNA im Kolonepithel verglichen mit 2-4 Mo alten Fischer-344 Ratten (Xiao et al. 2001). Weiterhin scheint das Kolonepithel auch bei älteren Hunden (12 a, n = 6) im Vergleich zu jungadulten Hunden (1 a, n = 6) durch eine höhere Proliferation gekennzeichnet zu sein, wie Kil et al. mittels Genexpressionsanalyse herausfanden (Kil et al. 2010). Interessanterweise konnte in einer Studie mit humanem Knochenmark ein Höchstwert der mittels Ki67 ermittelten Proliferation in der mittelalten Patientengruppe (50-59 a) beobachtet werden, wohingegen junge (0-19 a) und alte (90-100 a) Patienten deutlich weniger Ki67-positive Zellen im Knochenmark aufwiesen (Ogawa et al. 2000). Somit variiert die Altersabhängigkeit der Proliferation je nach untersuchtem Gewebe.

#### *2.4.1.2 Zellkulturen*

Neben der Altersabhängigkeit, welche in ausgewählten, gesunden Geweben nachgewiesen werden konnte, zeigen auch Zellen in Kultur eine Abhängigkeit der Proliferation vom Alter des Zellspenders. In einem Versuch mit kaninen, mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe wurde eine 2,4-fach höhere Proliferation in den Zellkulturen junger Spenderhunde (7 Mo) im Vergleich zu den Zellkulturen alter Spenderhunde (10-11 a) ermittelt (Lee et al. 2017). Korrespondierend dazu war die Proliferation kultivierter Satellitenzellen aus der Skelettmuskulatur von juvenilen Sprague-Dawley Ratten signifikant höher als dies in den Zellkulturen adulter und alter Ratten der Fall war (Schultz und Lipton 1982). Bis zu einem Spenderalter von 30 Tagen (d; Entnahmealter: 6 d, 15 d, 30 d) begannen die Zellen in Kultur früher mit der Zellteilung, proliferierten signifikant schneller und hielten die Proliferationsrate

während des gesamten untersuchten Zeitraums konstant. Im Gegensatz dazu begannen die kultivierten Zellen älterer Spenderratten (Entnahmealter: 3 Mo, 12 Mo, 24 Mo, 30 Mo) später mit der Zellteilung, proliferierten insgesamt langsamer und reduzierten ihre Proliferationsrate im Verlauf des Untersuchungszeitraums. Jedoch scheint ein steigendes Spenderalter nicht bei allen Zelltypen zu einer Reduktion der Proliferation kultivierter Zellen zu führen. Phillips et al. entnahmen und kultivierten Endothelzellen von Kapillaren aus Wundbereichen und konnten eine signifikant höhere Proliferation der Zellen alter Fischer-344 Ratten (24 Mo) im Vergleich zu den Zellen junger Ratten (2 Mo) nachweisen (Phillips et al. 1994).

### 2.4.1.3 Neoplasien

Weiterhin zeigen auch tumorös entartete Zellen bei einzelnen Tumorarten eine Proliferation abhängig vom Patientenalter. In einer humanmedizinischen Studie mit hepatozellulären Karzinomen war der MC in Tumoren von Patienten mit einem Alter von  $\leq 55$  Jahren signifikant höher als bei Patienten, die älter als 55 Jahre waren (Ha et al. 2016). Darüber hinaus erwies sich der MC in dieser Studie als belastbarer Parameter für die krankheitsfreie Überlebenszeit. Entsprechend war auch die Proliferation in einer weiteren Studie mit invasiven Mammakarzinomen signifikant mit jüngerem Patientenalter assoziiert (Chang et al. 2015). Jedoch war hier das jüngere Patientenalter gleichbedeutend mit Patientinnen vor der Menopause, wohingegen ältere Patientinnen sich bereits nach der Menopause befanden. Die beschriebene Altersabhängigkeit der Proliferation kann somit auch im Zusammenhang mit dem Unterschied im Hormonhaushalt der Patientengruppen zurückzuführen sein (Chang et al. 2015). Analog zu Zellen in Kultur kann jedoch auch bei Tumorzellen abhängig von der Tumorart neben einer höheren Proliferation in jüngeren Geweben auch ein umgekehrter Effekt beobachtet werden. So wurde in einer Studie ein Alter von 60 Jahren bei Patienten mit Schilddrüsenadenokarzinomen nicht nur als prognostischer Wendepunkt angesehen, auch stieg bei den Patienten über 60 Jahren die Proliferation signifikant im Vergleich zu den zwei jüngeren Altersgruppen von 0-44 Jahren und 45-59 Jahren (Godballe et al. 1994). Des Weiteren untersuchten Aloysius et al. unter anderem die Proliferation periampullärer Tumore, welche duktale Pankreasadenokarzinome, Cholangiokarzinome sowie intestinale Adenokarzinome aus dem Bereich der Ampulla duodeni beinhalteten (Aloysius et al. 2010). Die Expression von Ki67 war bei der älteren Patientengruppe von  $\geq 70$  Jahren signifikant höher als bei der Altersgruppe unter 70 Jahren. Als weiteren Index für die Proliferation wurde neben dem Ki67-LI der volumenkorrigierte Mitoseindex (M/V) verwendet und eine kürzere Überlebenszeit in Korrelation mit einem hohen M/V von Patienten mit Pankreasadenokarzinomen oder Cholangiokarzinomen ermittelt, was jedoch nicht für die intestinalen Adenokarzinome galt. Auch in dieser Studie konnte nicht nur ein Zusammenhang zwischen der Proliferation und dem Patientenalter, sondern auch zwischen der Proliferation

und der Überlebenszeit identifiziert werden. Diese Beispiele zeigen, dass die Proliferation in entartetem Gewebe, wie auch in gesundem Gewebe und Zellkulturen, Altersabhängigkeiten aufweist, welche jedoch nicht pauschal vorhergesagt werden können und individuell für das Gewebe und die Spezies betrachtet werden muss. Diese Altersabhängigkeiten können Konsequenzen für den diagnostischen Nutzen der Proliferation haben. Aufgrund dessen bestehen für einzelne Tumore in der Humanmedizin Bestrebungen zur Berücksichtigung des Patientenalters bei der diagnostischen Evaluierung der Proliferation (Teshiba et al. 2014, Diaz et al. 2013).

#### **2.4.2 Geschlecht**

Neben der Korrelation der Proliferation mit dem Patientenalter können abhängig von der Tumorart auch vereinzelt Unterschiede der Proliferation zwischen männlichen und weiblichen Patienten beobachtet werden. Melanome mit einer hohen Proliferation traten in einer Studie von Shen et al. signifikant häufiger bei Männern im Vergleich zu Frauen auf (Shen et al. 2014). Darüber hinaus war auch hier eine hohe Proliferation mit höherem Patientenalter korreliert.

#### **2.4.3 Rasse**

In der Tiermedizin stellt die Rasse bzw. der genetische Hintergrund eines Tieres einen wichtigen Parameter bei der Entwicklung und Häufigkeit von Krankheiten dar. Viele Hunderassen weisen Prädispositionen für die Entstehung einer oder mehrerer spezifischer Tumorarten auf (Smiech et al. 2018, Mochizuki et al. 2017, Gruntzig et al. 2016). Die Proliferationsaktivität bleibt jedoch bisher unberücksichtigt und Studien, die die Proliferationsaktivität von Geweben im Rassevergleich beleuchten, sind rar. Allerdings fanden Hardwick et al. heraus, dass sich die Expression von Ki67 in gesundem Lebergewebe abhängig von der Rasse unterschied (Hardwick et al. 2021).

### **2.5 Einfluss der Probenprozessierung auf die Proliferation**

Neben der Abhängigkeit von Alter oder Geschlecht eines Patienten nimmt auch die Gewebeprozessierung Einfluss auf die detektierbare Proliferation von Tumorzellen. Beeinflussende Faktoren können sein: Dauer zwischen Entnahme der Gewebeprobe und Fixierung; Dauer der Fixierung; Zusammensetzung und Konzentration des Fixans (Arima et al. 2016, Start et al. 1991, Donhuijsen et al. 1990). Beispielsweise führte eine verzögerte Fixierung von Tumorgewebe im Vergleich zum sofortigen Überführen der Probe in Formalin zu einer Reduktion des MC an HE-gefärbten Schnittpräparaten um 10-13 % nach 3 h, 39-64 % nach 6 h und 39-46 % nach 24 h (Start et al. 1991, Donhuijsen et al. 1990). Eine parallel durchgeführte Durchflusszytometrie ergab keine signifikanten Unterschiede in der G<sub>2</sub>- und M-Phase Fraktion der untersuchten Proben (Donhuijsen et al. 1990). Zusätzlich war für die

Proben mit verzögerter Fixierung in der histologischen Untersuchung auch ein schlechter Gewebeerhalt und damit verbunden ein erhöhter, zeitlicher Aufwand für die Beurteilung beschrieben. Der verminderte MC wurde deshalb vor allem mit der mäßigen Identifizierbarkeit von Mitosefiguren assoziiert. Ähnlich dazu beeinflusst die Gewebeprozessierung auch die immunhistochemische Markierung mit Ki67. Durch eine verzögerte Fixierung oder eine deutlich verkürzte oder verlängerte Fixierdauer reduzierte sich die Detektierbarkeit von Ki67-positiven Tumorzellen signifikant um bis zu zwei Drittel im Vergleich zu einer optimalen Prozessierung (Arima et al. 2016).

## 2.6 Ausgewählte kanine Tumoren

### 2.6.1 Kutaner Mastzelltumor

Mastzelltumore gehören zu den häufigsten malignen Neoplasien beim Hund und sind für 7-21 % aller kaniner Tumorerkrankungen in der Haut verantwortlich (Meuten 2017, Smiech et al. 2017, Misdorp 2004). Aufgrund der ausgeprägten Heterogenität im biologischen Verhalten dieser Tumorart werden in der Diagnostik routinemäßig Grading-Systeme angewandt (Kiupel et al. 2011, Patnaik et al. 1984), welche mit prognostischen Parametern wie der Überlebenszeit, Metastasierungsrate und Tumorrezidiv assoziiert sind (Kiupel et al. 2011, Simoes et al. 1994, Patnaik et al. 1984). Mastzelltumore treten gehäuft beim Boxer und verwandten Rassen, Mops, Labrador und Golden Retriever sowie Staffordshire Bullterrier auf (Smiech et al. 2017, Berlato et al. 2015, Shoop et al. 2015, White et al. 2011). In der Histologie können bandförmig oder in Streifen angeordnete, runde bis ovale Tumorzellen mit Mastzelltypischem, blass-eosinophilem Zytoplasma mit feinen, violetten Granula sowie exzentrisch liegendem Zellkern identifiziert werden (Meuten 2017) (Abbildung 4). Darüber hinaus kann in Mastzelltumoren häufig eine variable Anzahl eosinophiler Granulozyten beobachtet werden.

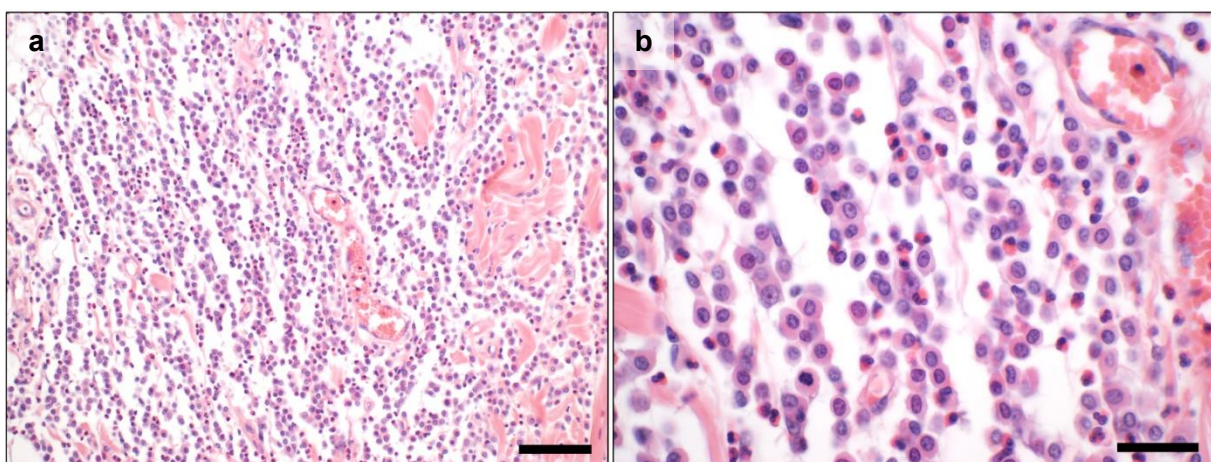


Abbildung 4: Kutaner Mastzelltumor, Hund, HE; a) Maßstab: 50 µm; b) Maßstab: 20 µm.

### 2.6.2 Kanines kutanes Weichgewebssarkom

Weichgewebssarkome stellen eine heterogene Gruppe verschiedener, maligner Tumore mit mesenchymalem Ursprung dar, wie beispielsweise Fibrosarkome, Liposarkome, Leio- und Rhabdomyosarkome, periphere Nervenscheidentumore und weitere (Dennis et al. 2011, Chijiwa et al. 2004). Am häufigsten treten Weichgewebssarkome in der Haut und Unterhaut auf und machen beim Hund 8-15 % aller kutanen und subkutanen Tumore aus (Dennis et al. 2011, Dobson et al. 2002). Ein aus der Humanmedizin stammendes und in die Tiermedizin übernommenes Grading-System teilt kanine kutane und subkutane Weichgewebssarkome in Tumorgade mit zunehmender Malignität von I bis III ein (Dennis et al. 2011, Trojani et al. 1984). Hierbei sind Grad III Tumore vergleichsweise selten diagnostizierbar (McSporran 2009). Histologisch sind spindelige, mesenchymale Zellen angeordnet als Bündel, Knäuel oder Kringel zwischen einer extrazellulären Matrix aus Kollagenfasern charakteristisch (Dennis et al. 2011) (Abbildung 5).

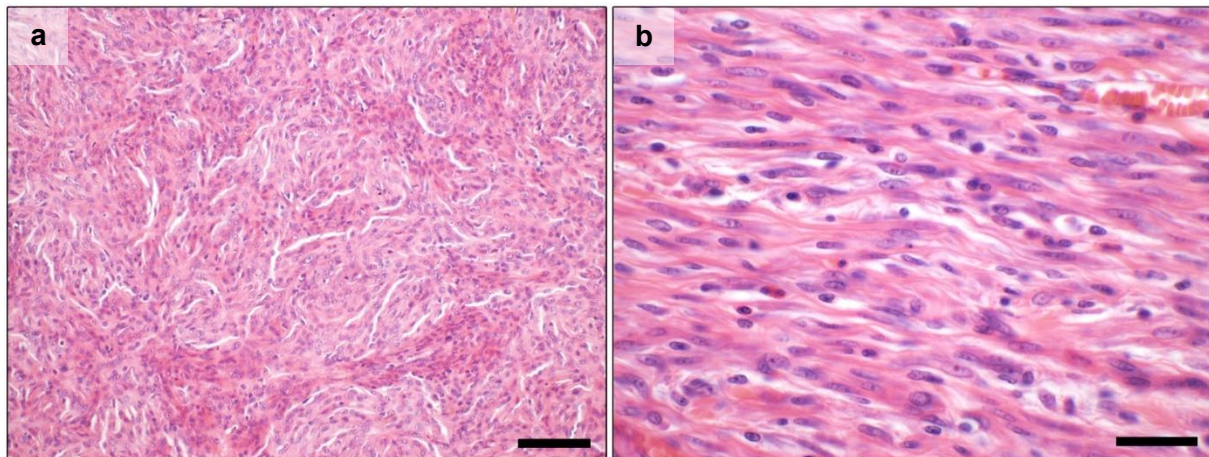


Abbildung 5: Weichgewebssarkom, Hund, HE; a) Maßstab: 50 µm; b) Maßstab: 20 µm.

### 2.6.3 Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen

Adenome der hepatoiden perianalen Duftdrüsen gehören wie MZT zu den häufigsten Hauttumoren des Hundes (Bostock 1986). Sie haben ihren Ursprung in den modifizierten Talgdrüsen der hepatoiden perianalen Duftdrüsen, auch Zirkumanaldrüsen genannt (Meuten 2017). Die Tumore können insbesondere bei älteren, unkastrierten Rüden, seltener bei Hündinnen oder kastrierten Rüden beobachtet werden (Pereira et al. 2013, Withrow 2013, Hayes und Wilson 1977). Aufgrund der beobachteten, spontanen Regression der Tumore nach Kastration der Rüden (Wilson und Hayes 1979) und einer höheren Expression von Androgenrezeptoren in Adenomen im Vergleich zu gesundem Drüsengewebe (Pisani et al.



2006) wird ein Androgeneinfluss bei der Entstehung der Tumore vermutet. Histologisch zeichnet sich diese Tumorart durch eine Unterteilung in Läppchen mit überwiegend großen, Hepatozyten-ähnlichen (hepatoiden) Zellen mit viel eosinophilem Zytoplasma sowie peripher gelegenen, kleinen, basaloiden Zellen mit nur wenig Zytoplasma aus (Meuten 2017) (Abbildung 6).

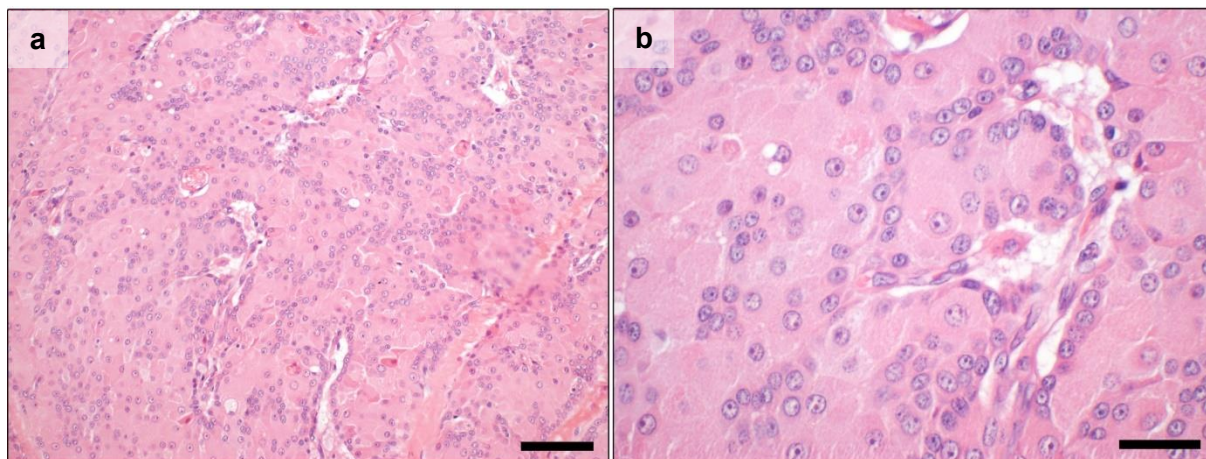


Abbildung 6: Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen, Hund, HE; a) Maßstab: 50 µm; b) Maßstab: 20 µm.

### 2.6.4 Plasmozytom

Plasmozytome sind Rundzelltumore, die entweder medullär (= Myelom) oder extramedullär auftreten können. Der Tumor wird beim Hund häufig in der Haut diagnostiziert (Gross et al. 2005). Darüber hinaus treten 15-30 % aller extramedullärer Plasmozytome in der Maulhöhle einschließlich den Lippen auf und machen hierbei 5 % aller Tumore in der Maulhöhle aus (Wright et al. 2008, Ramos-Vara et al. 2007). Histomorphologisch lassen sich extramedulläre Plasmozytome in fünf Typen einteilen – mature (reif), hyaline (hyalin), cleaved (gespalten, bezogen auf den Nukleus), asynchronous (asynchron), polymorphous-blastic type (polymorph-blastisch) – jedoch ohne prognostische Relevanz oder möglichen Nutzen für ein Tumorigradung (Platz et al. 1999). Allgemein stellen sich Plasmozytome histologisch als flächig verteilte, pleomorphe Rundzellen mit exzentrisch liegenden, großen Zellkernen und moderater Anisozytose und Anisokaryose sowie häufig auch mit bi- oder multinukleären Tumorzellen dar (Meuten 2017) (Abbildung 7).

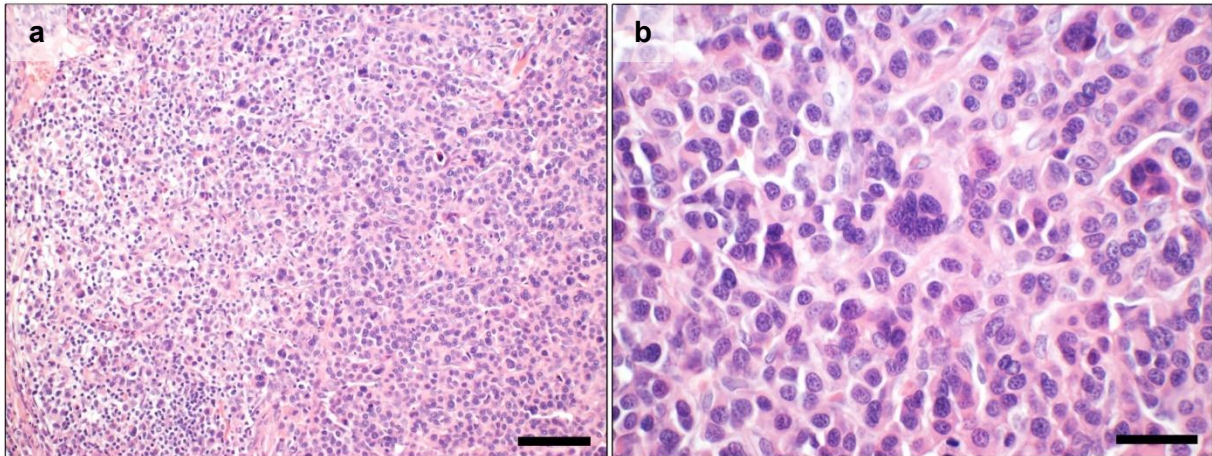


Abbildung 7: Plasmozytom, Hund, HE; a) Maßstab: 50 µm; b) Maßstab: 20 µm.

### 2.6.5 Trichoblastom

Trichoblastome sind gutartige Haarfollikeltumore, die häufig bei mittelalten Hunden insbesondere an Kopf und Hals auftreten (Meuten 2017, Gross et al. 2005). Dabei zeigen Rassen wie Pudeln, Cocker Spaniel, Kerry Blue Terrier, Bichon Frisé und Shelties ein erhöhtes Risiko für das Auftreten dieser multilobulären Umfangsvermehrungen (Meuten 2017, Gross et al. 2005). Histologisch sind Muster wie Palisaden, Medusen und Girlanden aus kleinen, basaloiden Keratinozyten mit wenig eosinophilem Zytoplasma charakteristisch für die Tumorart (Gross et al. 2005) (Abbildung 8).

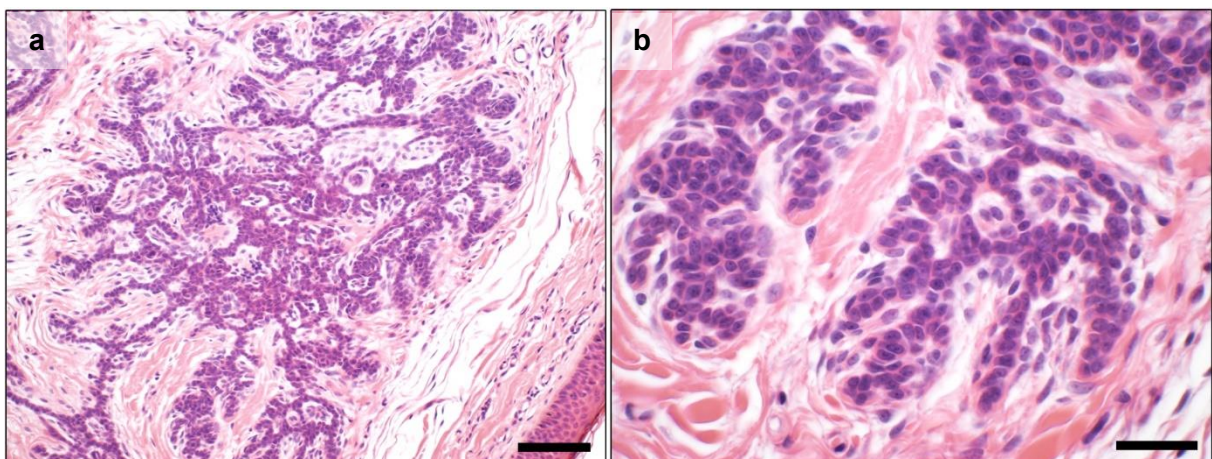


Abbildung 8: Trichoblastom, Hund, HE; a) Maßstab: 50 µm; b) Maßstab: 20 µm.



### 2.6.6 Leydigzelltumor

Der Leydigzelltumor gehört zu den gonadostromalen Hodentumoren (Kennedy 1998) und tritt häufig bei älteren Rüden auf (Liao et al. 2009). Oft können Leydigzelltumore multipel in einem oder beiden Hoden oder auch als Kollisionstumor zusammen mit einem anderen Hodentumor beobachtet werden (Meuten 2017). Leydigzelltumore weisen ein benignes Verhalten auf und können hormonproduzierend sein, allerdings vergleichsweise selten mit klinischer Symptomatik (Peters et al. 2000). Makroskopisch stellen Leydigzelltumore auffällig gelb bis bräunliche, gut abgrenzbare Umfangsvermehrungen, teils mit Einblutungen oder zystischen Hohlräumen dar (Meuten 2017). Auf histologischer Ebene präsentieren sich die Tumore typischerweise mit großen, runden bis polygonalen Zellen mit eosinophilem, fein granuliertem bis vakuolisiertem Zytoplasma und kleinen, runden Zellkernen (Meuten 2017) (Abbildung 9).

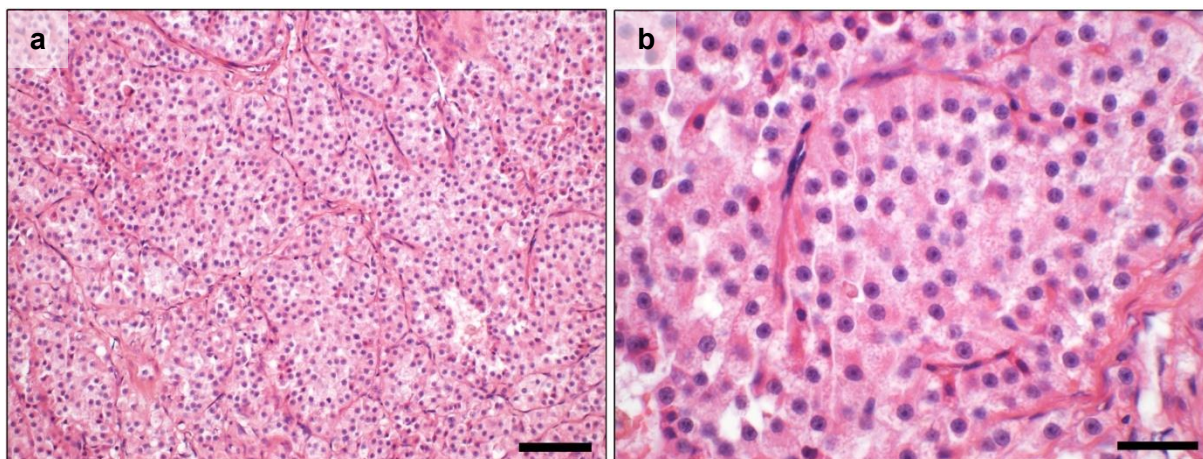


Abbildung 9: Leydigzelltumor, Hund, HE; a) Maßstab: 50  $\mu$ m; b) Maßstab: 20  $\mu$ m.

### 2.6.7 Sertolizelltumor

Wie der Leydigzelltumor gehört auch der Sertolizelltumor zu den gonadostromalen Hodentumoren (Kennedy 1998). Im Gegensatz zum Leydigzelltumor wird dieser Tumor auch bei jungen und mittelalten Rüden beobachtet und ist häufig mit Kryptorchismus assoziiert (Liao et al. 2009, Hayes et al. 1985). Der Tumor weist meist ein benignes Verhalten auf, kann aber aufgrund hormonproduzierender Eigenschaften häufig zu einer Feminisierung mit Gynäkomastie, Attraktivität für andere Rüden, bilateral symmetrischer Alopezie und Atrophie des kontralateralen Hodens sowie des Knochenmarks führen (Peters et al. 2000). Die Tumorzellen sind entweder intratubulär oder diffus angeordnet und zeigen sich als ovale bis längliche Zellen mit eosinophilem, teils auch vakuolisiertem Zytoplasma und ovalem Zellkern (Meuten 2017) (Abbildung 10).



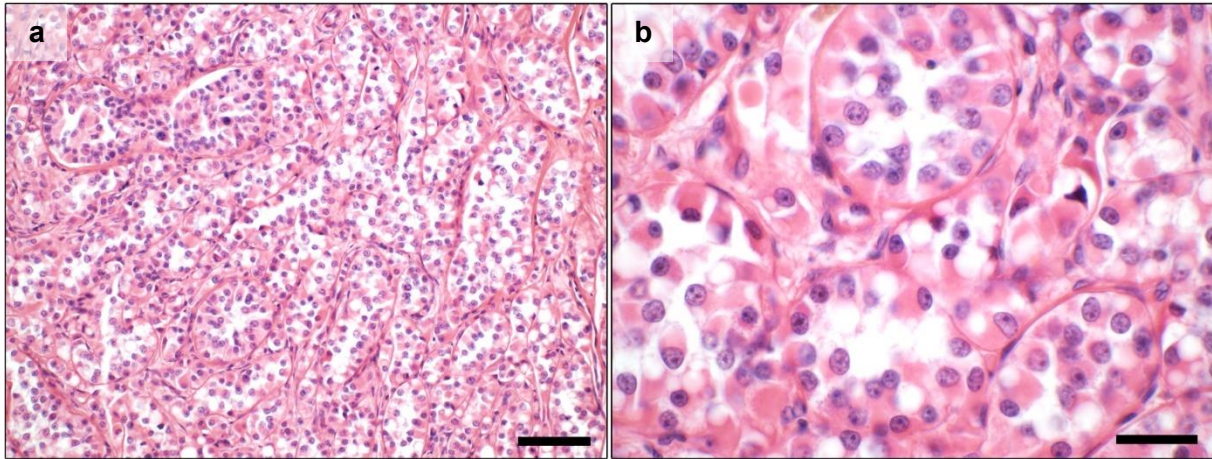


Abbildung 10: Sertolizelltumor, Hund, HE; a) Maßstab: 50 µm; b) Maßstab: 20 µm.

### **3 Arbeitshypothese, Ziele und Versuchsplanung**

---

Arbeitshypothese: Die Proliferation ist bei bestimmten Tumoren beim Menschen mit dem Alter oder Geschlecht der Patienten assoziiert. Demzufolge wurde auch bei kaninen Tumoren eine Assoziation zwischen patientenbezogenen Parametern und der Proliferation von Tumorzellen hypothesiert.

In dieser historischen Studie mit Querschnittsdesign sollte eine mögliche Assoziation zwischen patientenbezogenen Parametern (Alter, Geschlecht, Kastrationsstatus, Körpergewicht/-größe) und der Proliferation von kaninen Tumoren analysiert werden. Darüber hinaus sollte in dieser Studie auch der Einfluss von tumorbezogenen Parametern, wie Größe und Lokalisation, untersucht werden. Anhand sieben häufiger Tumoren des Hundes, darunter maligne und benigne Tumoren, sollte mittels immunhistochemischer Quantifizierung von Ki67-exprimierenden Tumorzellen und digitaler Bildanalyse ganzer Schnittpräparate die Proliferation der Tumore ermittelt und mit patienten- und tumorbezogenen Parametern assoziiert werden. Die Ergebnisse dieser Studie hatten zum Ziel, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Proliferation kaniner Tumoren und patienten- und tumorbezogenen Parametern aufzudecken und deren Ausmaß zu beleuchten. Darüber hinaus sollte auf der Grundlage der Ergebnisse die Notwendigkeit zur Anpassung und Korrektur von Grading-Systemen unter Berücksichtigung der patienten- und tumorbezogenen Parameter eingeschätzt werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Tumorauswahl

Alle für die vorliegende Studie verwendeten Gewebe stammten aus dem histologischen Archiv des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin aus den Jahren 2010 bis 2018. Die Beurteilung der Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebe erfolgte an den zugehörigen, ebenfalls archivierten HE gefärbten Schnittpräparaten der jeweiligen Tumore. Insgesamt wurden HE gefärbte Schnittpräparate von 1167 Tieren aus dem Archiv entnommen und beurteilt, von welchen 495 Tumore den vorab festgelegten Einschluss- sowie Ausschlusskriterien entsprachen. Die genaue Anzahl der Hunde pro Tumorart kann aus Tabelle 4 entnommen werden.

*Tabelle 4: Anzahl der für die Studie verwendeten Tumore nach Anwendung der Einschluss- und Ausschlusskriterien sowie Gesamtanzahl der beurteilten Tumore aus dem Archiv.*

Tumorart		Tumore in der Studie	Gesamtanzahl beurteilter Tumore
<b>Mastzelltumor</b>	Total	<b>70</b>	220
	Patnaik Grad I	11	
	Patnaik Grad II	39	
	Patnaik Grad III	20	
	Kiupel Low grade	49	
	Kiupel High grade	21	
<b>Weichgewebssarkom</b>	Total	<b>61</b>	126
	WGS Grad I	44	
	WGS Grad II	17	
<b>Plasmozytom</b>	Total	<b>86</b>	178
	Kutan	42	
	Mukokutan	29	
	Digital	15	
<b>Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen</b>		<b>95</b>	170
<b>Trichoblastom</b>		<b>62</b>	165
<b>Leydigzelltumor</b>		<b>65</b>	129
<b>Sertolizelltumor</b>		<b>56</b>	179

### **4.1.1 Einschlusskriterien**

Die vorab definierten Einschlusskriterien umfassten die übereinstimmende, eindeutige Diagnose einer der ausgewählten Tumorarten durch zwei Pathologen (Diplomates des European oder American College of Veterinary Pathologists), eine Mindestfläche des Anschnitts der Umfangsvermehrung  $\geq 10$  hpf mit einem Standardokular (2,37 mm<sup>2</sup>) (Meuten et al. 2016) und in ausreichendem Umfang vorliegende Informationen über den Patienten. Die Informationen wurden als ausreichend angesehen, wenn das Alter des Patienten vorlag sowie mindestens ein weiterer dieser Parameter bekannt war: Geschlecht und Kastrationsstatus, Rasse, Lokalisation oder Größe des Tumors.

### **4.1.2 Ausschlusskriterien**

Die ebenfalls vorab definierten Ausschlusskriterien beinhalteten in der histologischen Beurteilung der Schnitte das Vorliegen von Hämorrhagien, Autolyse oder nekrotischer Areale in mehr als 30 % der Tumorfläche. Wesentliche Sekundärinfektion mit oder ohne Ulzeration führten ebenfalls zum Ausschluss des Präparats. Darüber hinaus war Kryptorchismus im Fall der beiden untersuchten Hodentumorarten ein Ausschlusskriterium. Bei fraglichen Tumoren ohne konkrete Angaben im mitgesandten Untersuchungsauftrag wurde Kryptorchismus mittels telefonischer Befragung in den behandelnden Praxen und Kliniken ausgeschlossen.

## **4.2 Patienten- und Tumordaten**

### **4.2.1 Alter, Geschlecht und Kastrationsstatus**

Die Informationen über das Alter sowie das Geschlecht und den Kastrationsstatus der Patienten wurde aus den mitgesandten Untersuchungsaufträgen entnommen und entsprach dem jeweiligen Alter beziehungsweise Kastrationsstatus zum Zeitpunkt der chirurgischen Tumorexzision. Genaue Informationen über die Dauer der Tumorerkrankung waren nicht vorhanden.

### **4.2.2 Körpergewicht und -größe**

Körpergewicht und -größe wurden anhand der im Untersuchungsauftrag angegebenen Rasse des Tieres ermittelt. Initial wurde eine Einteilung der Rassen in 10 Gruppen gemäß der Rassenomenklatur der Fédération Cynologique Internationale (FCI) angestrebt. Aufgrund zu geringer Fallzahlen in einigen der Gruppen konnte diese Einteilung jedoch nicht angewandt werden. Stattdessen erfolgte die Einteilung basierend auf der Nomenklatur der FCI anhand des durchschnittlichen Körpergewichts in Kilogramm sowie der durchschnittlichen Widerristhöhe in Zentimetern der jeweiligen Rasse. Hieraus ergab sich eine Klassifizierung

nach Körpergewicht in vier Gruppen sowie eine Klassifizierung nach Widerristhöhe in drei Gruppen (Smiech et al. 2018) (Tabelle 5).

*Tabelle 5: Klassifizierung der Tiere nach geschätztem Körpergewicht sowie geschätzter Widerristhöhe basierend auf der Rassenomenklatur der FCI.*

<b>Einteilung nach Körpergewicht</b>	<b>Gewicht in kg</b>	<b>Einteilung nach Widerristhöhe<sup>1</sup></b>	<b>Größe in cm</b>
Miniatur	< 10	Klein	< 45
Leicht	10 ≤ 20	Mittel	45 ≤ 60
Mittelschwer	20 ≤ 30	Groß	> 60
Schwer	> 30		

<sup>1</sup>(Smiech et al. 2018)

#### **4.2.3 Tumorgröße**

Die Größe der Umfangsvermehrung wurde nach Formalinfixierung im Rahmen der routinemäßigen Probenprozessierung in Zentimetern mit einer Nachkommastelle ermittelt. Für die Korrelation der Tumorgröße mit dem Ki67-LI wurde lediglich die maximale Dimension berücksichtigt.

#### **4.2.4 Tumorlokalisation**

Die anatomische Lokalisation der Umfangsvermehrung konnte den mitgesandten Untersuchungsaufträgen entnommen werden. Die verschiedenen Lokalisationen wurden anschließend angelehnt an Kiupel et al. (Kiupel et al. 2005) in vier Kategorien zusammengefasst (Abbildung 11a). Ausnahmen von dieser Kategorisierung bildeten die untersuchten Hodentumore, Adenome der hepatoiden perianalen Duftdrüsen und Plasmozytome. Letztere wurden als kutan, mukokutan oder digital kategorisiert und kutane Plasmozytome zusätzlich, wie bereits genannt, nach Kiupel et al. eingeteilt (Kiupel et al. 2005) (Abbildung 11b).

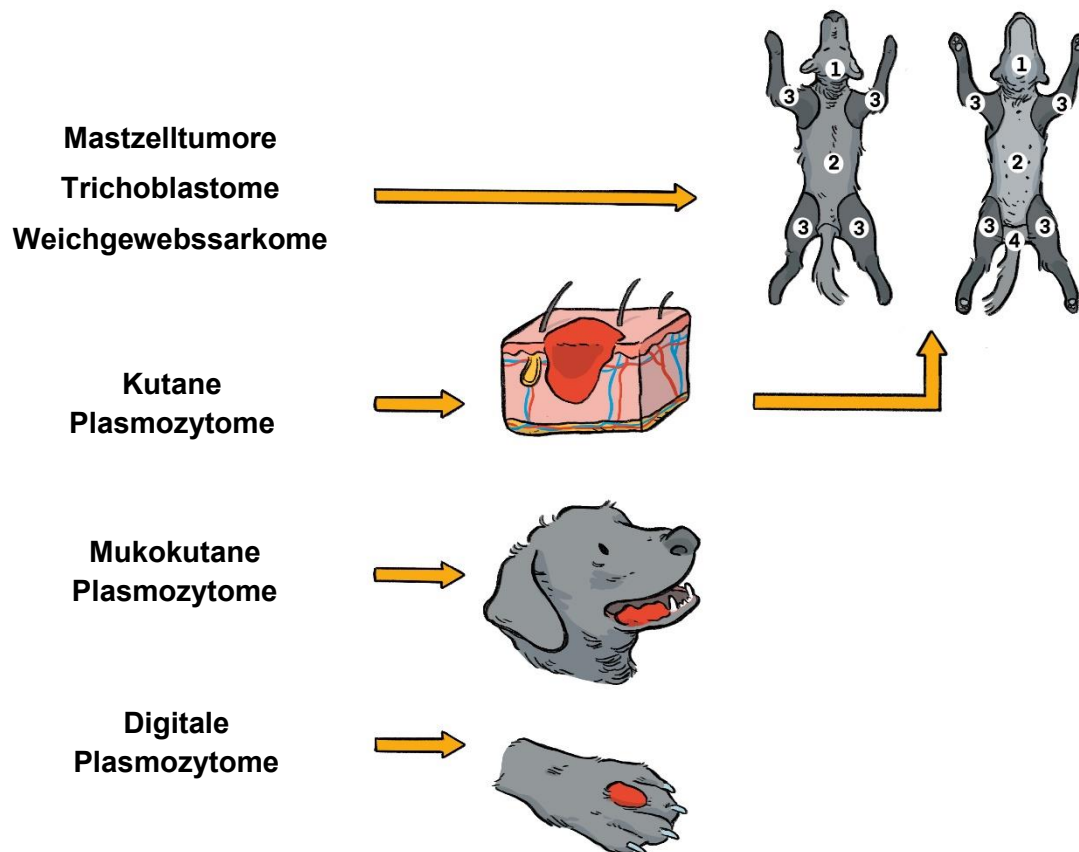


Abbildung 11: Kategorisierung der anatomischen Tumorlokalisationen. Die Lokalisation von Mastzelltumoren, Trichoblastomen und Weichgewebssarkomen sowie kutanen Plasmozytomen wurde wie folgt definiert: 1 – Kopf und Hals; 2 – Rumpf; 3 – Extremitäten; 4 – Regio inguinalis/perinealis; Modifiziert nach Kiupel et al. (2005). Darüber hinaus wurden mukokutane und digitale Plasmozytome separat betrachtet; Illustrationen: Dr. Sina Loriani.

#### 4.2.5 Resektionsrand

Anhand der Messung der Größe der Formalin-fixierten Gesamtprobe sowie der Umfangsvermehrung im Rahmen der routinemäßigen Probenprozessierung wurde der mittlere Resektionsrand berechnet (Abbildung 12). Ausgenommen von dieser Analyse waren LZT und SZT, da hier routinemäßig im Rahmen der Tumorexzision die Hoden und Nebenhoden vollständig entnommen werden.

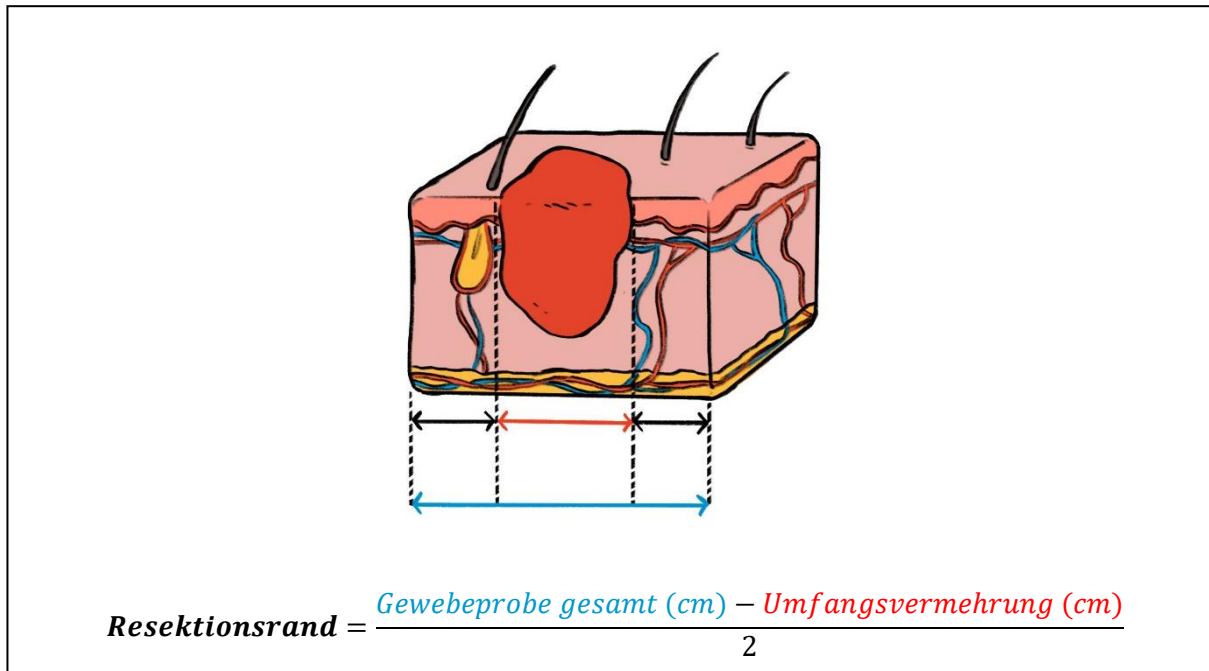


Abbildung 12: Messung und Berechnung des Resektionsrandes; Illustration: Dr. Sina Loriani.

### 4.3 Immunhistochemie

#### 4.3.1 Histologische Präparation

Von den archivierten, in Paraffin-eingebetteten Geweben wurden Schnittpräparate von 2 µm Dicke mit Hilfe des Mikrotoms HM 325 (Microm GmbH, Neuss) und Mikrotomklingen (Faust Lab Science GmbH, Klettgau) angefertigt und auf SuperFrost® Objektträger (Engelbrecht) aufgezogen. Im Anschluss erfolgte eine Trocknung für 2 h bei 60 °C.

#### 4.3.2 Die Antikörper

Für die Detektion der Zellteilung wurde ein Antikörper (AK) gegen das Proliferationsmarker-Protein Ki67 ausgewählt. Für die Markierung von eosinophilen Granulozyten in kutanen MZT wurde eine Etablierung eines AK gegen das Enzym eosinophile Peroxidase versucht. Die

detaillierten Informationen zu allen in dieser Studie verwendeten AK einschließlich Kontrollen können aus Tabelle 6 entnommen werden.

*Tabelle 6: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper sowie Immunglobuline als Negativkontrolle.*

AK	Verwendung	Immunisierte Spezies	Spezifität	Klon/Katalog-Nr.	Verdünnung	Hersteller
Ki67, mk	Primär-AK	Maus	Mensch	MIB-1/ M7240	1 : 75	DAKO
EPX, pk	Primär-AK	Kaninchen	Mensch	orb382913	1 : 200 u. 1 : 400	Biorbyt
IgG, b	Sekundär-AK	Ziege	Maus	HK119-7M	1 : 200	V. L.
IgG, b	Sekundär-AK	Ziege	Kaninchen	BA-1000	1 : 200	V. L.
IgG	⊖ Kontrolle	Maus		HK119-7M	1:75	BioGenex
IgG	⊖ Kontrolle	Kaninchen		HK408-7R	1 : 200	BioGenex

AK: Antikörper; mk: monoklonal; pk: polyklonal; IgG: Immunglobulin; b: biotinyliert; u.: und; V.L.: Vector Laboratories; ⊖: negativ.

#### 4.3.3 Immunhistochemische Markierung gegen Ki67

Für die immunhistochemische Markierung proliferationsaktiver Zellen wurden die Schnittpräparate in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (Tabelle 7). Anschließend erfolgte die Hemmung der endogenen Peroxidase mittels 180 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) und 20 ml 30 %igem Wasserstoffperoxid in einer Küvette mit Magnetrührer für 15 min bei Raumtemperatur sowie Abbruch der Reaktion durch Spülen in destilliertem Wasser. Die Antigen-Demaskierung wurde durch Einwirkung von Hitze (Mikrowelle, 600 Watt) in einem 10 mM Citratpuffer mit pH 6.0 für 12 min erreicht. Darauf folgte die Montierung der Objektträger in Coverplates® (Fa. Thermo Electron GmbH, Dreieich) sowie dreimaliges Spülen der Schnitte mit PBS/Triton. Für das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur mit Ziegen-Normal-Serum (normal goat serum - NGS; DAKO, Glostrup, Denmark) in einer Verdünnung von 1 : 5 mit PBS und 8 %igem Roti-Immunoblock inkubiert. Direkt im Anschluss wurde der mit PBS und 2 % Bovinem Serumalbumin (BSA) verdünnte Primärantikörper gegen Ki67 (DAKO,



Glostrup, Denmark) aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Maus IgG (BioGenex, Fremont, CA, USA) anstelle des Primärantikörpers in derselben Verdünnung verwendet. Zu Beginn des zweiten Versuchstages wurden die Schnitte für 30 min auf Raumtemperatur erwärmt und innerhalb dieser Zeit dreimal mit PBS/Triton gespült. Nachfolgend wurde ein biotinylierter Zweitantikörper Goat-anti-mouse IgG (Fa. VectorLabs, Burlingham, CA) in einer Verdünnung von 1 : 200 mit PBS und Ziegen-Normalserum für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute, dreimalige Spülung mit PBS/Triton, bevor ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex VECTASTAIN® Elite ABC Kit (Fa. VectorLabs, Burlingham, CA) ebenfalls für 30 min aufgebracht wurde. Nach dem Demontieren der Schnitte aus den Coverplates® wurden diese in eine Küvette mit destilliertem Wasser einsortiert. Die Farbentwicklung erfolgte in einer 3,3'-Diamino-benzidintetrahydrochlorid (DAB)-Gebrauchslösung für 8 min mit anschließendem Abbruch der Reaktion durch dreimaliges Spülen in destilliertem Wasser. Die Gegenfärbung wurde mit Hämalaun nach Meyer für 45 s sowie Bläuen für 10 min in Leitungswasser erreicht. Abschließend erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tabelle 8) und das Eindecken mittels Eindeckautomat (Leica Biosystems, Nussloch). Als Positivkontrolle für die Markierung mit Ki67 kamen Dünndarmschnitte von Hunden aus dem Sektionsgut des Instituts für Tierpathologie zur Anwendung (Sabattini et al. 2015). Die verwendeten Substanzen und deren Hersteller sowie die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen können Tabelle 9 und Tabelle 10 entnommen werden.

*Tabelle 7: Schema für das Deparaffinieren in Xylol sowie einer absteigenden Alkoholreihe.*

Reagenz	Konzentration	Zeit
Xylol	-	10 min
Xylol	-	10 min
Ethanol	100 %	3 min
Ethanol	100 %	3 min
Ethanol	96 %	3 min
Ethanol	96 %	3 min
Ethanol	70 %	3 min

*Tabelle 8: Schema für das Entwässern in der aufsteigenden Alkoholreihe sowie Vorbereitung für das Eindecken in Xylol.*

Reagenz	Konzentration	Zeit
Ethanol	70 %	3 min
Ethanol	96 %	3 min
Ethanol	96 %	3 min
Ethanol	100 %	3 min
Xylol	-	3 min
Xylol	-	3 min

*Tabelle 9: Alphabetische Auflistung der verwendeten Substanzen und deren Hersteller.*

Substanz	Hersteller/Lieferant	Artikelnummer
Aluminiumkaliumsulfat	Merck Millipore	1.01047
Aqua dest.	Wasseraufbereitungsanlage des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin (Fa. VEOLIA Water, Berlin)	
BSA	Sigma-Aldrich®	A9418-1006
Chloralhydrat	AppliChem	A4431
Citronensäure Monohydrat	Carl Roth	1818.1
DAB-Puffertabletten	Merck Millipore	1029240001
Ethanol	Berkel AHK	
Hämatoxylin	Merck Millipore	1.15938
Natriumiodat	Merck Millipore	6525
PBS-Puffertabletten	ChemSolute®	8435.0100
Roti®-Immunoblock	Carl Roth	T144.1.
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	ChemSolute®	1328.1000
Triton	Carl Roth	3051.3
VECTASTAIN® Elite ABC Kit	Fa. VectorLabs, Burlingham, CA	PK-6100
Wasserstoffperoxid	Merck Millipore	1.072.100.250
Xylol	TH.Geyer	371.5000
Ziegennormalserum	DAKO, Glostrup, Denmark	

Aqua dest.: aqua destillata; BSA: Bovines Serumalbumin; DAB: 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid; PBS: phosphate-buffered saline.

Tabelle 10: Alphabetische Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Menge/Verhältnis
ABC-Lösung (hergestellt aus VECTASTAIN® Elite ABC Kit)	Reagenz A	6 µm
	Reagenz B	6 µm
	PBS	500 µm
Blocklösung	PBS : Roti-Immunblock	1 : 10
	PBS/Roti-Immunblock : NGS	1 : 5
Citratpuffer	Lösung A (siehe unten)	13,5 ml
	Lösung B (siehe unten)	61,5 ml
	Triton (5 %ig)	7,5 ml
	Aqua dest.	Ad 750 ml
DAB-Gebrauchslösung	DAB-Puffertabletten	4 Stück
	Aqua dest.	200 µm
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %ig)	18 µm
Hämalaun nach Meyer	Aqua dest.	1000 ml
	Hämatoxylin	1 g
	Natriumiodat	0,2 g
	Aluminiumkaliumsulfat	50 g
	Chloralhydrat	50 g
	Citronensäure	0,5 g
Lösung A	Aqua dest.	1000 ml
	Citronensäure Monohydrat	21,01 g
Lösung B	Aqua dest.	1000 ml
	Tri-Natriumcitrat Dihydrat	29,41 g
PBS/BSA 2 %ig	PBS-Gebrauchslösung (siehe unten)	100 ml
	BSA	2 g
PBS-Gebrauchspuffer	Aqua dest.	2000 ml
	PBS-Puffertabletten	2 Stück
PBS/Triton 0,05 %ig	PBS-Gebrauchslösung (siehe oben)	495 ml
	Triton (5 %ig; siehe unten)	5 ml
Triton 5 %ig	PBS-Gebrauchslösung (siehe oben)	95 ml
	Triton	5 ml

Aqua dest.: aqua destillata; BSA: Bovines Serumalbumin; DAB: 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid; PBS: phosphate-buffered saline.

#### 4.3.4 Versuch der Färbung und Markierung von eosinophilen Granulozyten sowie Mastzellen in Mastzelltumoren

Eosinophile Granulozyten in kutanen MZT wurden zu einem substantiellen Anteil in der digitalen Zellkernzählung miterfasst (Abbildung 13).

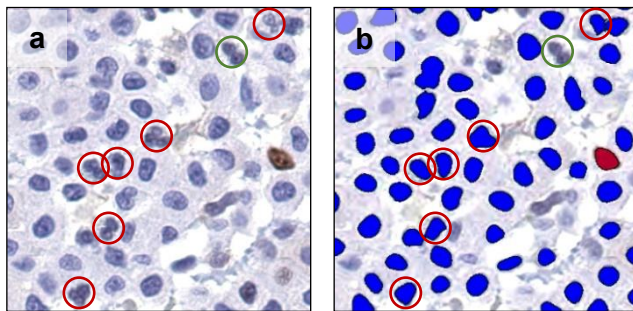


Abbildung 13: Mastzelltumor, Hund, Immunhistochemie gegen Ki67, DAB (braun), Hämalaun (blau). Eosinophile Granulozyten werden größtenteils in der digitalen Zellkernzählung miterfasst (rote Kreise). Nur wenige eosinophile Granulozyten werden vom Algorithmus

korrekt exkludiert (grüner Kreis). a) Gescanntes Schnittpräparat ohne Algorithmus; b) Gescanntes Schnittpräparat mit digitaler Zellkernerkennung, Tumorzellen mit negativem IHC-Signal (blau), Tumorzellen mit positivem IHC-Signal (rot).

Für die Korrektur der Gesamtkernzahl sollte die Anzahl von eosinophilen Granulozyten ermittelt und von der Gesamtzellzahl abgezogen werden. Parallel wurde auch eine separate Detektion der Mastzellen versucht, um so die Gesamtzellzahl der Tumorzellen bestimmen zu können. Hierfür wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Färbungen für eosinophile Granulozyten (Song et al. 2018, Gomes et al. 2013, Meyerholz et al. 2009) und Mastzellen (Takahashi et al. 2017) sowie eine immunhistochemische Markierung für eosinophile Granulozyten (Gomes et al. 2013) ausgetestet. Färbungen, bei denen keine spezifische Detektion von eosinophilen Granulozyten erreicht werden konnte, waren: Eosin, Kongorot, Luna (Tabelle 11). Zur Vorbereitung für die Färbungen wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert (Tabelle 7). Im Anschluss an die Färbungen wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert sowie anschließend in Xylol verbracht und eingedeckt (siehe Abschnitt 4.3.3 Immunhistochemische Markierung gegen Ki67). Mastzellen wurden mittels Toluidinblau und Kresylviolett angefärbt und ebenfalls wie beschrieben für die Färbungen vorbereitet mit anschließender Entwässerung und Eindeckung. Jedoch konnte keine ausreichend einheitliche Färbung der Schnitte erzielt werden, sodass eine belastbare digitale Erfassung und Zählung der Zellkerne nicht möglich war (Abbildung 14).

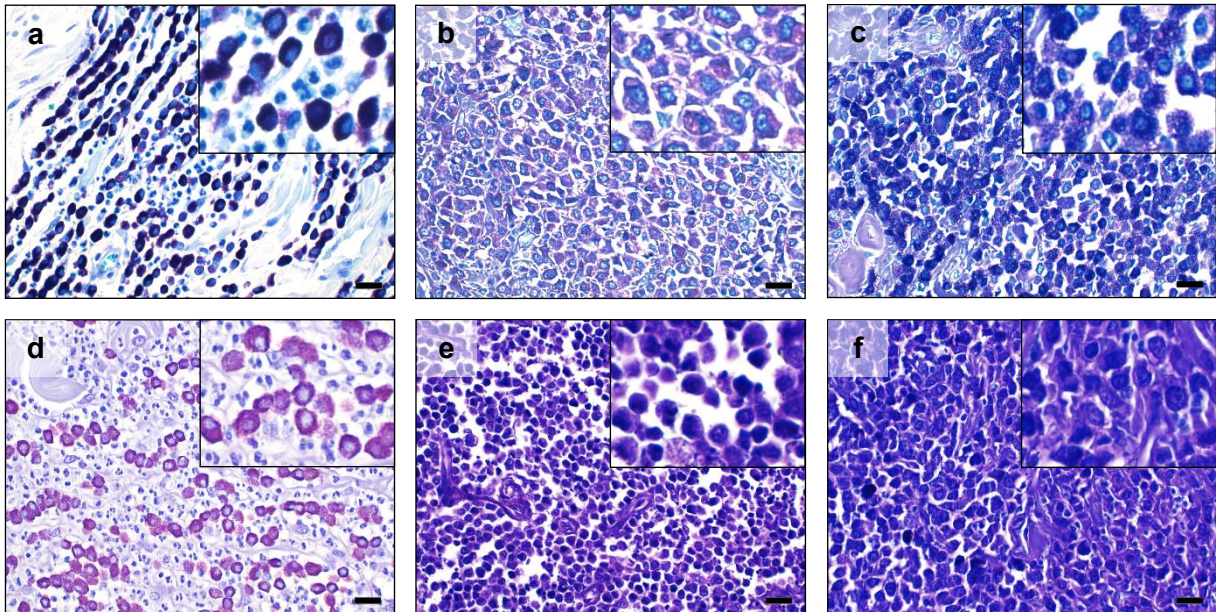


Abbildung 14: Spezialfärbungen für Mastzellen; a) Mastzellen heben sich deutlich von eosinophilen Granulozyten ab und eignen sich bei diesem Beispiel somit für eine digitale Quantifizierung, Einsendenummer E1908/18; b, c) die große Variabilität in der Färbintensität innerhalb einer Umfangsvermehrung sowie zwischen verschiedenen Tumoren bei den meisten MZT lässt keine belastbare digitale Quantifizierung zu, b) Einsendenummer E3554/18, c) Einsendenummer E4011/18; a - c: Toluidinblau; d) Auch mit Kresylviolett eignen sich nur einzelne Tumore für eine digitale Auswertung, Einsendenummer E1908/18; e) der Großteil zeigt jedoch vergleichbar mit der Färbung mit Toluidinblau eine starke Heterogenität der Färbintensität, Einsendenummer E3554/18; f) in einzelnen Tumoren sind die Zellgrenzen für eine digitale Zellzählung nicht präzise genug abgrenzbar, Einsendenummer E4011/18; d - f: Kresylviolett; Maßstab a - f: 20 µm.

Tabelle 11: Kurzprotokolle der Färbungen für eosinophile Granulozyten und Mastzellen.

Färbung	Detektierter Zelltyp	Kurzprotokoll
<b>Eosin</b>	Eosinophile Granulozyten	1. Eosin (0,1 %) mit Eisessig (1 Tropfen auf 100 ml Eosin): 10 min
		2. Spülen in Aqua dest.
		3. Differenzieren in Ethanol (80 %)
<b>Kongorot</b>	Eosinophile Granulozyten	1. Kongorotlösung (1 %): 25 min
		2. Einmaliges Eintauchen in gesättigte, wässrige Lithiumkarbonatlösung
		3. Entfärben in Ethanol (80 %)
		4. Spülen in Aqua dest.
		5. Häkalaun nach Meyer: 5 min
		6. Bläuen in Leitungswasser
<b>Luna</b>	Eosinophile Granulozyten	1. Häkalaun nach Meyer: 5 min
		2. Saurer Alkohol: 8-mal eintauchen
		3. Spülen in Leitungswasser
		4. Lithiumkarbonatlösung: 5-mal eintauchen
		5. Spülen in Leitungswasser
<b>Toluidinblau</b>	Mastzellen	1. Toluidinblaulösung (0,2 %): 5-10 min
		2. Spülen in Aqua dest.
		3. Differenzieren in Ethanol (96 %)
<b>Kresylviolett</b>	Mastzellen	1. Kresylviolettlösung (1 %): 5 min
		2. Differenzieren in Ethanol (96 %)

Aqua dest.: aqua destillata.

*Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Substanzen sowie deren Hersteller für die Färbung der eosinophilen Granulozyten und Mastzellen.*

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
Eisessig	Carl Roth	37.38.4
Eosin	Waldeck	20.140.01000
Hydrochlorid-Säure (3 %)	Carl Roth	26.07.1
Kongorotlösung	Carl Roth	0322.1
Kresylviolettlösung	Merck Millipore	1.092182500
Lithiumkarbonatlösung	Carl Roth	7324.2
Toluidinblaulösung	Carl Roth	0300.4

Ein Versuch für eine digitale Auswertung von MZT galt der Etablierung einer immunhistochemischen Markierung gegen eosinophile Peroxidase (Tabelle 6). Die Vorgehensweise entsprach dem bereits beschriebenen Protokoll für die immunhistochemische Markierung gegen Ki67. Zusätzlich zu einer Antigen-Demaskierung mittels Hitze in der Mikrowelle wurde parallel auch eine Demaskierung mit Protease (Merck Millipore) gelöst in PBS bei 37 °C für 10 min versucht. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1 : 100, 1 : 250 und 1 : 500 getestet und Goat-anti-rabbit IgG (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, CA) diente als Sekundärantikörper. Als Negativkontrolle wurden Kaninchen IgG (BioGenex, Fremont, CA, USA) anstelle des Primärantikörpers in einer Verdünnung von 1 : 100 jeweils einmal mit Hitze- und Proteasevorbehandlung verwendet. Als Positivkontrolle diente die Gewebeprobe einer eosinophilen Dermatitis. Ein spezifisches Signal konnte in keiner der durchgeführten Versuchsbedingungen erzielt werden.

#### **4.4 Zellkernzählung**

##### **4.4.1 Hardware und Digitalisierung der immunhistochemischen Schnittpräparate**

Für die digitale Analyse der immunhistochemisch markierten Schnittpräparate kam das Aperio Digital Pathology System der Firma Leica (Leica Biosystems Imaging Ins., CA, USA) zur Anwendung. Mit einem Aperio CS2 Slide-Scanner wurden die Schnittpräparate nach Trocknung des Eindeckmediums und Reinigung mittels 70 %igem Ethanol in 400-facher Vergrößerung gescannt.

### 4.4.2 Software und Analyse der digitalisierten Schnittpräparate

Im Anschluss an die Digitalisierung der Schnittpräparate wurde als Vorbereitung auf die Analyse das Tumorgewebe manuell annotiert und präexistente Strukturen, wie Haarfollikel, Blutgefäße und Bindegewebe, innerhalb des Tumors ausgespart. Die Quantifizierung der Ki67-positiven und Ki67-negativen Tumorzellen erfolgte anschließend mit dem Aperio nuclear v9 algorithm (Leica Biosystems Imaging Ins., CA, USA) (Abbildung 15 a-c). Hierfür wurde für jede der untersuchten Tumorarten unter Berücksichtigung von Varianzen in der Färbung sowie der Kerngröße oder -form innerhalb einer Tumorart eine Reihe von Algorithmen adaptiert (Abbildung 15 d-f; Tabelle 23). Für jeden einzelnen Schnitt wurde die Genauigkeit des jeweiligen Algorithmus überprüft, indem die Anzahl Ki67-positiv beziehungsweise Ki67-negativ markierter Tumorzellen innerhalb von zehn Tuning Windows, jeweils mit einer Breite von 125  $\mu\text{m}$  und einer Höhe von 110  $\mu\text{m}$ , manuell gezählt wurde. Mit einer Übereinstimmungsrate von manuellen und digitalen Ergebnissen von  $\geq 90\%$  wurde der jeweilige Algorithmus als geeignet angesehen (Dietert et al. 2018). Aus den Ergebnissen der digitalen Analyse wurden aus der Anzahl der Ki67-positiven und Ki67-negativen Tumorzellen der Ki67-labelling index in Prozent berechnet (Phillips et al. 2000).



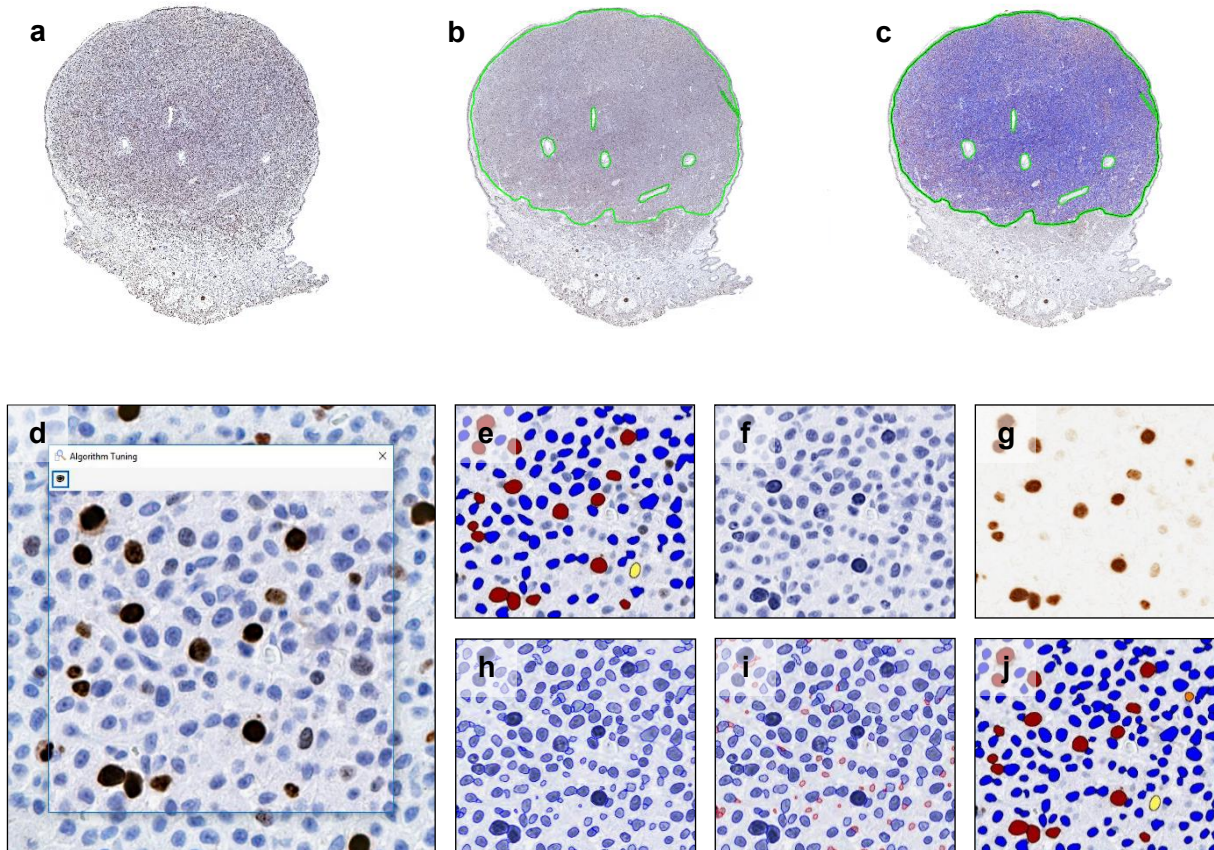


Abbildung 15: Digitalisierung sowie Erstellung eines Nuclear v9 Algorithmus zur Zellkernzählung am Beispiel eines Plasmozytoms, IHC für Ki67, DAB (braun), Hämalaun (blau); a) Übersicht des gesamten Tumorquerschnitts; b) Annotation des Tumorgewebes mit Ausschluss präexistenter Strukturen; c) Tumor nach Analyse mittels digitaler Zellkernzählung; d-j) Anpassung des Nuclear v9 Algorithmus auf eine spezielle Tumorart; d) das Tuning Window (125 x 110  $\mu\text{m}$ ) wird in 400-facher Vergrößerung auf einem geeigneten Bereich platziert; e) im Tuning Window wird das Analyseergebnis unter Verwendung der Standardeinstellungen angezeigt; f) Anpassung des Algorithmus auf die Gegenfärbung (Hämalaun); g) Anpassung des Algorithmus auf das immunhistochemische Signal (DAB); h) Identifikation der Zellkerne mit Möglichkeit der manuellen Anpassung des Schwellenwerts zum Trennen oder Zusammenfassen von zwei oder mehreren Zellkernen; i) Ausschluss von Zellkernen anhand der minimalen und maximalen Größe, Rundheit, Kompaktheit oder Länge der Zellkerne; j) Analyseergebnis des abschließend adaptierten Algorithmus, rot – stark positives Signal, orange – moderat positives Signal, gelb – schwach positives Signal, blau – Ki67-negative Zellkerne.

#### 4.4.3 Zellkernzählung in Mastzelltumoren

Wie bereits erwähnt, führte eine variable Anzahl von eosinophilen Granulozyten in kutanen MZT zu einer Verfälschung der Gesamtzellzahl und somit auch des Ki67-LI (Abbildung 13). Aufgrund dessen erfolgte die Analyse von MZT manuell. Hierfür wurden zehn Felder äquivalent zu zehn hpf bei 400-facher Vergrößerung und Sehfeldzahl 22 eines Standard-Okulars (Meuten et al. 2016) über die gesamte Tumorphäche verteilt annotiert (Abbildung 16 a). Dies ergab eine Größe von  $237\ 000\ \mu\text{m}^2 \pm 5\ 000\ \mu\text{m}^2$  pro Einzelfläche beziehungsweise eine Gesamtfläche aller zehn manuell analysierter Felder von  $2,37\ \text{mm}^2 \pm 0,05\ \text{mm}^2$  (Meuten et al. 2016). Eine Abweichung von den angestrebten  $2,37\ \text{mm}^2$  ergab sich durch die manuelle Erstellung der Felder. Die Ki67-positiven sowie Ki67-negativen Tumorzellen wurden anschließend manuell mit Hilfe der Ansichtsoftware Aperio ImageScope (Leica Biosystems Imaging Ins., CA, USA) markiert (Abbildung 16 b) und der Ki67-LI in Prozent äquivalent zu den digital analysierten Tumoren berechnet (Phillips et al. 2000).

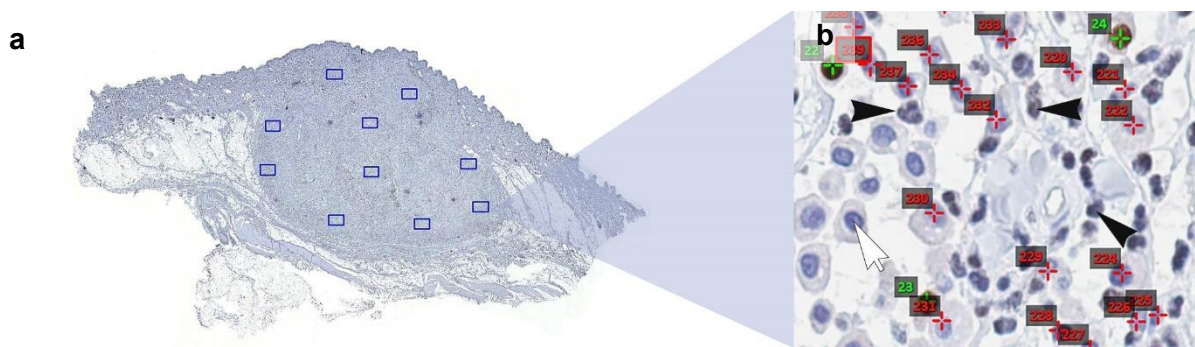


Abbildung 16: Quantifizierung der Tumorzellen von kutanen MZT, IHC für Ki67, DAB (braun), Hämalaun (blau); a) Auswahl von zehn über die gesamte Tumorphäche verteilten hpf; b) Markierung und Zählung der Ki67-negativen (rot) und Ki67-positiven (grün) Mastzellen, eosinophile Granulozyten werden ausgespart (schwarzer Pfeilkopf); weißer Pfeil – Mauszeiger bei der Erfassung einer Tumorzelle.

#### 4.5 Statistik

Die Software GraphPad Prism (Version 9.3.1 für Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) wurde sowohl für die statistische Auswertung der Analysedaten als auch für die graphische Darstellung genutzt. Normalverteilung der Daten des Ki67-LI war nicht gegeben, weshalb der dekadische Logarithmus angewandt wurde, der zu einer Normalverteilung der Daten führte. Für einen Vergleich von zwei Gruppen wurde ein zweiseitiger *t*-test verwendet. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-

way ANOVA) mit anschließenden Post-hoc-Mehrfachvergleichstests (Sidak's Korrektur) durchgeführt. Für die Identifikation von Assoziationen zwischen dem Patientenalter und dem Ki67-LI sowie der TumorgroÙe und dem Ki67-LI wurde eine lineare Regressionsanalyse ausgeföhrt. Die Daten werden nachfolgend als Median ( $\bar{x}$ ) mit der Spannweite (Range) bzw. als Median mit 95 % Konfidenzintervall [KI] angegeben. Bei einem P-Wert von  $P < 0,05$  wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen. Für die grafischen Darstellungen wurden die Rohdaten ohne logarithmische Transformation abgebildet. Hier wurden für die beschreibende Statistik des Alters und des Ki67-LI Balkendiagramme mit Abbildung des Median und 95 % Konfidenzintervall verwendet. Für die Gruppenvergleiche wurden Streudiagramme (Scatter-Plots) mit Darstellung des Medians mit 95 % Konfidenzintervall bzw. im Fall der linearen Regressionsanalyse Streudiagramme mit einer eingezeichneten Regressionskurve unter Verwendung der logarithmischen Daten erstellt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Studienpopulation

Anhand der vorab definierten Einschluss- und Ausschlusskriterien sowie der unterschiedlichen Häufigkeit des Auftretens bestimmter Tumorarten im Probenaufkommen des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin ergab sich eine unterschiedliche Anzahl Tiere in den einzelnen Gruppen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Gruppengrößen sowie detaillierte Informationen zum Alter und Geschlecht aller untersuchter Gruppen.

Tumor		Anzahl (n = 495)	Alter in Jahren, $\bar{x}$ (Range)	Geschlecht	
				w (i/k)	m (i/k)
MZT	Gesamt	70	8 (2-15)	36 (14/22)	34 (17/17)
	Patnaik Grad I	11	7 (4-13)	5 (0/5)	6 (5/1)
	Patnaik Grad II	39	7 (2-14)	23 (10/13)	16 (8/8)
	Patnaik Grad III	20	11 (6-15)	8 (4/4)	12 (4/8)
	Kiupel low grade	49	7 (2-14)	27 (10/17)	22 (13/9)
	Kiupel high grade	21	11 (6-15)	9 (4/5)	12 (4/8)
WGS	Gesamt	61	10 (5-15)	33 (15/18)	26 (16/10)
	Grad I	44	10 (5-15)	21 (8/13)	21 (13/8)
	Grad II	17	12 (6-15)	12 (7/5)	5 (3/2)
APD		95	10 (3-17)	20 (6/14)	74 (47/27)
PLA	Gesamt	86	9 (3-18)	29 (12/17)	57 (41/16)
	Kutan	42	9 (3-14)	15 (6/9)	27 (19/8)
	Mukokutan	29	9 (4-18)	11 (5/6)	17 (12/5)
	Digital	15	10 (5-13)	3 (1/2)	12 (9/3)
TRI		62	10 (2-15)	29 (12/17)	32 (21/11)
LZT		65	11 (2-15)	n. a.	65 (65/0)
SZT		56	11 (3-16)	n. a.	56 (56/0)

w: weiblich; m: männlich; i/k: intakt/kastriert; MZT: Mastzelltumor; WGS: Weichgewebssarkom; APD: Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen; PLA: Plasmozytom; TRI: Trichoblastom; LZT: Leydigzelltumor; SZT: Sertolizelltumor; n.a.: nicht auswertbar.

**Alter:** Das Alter der Hunde unterschied sich signifikant zwischen den verschiedenen Entitätengruppen (Abbildung 17). Innerhalb der gesamten Studienpopulation stellten Tiere mit niedrig bzw. moderat malignen MZT die jüngsten Patienten dar (MZT Grad I:  $\bar{x}$  = 7 a; MZT Grad II:  $\bar{x}$  = 7 a; MZT low grade:  $\bar{x}$  = 7 a). Die ältesten Gruppen wiesen mit absteigendem Alter folgende Tumorerkrankungen auf: WGS Grad II ( $\bar{x}$  = 12 a), hoch maligne MZT (MZT Grad III:  $\bar{x}$  = 11 a; MZT high grade:  $\bar{x}$  = 11 a) und Hodentumore (LZT:  $\bar{x}$  = 11 a; SZT:  $\bar{x}$  = 11 a).

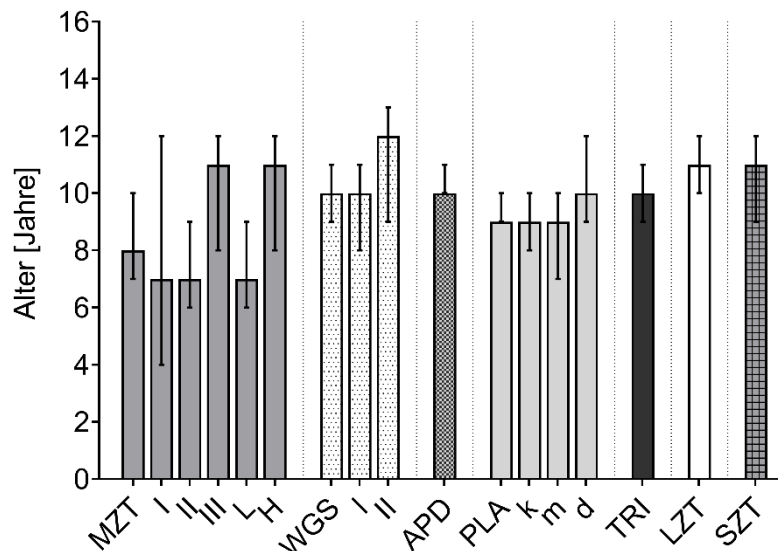


Abbildung 17: Altersverteilung innerhalb der verschiedenen Gruppen; ANOVA,  $P < 0,0001$ ; Balken: Median; Fehlerbalken: 95 % KI; I: Grad I; II: Grad II; III: Grad III; L: low grade; H: high grade; k: kutan; m: mukokutan; d: digital.

**Geschlecht und Kastrationsstatus:** Das Geschlechterverhältnis zwischen Hündinnen und Rüden in der Studienpopulation betrug ohne Berücksichtigung der Hodentumore 1 : 1,52. Unkastrierte Rüden bildeten insgesamt die größte Gruppe mit 142 Tieren (38 %) gefolgt von kastrierten Hündinnen ( $n = 88$ ; 24 %), kastrierten Rüden ( $n = 81$ ; 22 %) und unkastrierten Hündinnen ( $n = 59$ ; 16 %). Insbesondere in der Gruppe von Hunden mit APD waren unkastrierte Rüden deutlich überrepräsentiert ( $n = 47$ ; 50 %) mit deutlich geringerer Anzahl kastrierter Rüden ( $n = 27$ ; 29 %), während Hündinnen mit APD eine Minderheit bildeten (kastriert:  $n = 14$ ; 15 %; unkastriert:  $n = 6$ ; 6 %).

**Rasse:** Die gesamte Studienpopulation bestand aus insgesamt 105 verschiedenen Hunderassen. Dennoch stellten Mischlinge insgesamt mit 121 Individuen die größte Gruppe dar. Des Weiteren waren folgende Rassen gehäuft vertreten: Golden Retriever ( $n = 24$ ),

Labrador Retriever (n = 21), Jack Russell Terrier (n = 19), West Highland White Terrier (n = 13), Boxer (n = 12) und Yorkshire Terrier (n = 11).

**Ki67-LI:** Der Ki67-LI der einzelnen, untersuchten Tumorarten zeigte im Vergleich signifikante Unterschiede (Abbildung 18). Der höchste Ki67-LI konnte in PLA ( $\bar{x}$  = 14,9 %; 95 % KI [11,5-16,2]) und hoch malignen kutanen MZT (MZT Grad III:  $\bar{x}$  = 13,6 %; KI [8,2-17,3]; MZT high grade:  $\bar{x}$  = 13,3 %; KI [7,0-17,3]) nachgewiesen werden, wohingegen LZT ( $\bar{x}$  = 1,3 %; KI [1,1-1,5]) und APD ( $\bar{x}$  = 2,7 %; KI [2,1-3,5]) den niedrigsten Ki67-LI aufwiesen.

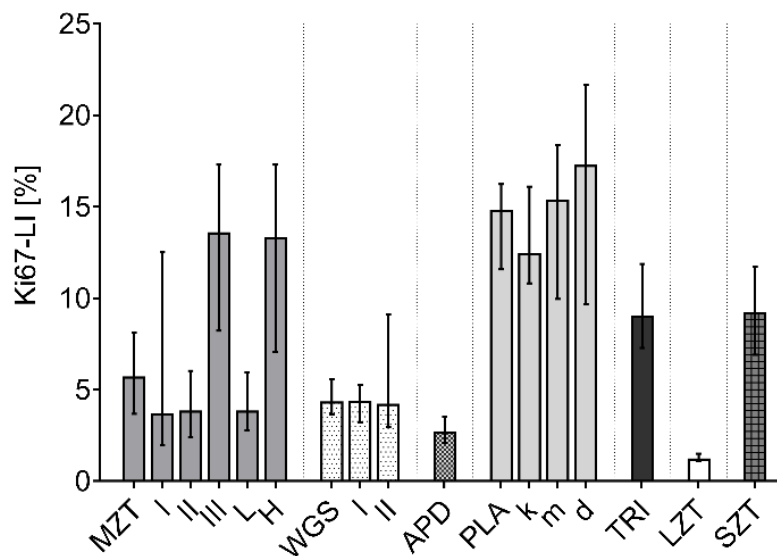


Abbildung 18: Ki67-labelling index (Ki67-LI) der verschiedenen untersuchten Tumorarten; ANOVA,  $P < 0,0001$ ; Balken: Median, Fehler-balken: 95 % KI; I: Grad I; II: Grad II; III: Grad III; L: low grade; H: high grade; k: kutan; m: mukokutan; d: digital.

Tumorarten, für welche in der Routinediagnostik üblicherweise Grading-Systeme zur Anwendung kommen (MZT, WGS), wurden zusätzlich auf Unterschiede des Ki67-LI zwischen den einzelnen Malignitätsgraden untersucht. Kutane MZT wiesen mit steigendem Malignitätsgrad einen signifikant höheren Ki67-LI auf ( $P < 0,001$ ) (Abbildung 19 a, b). Auffällig war jedoch, dass sich der Ki67-LI bei Anwendung des Grading-Systems von Patnaik lediglich zwischen Grad II und Grad III MZT bzw. zwischen low und high grade MZT signifikant unterschied. Hingegen wiesen Grad I und Grad II MZT einen nahezu identischen Ki67-LI auf. Darüber hinaus fiel eine deutliche Überlappung des Ki67-LI zwischen den einzelnen Tumorgraden sowohl nach Anwendung des Gradings von Patnaik als auch nach Anwendung des Gradings von Kiupel auf. Im Gegensatz dazu wies der Ki67-LI zwischen WGS Grad I und Grad II keine signifikanten Unterschiede auf ( $P = 0,189$ ) (Abbildung 19 c).



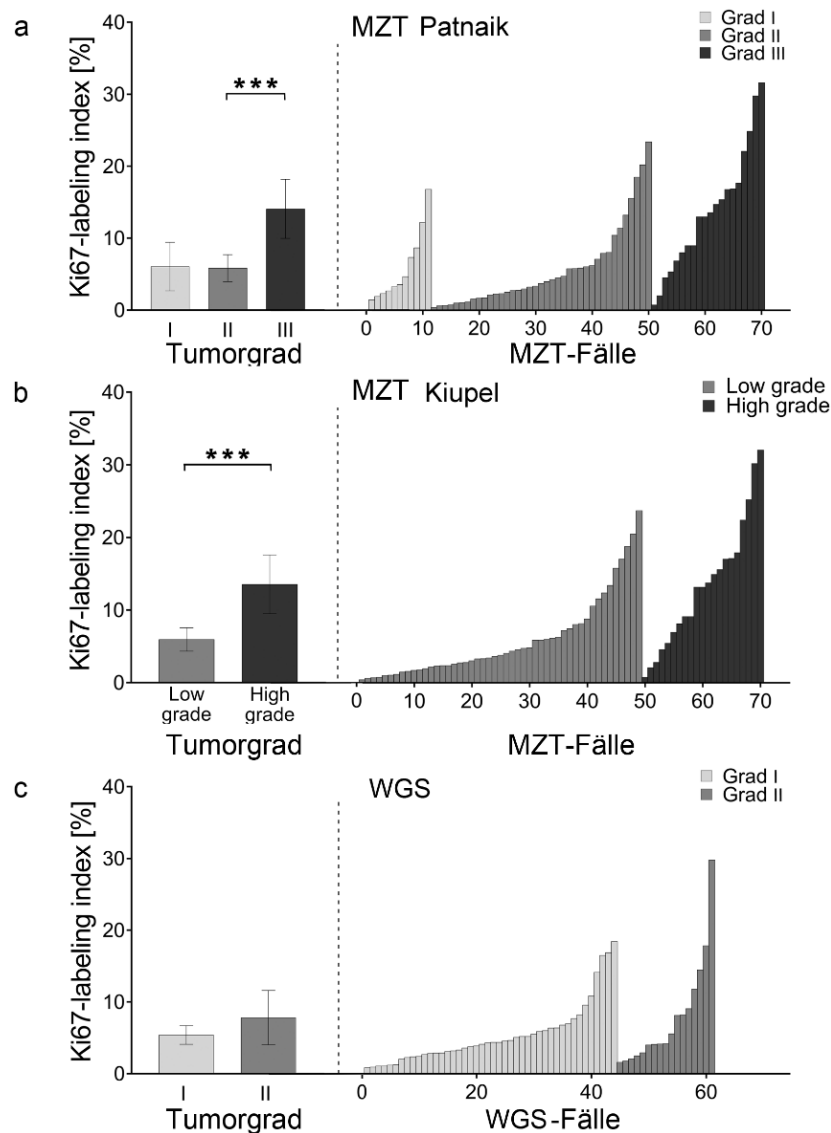


Abbildung 19: **a)** Links: Ki67-labeling Index (Ki67-LI) von Mastzelltumoren (MZT) gruppiert nach Malignität unter Anwendung des Grading-Systems von Patnaik (Patnaik et al. 1984);  $***P < 0,001$ . Rechts: Ki67-LI aller MZT Grad I bis III. **b)** Links: Ki67-LI von MZT gruppiert nach Malignität unter Anwendung des Grading-Systems von Kiupel (Kiupel et al. 2011);  $***P < 0,001$ . Rechts: Ki67-LI aller MZT low grade und high grade. **c)** Links: Ki67-LI von Weichgewebssarkomen (WGS) gruppiert nach Malignität unter Anwendung des Grading-Systems von Dennis (Dennis et al. 2011);  $P = 0,189$ . Rechts: Ki67-LI aller WGS Grad I und II.

## 5.2 Ki67-labelling index und Patientenalter

### 5.2.1 Assoziation des Ki67-labelling index mit dem Patientenalter, ohne Berücksichtigung des Geschlechts

Ein zentrales Ziel dieser Studie war die Assoziation des Patientenalters mit der Proliferation in Form des Ki67-LI. Hierbei konnte lediglich in der Patientengruppe mit APD ein signifikanter Zusammenhang des Ki67-LI mit dem Alter identifiziert werden. Der mediane Ki67-LI von 2,7 % stieg in dieser Tumorart pro zusätzlichem Lebensjahr in der Studienpopulation um das 1,08-Fache (95 % KI [1,01-1,16];  $P < 0,05$ ) (Abbildung 20).

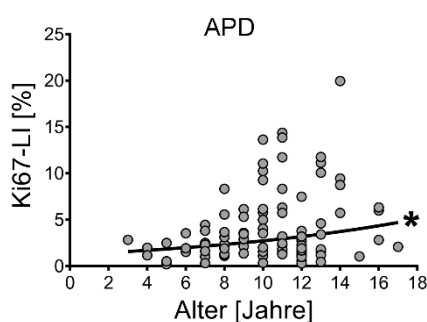


Abbildung 20: Assoziation des Ki67-labelling index (Ki67-LI) von Adenomen der hepatoiden perianalen Duftdrüsen (APD) mit dem Patientenalter; die Regressionskurve wurde anhand eines log-linearen Modells angepasst;  $*P < 0,05$ .

Der mediane Ki67-LI von 5,7 % kutaner MZT, ohne Berücksichtigung des Tumorgades, zeigte eine steigende Tendenz mit zunehmendem Patientenalter um den Faktor 1,07 pro Lebensjahr, jedoch ohne statistische Signifikanz (KI [0,98-1,16];  $P = 0,088$ ) (Abbildung 21 a). Diese Beobachtung konnte nach Unterteilung der Tumore in die Malignitätsgrade nach Kiupel (Kiupel et al. 2011) sowie nach Patnaik (Patnaik et al. 1984) nicht getätigt werden (Abbildung 31). MZT low grade wiesen lediglich einen geringen Anstieg des Ki67-LI um das 1,03-Fache pro Lebensjahr auf (KI [0,94-1,14];  $P = 0,487$ ) (Abbildung 21 b). Im Gegensatz dazu war bei MZT high grade eine leichte Abnahme des Ki67-LI um den Faktor 0,98 zu verzeichnen (KI [0,82-1,16];  $P = 0,769$ ) (Abbildung 21 c). Ähnlich dazu wiesen niedriger maligne MZT auch bei Anwendung des Tumor-Gradings von Patnaik nur einen geringen Anstieg des Ki67-LI auf (Grad I: Steigung 1,01; KI [0,83-1,23];  $P = 0,883$ ; Grad II: Steigung 1,04; KI [0,92-1,16];  $P = 0,518$ ) (Abbildung 21 d, e) wohingegen Grad III MZT eine Abnahme um das 0,96-Fache pro Lebensjahr aufwiesen (KI [0,81-1,13];  $P = 0,567$ ) (Abbildung 21 f).



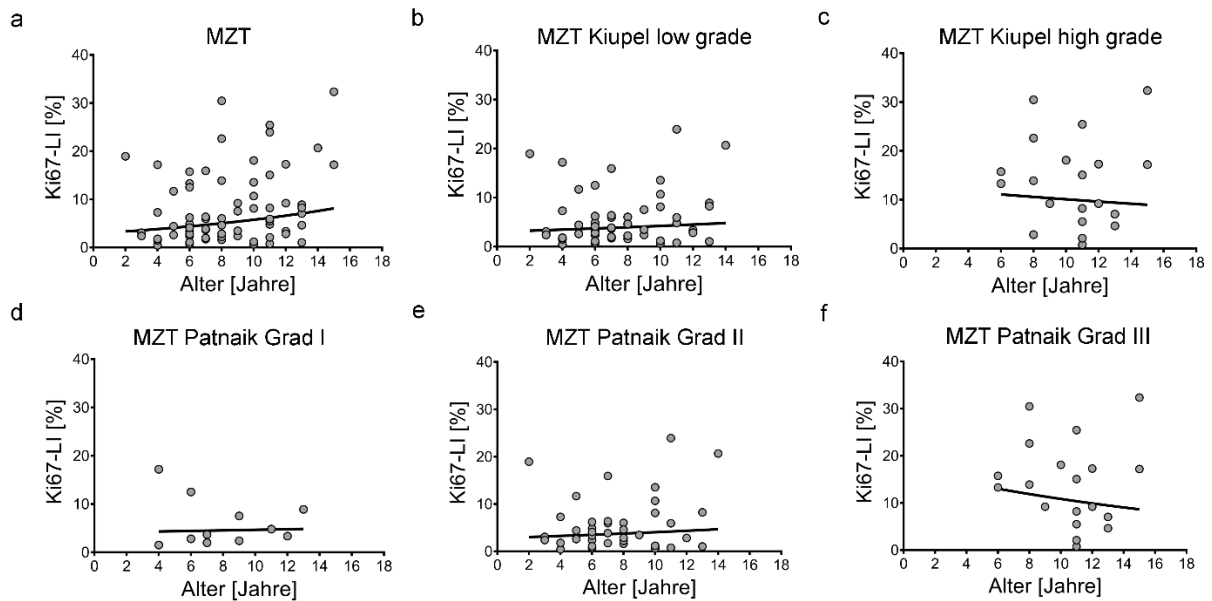


Abbildung 21 a-f: Ki67-labelling index (Ki67-LI) in Assoziation mit dem Alter von Hunden mit kutanen Mastzelltumoren (MZT); die Regressionskurven wurden anhand eines log-linearen Modells angepasst; **a**) Gesamtheit aller untersuchter MZT ohne Berücksichtigung der Tumorgade; **b, c**) Unterteilung nach Malignitätsgraden gemäß (Kiupel et al. 2011); **d-f**) Unterteilung nach Malignitätsgraden gemäß (Patnaik et al. 1984).

Darüber hinaus war bei keiner weiteren der untersuchten Tumorarten eine signifikante Korrelation zwischen dem Ki67-LI und dem Patientenalter nachweisbar (Anhang Abbildung 31; Tabelle 14).

Tabelle 14: Detaillierte Ergebnisse der Assoziation des Patientenalters mit dem Ki67-LI mittels linearer Regressionsanalyse.

Tumor		Anzahl	Ki67-LI in %, $\bar{x}$ (Range)	Steigung pro Lebensjahr	95 % Konfidenzintervall		P-Wert
					Untere Grenze	Obere Grenze	
MZT	Gesamt	70	5,7 (0,4-32,3)	1,07	0,98	1,16	0,088
	Patnaik Grad I	11	3,7 (1,5-17,2)	1,01	0,83	1,23	0,883
	Patnaik Grad II	39	3,9 (0,4-23,9)	1,04	0,92	1,16	0,518
	Patnaik Grad III	20	13,6 (0,8-32,3)	0,96	0,81	1,13	0,567
	Kiupel low grade	49	3,9 (0,4-23,9)	1,03	0,94	1,14	0,487
	Kiupel high grade	21	13,3 (0,8-32,3)	0,98	0,82	1,16	0,769
WGS	Gesamt	61	4,4 (0,9-29,8)	1,00	0,92	1,08	0,932
	Grad I	44	4,4 (0,9-18,5)	0,98	0,89	1,08	0,66
	Grad II	17	4,2 (1,6-29,8)	0,98	0,82	1,18	0,834
APD		95	2,7 (0,2-20,0)	<b>1,08</b>	1,01	1,16	<b>0,02</b>
PLA	Gesamt	86	14,9 (0,7-32,2)	0,99	0,94	1,05	0,753
	Kutan	42	12,5 (0,7-30,5)	0,98	0,91	1,06	0,61
	Mukokutan	29	15,4 (2,9-32,2)	0,99	0,91	1,08	0,889
	Digital	15	17,3 (3,8-32,2)	1,01	0,84	1,22	0,91
TRI		62	7,7 (0,7-22,7)	0,99	0,93	1,05	0,709
LZT		65	1,2 (0,1-19,1)	0,99	0,90	1,08	0,751
SZT		56	9,2 (0,6-29,1)	1,03	0,95	1,11	0,454

Ki67-LI: Ki67-labelling index; MZT: Mastzelltumor; WGS: Weichgewebssarkom; APD: Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen; PLA: Plasmozytom; TRI: Trichoblastom; LZT: Leydigzelltumor; SZT: Sertolizelltumor.

### 5.2.2 Assoziation des Ki67-labelling index mit dem Patientenalter, mit Berücksichtigung des Geschlechts

Weiterführend wurde die Studienpopulation nach dem Geschlecht der Tiere unterteilt und eine Assoziation des Patientenalters mit dem Ki67-LI untersucht. Hierbei wiesen männliche und weibliche Tiere mit APD deutliche Unterschiede in der Assoziation des Ki67-LI mit dem Alter auf. Während der mediane Ki67-LI von 2,9 % von Rüden signifikant um das 1,1-Fache pro Lebensjahr anstieg (KI [1,02-1,20;  $P < 0,05$ ]) (Abbildung 22 a), war bei Hündinnen eine leichte Abnahme des Ki67-LI um den Faktor 0,95 mit zunehmendem Alter zu beobachten (KI [0,83-1,08];  $\bar{x} = 2,3$  %;  $P = 0,375$ ) (Abbildung 22 b).

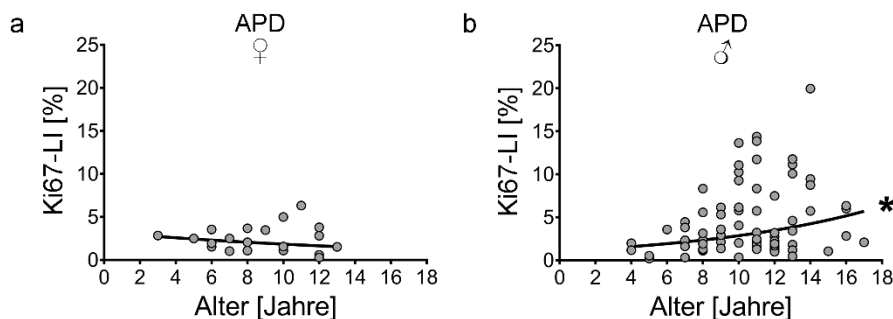


Abbildung 22 a, b: Assoziation des Ki67-labelling index (Ki67-LI) mit dem Patientenalter bei Rüden (a) und Hündinnen (b) mit Adenomen der hepatoiden perianalen Duftdrüsen (APD); die Regressionskurven wurden anhand eines log-linearen Modells angepasst; \* $P \leq 0,05$ .

In der Gruppe der Tiere mit kutanen MZT konnte nur bei Hündinnen ein signifikanter Anstieg des Ki67-LI um den Faktor 1,13 pro Jahr (KI [1,02-1,26];  $P < 0,05$ ) beobachtet werden (Abbildung 23 a). Bei der Unterteilung der MZT in low und high grade (Kiupel et al. 2011) beziehungsweise Grad I bis III (Patnaik et al. 1984) war dieser Effekt in allen Untergruppen lediglich mit einer leichten Tendenz ohne statistische Signifikanz vorhanden. Der Ki67-LI von MZT low grade stieg mit zunehmendem Alter um das 1,09-Fache (KI [0,96-1,24];  $P = 0,165$ ) (Abbildung 23 b), der Ki67-LI von MZT high grade sogar um das 1,11-Fache (KI [0,87-1,43];  $P = 0,341$ ) (Abbildung 23 c). Korrespondierend dazu wiesen Grad I und Grad II MZT jeweils einen Anstieg des Ki67-LI um den Faktor 1,09 pro Lebensjahr auf (MZT I: KI [0,75-1,57];  $P = 0,51$ ; MZT II: KI [0,93-1,27];  $P = 0,241$ ) (Abbildung 23 d-e; Tabelle 15). Der Ki67-LI von MZT Grad III stieg um das 1,03-Fache pro Lebensjahr (KI [0,8-1,32];  $P = 0,78$ ) (Abbildung 23 f).

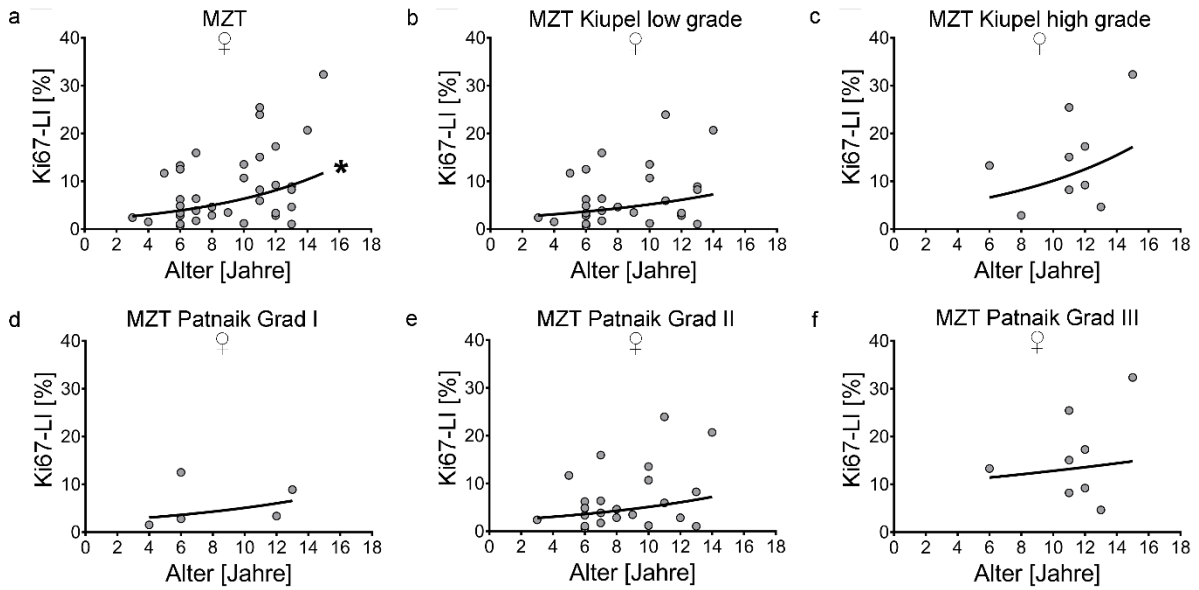


Abbildung 23 a-f: Assoziation des Ki67-labeling Index (Ki67-LI) mit dem Patientenalter bei Hündinnen mit kutanen Mastzelltumoren (MZT); die Regressionskurven wurden anhand eines log-linearen Modells angepasst; der Ki67-LI stieg signifikant mit zunehmendem Alter (a) oder zeigte unter Berücksichtigung des jeweiligen Tumorgades einen variabel ausgeprägten Anstieg pro Lebensjahr, jedoch ohne statistische Signifikanz (b-f); \* $P < 0,05$ .

Im Gegensatz dazu war der Ki67-LI von kutanen MZT bei Rüden mit einer Steigung von 1,0 pro Lebensjahr konstant (KI [0,87-1,14];  $P = 0,955$ ) (Abbildung 24 a). Bei Betrachtung der einzelnen Tumorgade der MZT konnte sogar eine Abnahme des Ki67-LI mit zunehmendem Alter festgestellt werden. Unter Anwendung des zweistufigen Grading-Schemas von Kiupel (Kiupel et al. 2011) betrug die Abnahme des Ki67-LI pro Lebensjahr das 0,91-Fache bei MZT low grade (KI [0,77-1,08];  $P = 0,238$ ) (Abbildung 24 b) und das 0,88-Fache bei MZT high grade (KI [0,67-1,14];  $P = 0,276$ ) (Abbildung 24 c).

Die stärkste Abnahme des Ki67-LI um den Faktor 0,86 pro Lebensjahr wiesen nach dem dreistufigen Grading-Schema von Patnaik (Patnaik et al. 1984) MZT Grad I auf (KI [0,57-1,31];  $P = 0,381$ ) (Abbildung 24 d), gefolgt von Grad III mit einem Faktor von 0,88 (KI [0,67-1,14];  $P = 0,276$ ) (Abbildung 24 f) sowie Grad II mit der geringsten jährlichen Abnahme des Ki67-LI um den Faktor 0,89 (KI [0,72-1,09];  $P = 0,22$ ) (Abbildung 24 e).

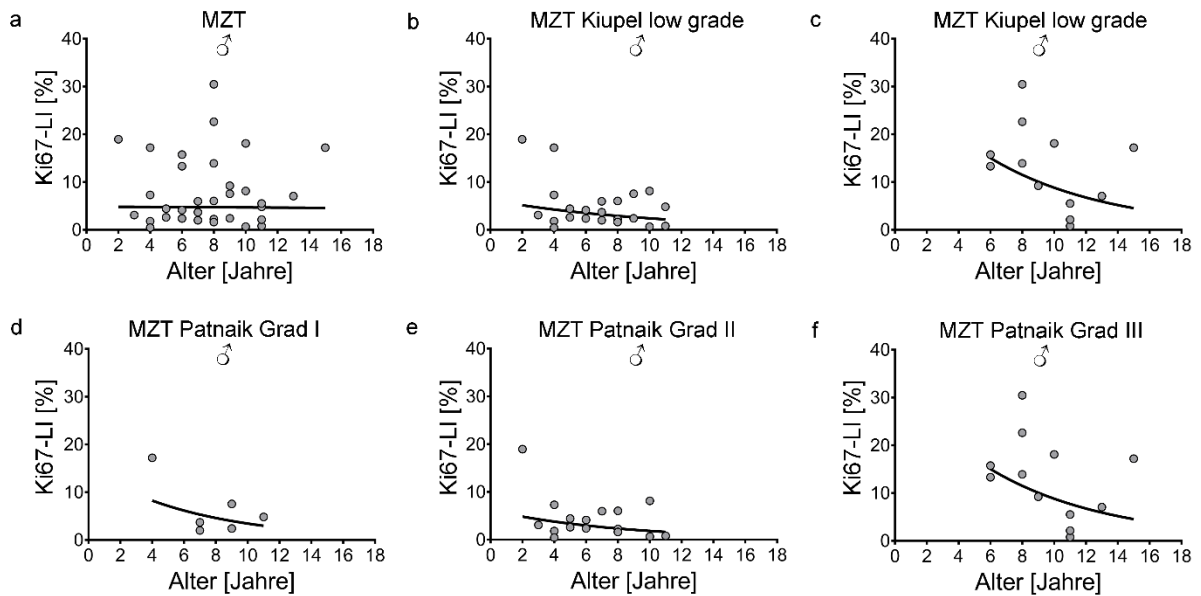


Abbildung 24 a-f: Assoziation des Ki67-labelling Index (Ki67-LI) mit dem Patientenalter bei Rüden mit kutanen Mastzelltumoren (MZT) ohne Berücksichtigung der Tumorgade (a) und nach Unterteilung gemäß (b, c) Kiupel (Kiupel et al. 2011) bzw. (d-f) Patnaik (Patnaik et al. 1984); die Regressionskurven wurden anhand eines log-linearen Modells angepasst.

Bei allen weiteren untersuchten Tumorarten fanden sich keine Assoziationen des Ki67-LI mit dem Patientenalter unter Berücksichtigung des Geschlechts (Anhang Abbildung 32; Tabelle 15).

Tabelle 15: Detaillierte Ergebnisse der Assoziation des Patientenalters mit dem Ki67-LI mittels linearer Regressionsanalyse unter Berücksichtigung des Geschlechts der Hunde.

Tumor		Anzahl	Ki67-LI in %, $\bar{x}$ (Range)	Steigung pro Lebensjahr	95 % Konfidenzintervall		P-Wert
					Untere Grenze	Obere Grenze	
					w / m	w / m	
MZT	Gesamt	36 / 34	6,1 (0,7-32,3) / 5,2 (0,4-30,5)	<b>1,13</b> / 1,00	1,02 / 0,87	1,26 / 1,14	<b>0,019</b> / 0,955
	Patnaik Grad I	5 / 6	3,4 (1,5-12,5) / 4,2 (2,0-17,2)	1,09 / 0,86	0,75 / 0,57	1,57 / 1,31	0,51 / 0,381
	Patnaik Grad II	23 / 16	4,6 (0,7-23,9) / 2,9 (0,4-19,0)	1,09 / 0,89	0,93 / 0,72	1,27 / 1,09	0,241 / 0,22
	Patnaik Grad III	8 / 12	14,2 (4,6-32,3) / 13,6 (0,8-30,5)	1,03 / 0,88	0,80 / 0,67	1,32 / 1,14	0,78 / 0,276
	Kiupel low grade	27 / 22	4,6 (0,7-23,9) / 3,4 (0,4-19,0)	1,09 / 0,91	0,96 / 0,77	1,24 / 1,08	0,165 / 0,238
	Kiupel high grade	9 / 12	13,3 (2,9-32,3) / 13,6 (0,8-30,5)	1,11 / 0,88	0,87 / 0,67	1,43 / 1,14	0,341 / 0,276
WGS	Gesamt	34 / 26	4,5 (1,1-29,8) / 4,3 (0,9-16,6)	1,03 / 0,95	0,93 / 0,83	1,15 / 1,08	0,492 / 0,416
	Grad I	22 / 21	4,6 (1,1-18,5) / 4,2 (0,9-16,6)	1,06 / 0,88	0,94 / 0,74	1,19 / 1,04	0,307 / 0,112
	Grad II	12 / 5	4,2 (1,6-29,8) / 8,3 (1,8-11,8)	0,94 / 1,02	0,71 / 0,68	1,25 / 1,54	0,655 / 0,877
APD		20 / 74	2,3 (0,3-6,3) / 2,9 (0,2-20,0)	0,95 / <b>1,10</b>	0,83 / 1,02	1,08 / 1,20	0,375 / <b>0,014</b>
PLA	Gesamt	29 / 57	12,2 (2,9-30,5) / 16,1 (0,7-32,2)	0,99 / 0,98	0,91 / 0,91	1,07 / 1,05	0,796 / 0,526
	Kutan	15 / 27	12,2 (7,3-30,5) / 14,6 (0,7-27,1)	0,99 / 0,98	0,92 / 0,87	1,07 / 1,09	0,809 / 0,678
	Mukokutan	11 / 17	14,7 (2,9-24,6) / 16,5 (3,8-32,2)	0,96 / 0,98	0,80 / 0,89	1,15 / 1,09	0,603 / 0,74
	Digital	3 / 12	n. a. / 19,3 (3,9-32,2)	n. a. / 0,90	0,01 / 0,73	n. a. / 1,10	n. a. / 0,254
TRI		29 / 32	7,9 (0,1-22,7) / 7,7 (0,7-21,6)	0,96 / 1,02	0,88 / 0,94	1,04 / 1,12	0,284 / 0,561

Ki67-LI: Ki67-labelling index; w: weiblich; m: männlich; MZT: Mastzelltumor; WGS: Weichgewebssarkom; APD: Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen; PLA: Plasmozytom; TRI: Trichoblastom; n.a.: nicht auswertbar.

### **5.3 Assoziation des Ki67-labelling index mit dem Geschlecht und Kastrationsstatus**

Neben dem Alter wurden auch das Geschlecht und der Kastrationsstatus separat als mögliche patientenbezogene Einflussfaktoren auf den Ki67-LI betrachtet. Signifikante Unterschiede waren hier lediglich bei Tieren mit kutanen MZT und PLA bezogen auf den Kastrationsstatus nachweisbar (Tabelle 16; Tabelle 17).

Hierbei wies der Ki67-LI von Hündinnen mit MZT mit niedrigem (Kiupel low grade) bzw. moderatem (Patnaik Grad II) Malignitätsgrad Kastrations-assoziierte Unterschiede auf. Der Ki67-LI kastrierter Hündinnen war mit einem Median von 5,9 % (Kiupel low grade: KI [3,3-12,5]; Patnaik Grad II: KI [2,9-16,0]) Ki67-positiver Tumorzellen nahezu doppelt so hoch wie der Ki67-LI unkastrierter Hündinnen mit lediglich 3,1 % Ki67-positiver Tumorzellen (Kiupel low grade und Patnaik Grad II: KI [1,0-6,4];  $P < 0,05$ ) (Abbildung 25). Dieser Vergleich konnte zwischen dem Ki67-LI von Tieren mit niedrig malignen MZT (Patnaik Grad I) bzw. hoch malignen (Patnaik Grad III sowie Kiupel high grade) aufgrund zu geringer Tierzahlen nicht gezogen werden. Des Weiteren konnte ein Kastrations-assoziiertes Unterschied bei Rüden nicht nachgewiesen werden. Der Ki67-LI von MZT Grad II unkastrierter Rüden lag mit 3,6 % (KI [0,4-8,1]) nur leicht über dem Ki67-LI kastrierter Rüden mit 2,4 % (KI [0,6-19,0];  $P = 0,807$ ) (Abbildung 25). Vergleichbar damit lag der Ki67-LI von MZT low grade unkastrierter Rüden mit 4,1 % (KI [2,0-7,5]) ebenfalls leicht über dem Ki67-LI kastrierter Rüden mit 2,6 % (KI [1,6-6,0];  $P = 0,842$ ). Wie bei den Hündinnen waren auch hier die Gruppengrößen von MZT Patnaik Grad I bzw. Grad III sowie Kiupel high grade in einzelnen Gruppen zu gering für einen Vergleich.

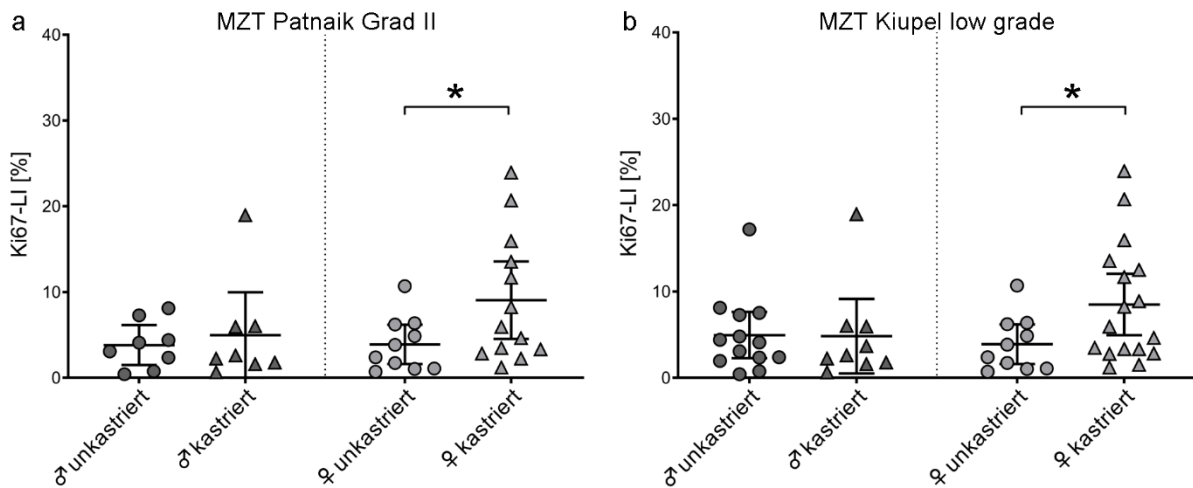


Abbildung 25: Vergleich des Ki67-labelling index (Ki67-LI) von kutanen Mastzelltumoren (MZT) Grad II (a) bzw. MZT Kiupel low grade (b) von unkastrierten und kastrierten Rüden und Hündinnen; \* $P < 0,05$ ; Scatter-Dot-Plot; Balken: Median; Fehlerbalken: 95 % Konfidenzintervall.

In der Gruppe der männlichen Tiere mit PLA wiesen unkastrierte Rüden einen 1,6-fach höheren Ki67-LI im Vergleich zu kastrierten Rüden auf (unkastriert:  $\bar{x} = 17,1$  %; KI [12,6-21,1]; kastriert:  $\bar{x} = 10,9$  %; KI [7,5-21,3];  $P < 0,05$ ). Auch bei Hündinnen konnte tendenziell ein höherer Ki67-LI unkastrierter Tiere von 15,1 % (KI [11,1-20,3]) identifiziert werden im Vergleich zu kastrierten Tieren ( $\bar{x} = 11,6$  %; KI [9,5-15,0]), jedoch ohne statistische Signifikanz ( $P = 0,205$ ) (Abbildung 26). Bei Unterteilung der PLA nach der Lokalisation erreichte der Vergleich keine statistische Signifikanz. Dennoch war der Ki67-LI kutaner und mukokutaner PLA von unkastrierten Rüden mit 16,1 % (KI [10,3-21,1]) beziehungsweise 17,4 % (KI [12,6-21,2]) deutlich höher als von kastrierten Rüden mit einem Ki67-LI von 9,8 % (KI [0,7-24,2];  $P = 0,063$ ) beziehungsweise 9,7 % (KI [3,8-24,4];  $P = 0,234$ ).



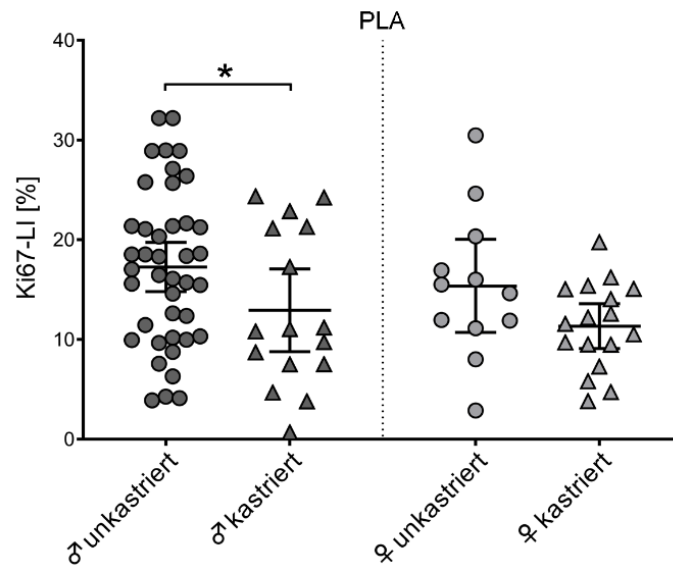


Abbildung 26: Vergleich des Ki67-labelling index (Ki67-LI) von Plasmazytomen (PLA) von kastrierten und unkastrierten Rüden und Hündinnen; \* $P < 0,05$ ; Scatter-Dot-Plot; Balken: Median; Fehlerbalken: 95 % Konfidenzintervall.

Die Assoziation des Ki67-LI mit dem Geschlecht und Kastrationsstatus der Hunde ergab bei den weiteren untersuchten Tumoren keine signifikanten Unterschiede (Anhang Abbildung 33; Tabelle 16; Tabelle 17).

Tabelle 16: Detaillierte Ergebnisse zur Assoziation des Ki67-LI mit dem Kastrationsstatus der Hündinnen.

Tumor		Anzahl Tiere	Ki67-LI in %, $\bar{x}$ (Range)	95 % Konfidenzintervall		P-Wert
				Untere Grenze		
		i / k	i / k	i / k	i / k	
MZT	Gesamt	14 / 22	4,8 (0,7-32,3) / 8,2 (1,2-25,4)	1,1 / 3,3	13,3 / 13,6	0,216
	Patnaik Grad I	0 / 5	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Patnaik Grad II	10 / 13	<b>3,1</b> (0,7-10,7) / <b>5,9</b> (1,2-23,9)	1,0 / 2,9	6,4 / 16,0	<b>0,04</b>
	Patnaik Grad III	4 / 4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Kiupel low grade	10 / 17	<b>3,1</b> (0,7-10,7) / <b>5,9</b> (1,2-23,9)	1,0 / 3,3	6,4 / 12,5	<b>0,042</b>
	Kiupel high grade	4 / 5	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
WGS	Gesamt	15 / 18	4,1 (1,1-17,9) / 5,4 (2,4-29,8)	2,1 / 3,8	7,7 / 10,9	0,095
	Grad I	8 / 13	4,0 (1,1-9,6) / 5,1 (2,4-18,5)	1,1 / 3,1	9,6 / 10,9	0,165
	Grad II	7 / 5	4,1 (1,6-17,9) / 5,6 (3,0-29,8)	2,0 / 1,9	5,7 / 4,6	0,288
APD		6 / 14	3,5 (1,1-5,0) / 1,8 (0,3-6,3)	1,1 / 1,0	5,0 / 2,8	0,173
PLA	Gesamt	12 / 17	15,1 (2,9-30,5) / 11,6 (3,8-19,8)	11,1 / 9,5	20,3 / 15,0	0,206
	Kutan	6 / 9	13,7 (8,0-30,5) / 12,2 (7,3-16,2)	8,0 / 9,5	30,5 / 15,1	0,27
	Mukokutan	12 / 5	14,7 (2,9-24,6) / 13,1 (4,7-19,8)	2,9 / 4,7	24,7 / 19,8	0,987
	Digital	9 / 3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
TRI		12 / 17	6,5 (1,3-22,7) / 8,1 (2,9-21,3)	2,6 / 5,9	17,5 / 13,7	0,232

Ki67-LI: Ki67-labelling index; i: intakt; k: kastriert; MZT: Mastzelltumor; WGS: Weichgewebssarkom; APD: Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen; PLA: Plasmozytom; TRI: Trichoblastom; n. a.: nicht auswertbar.

Tabelle 17: Detaillierte Ergebnisse zur Assoziation des Ki67-LI mit dem Kastrationsstatus der Rüden.

Tumor		Anzahl Tiere	Ki67-LI in %, $\bar{x}$ (Range)	95 % Konfidenzintervall		P-Wert
		i / k	i / k	i / k	i / k	
MZT	Gesamt	17 / 17	4,8 (0,4-22,6) / 6,0 (0,6-30,5)	2,4 / 2,1	8,1 / 13,9	0,921
	Patnaik Grad I	5 / 1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Patnaik Grad II	8 / 8	3,6 (0,4-8,1) / 2,4 (0,6-19,0)	0,4 / 0,6	8,1 / 19,0	0,807
	Patnaik Grad III	4 / 8	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Kiupel low grade	13 / 9	4,1 (0,4-17,2) / 2,6 (0,6-19,0)	2,0 / 1,6	7,5 / 6,0	0,842
	Kiupel high grade	4 / 8	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
WGS	Gesamt	16 / 10	4,1 (0,9-11,8) / 4,3 (0,9-16,6)	2,5 / 1,3	7,0 / 14,2	0,712
	Grad I	13 / 8	3,9 (0,9-8,3) / 4,3 (0,9-16,6)	1,2 / 0,9	5,6 / 16,6	0,506
	Grad II	3 / 2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
APD		47 / 27	3,1 (0,2-14,4) / 2,4 (0,3-20,0)	2,0 / 1,9	5,7 / 4,6	0,561
PLA	Gesamt	41 / 16	<b>17,1</b> (3,9-32,2) / <b>10,9</b> (0,7-24,4)	12,6 / 7,5	21,1 / 21,3	<b>0,033</b>
	Kutan	19 / 8	16,1 (4,3-27,1) / 9,8 (0,7-24,2)	10,3 / 0,7	21,1 / 24,2	0,063
	Mukokutan	5 / 6	17,4 (4,1-32,2) / 9,7 (3,8-24,4)	12,6 / 3,8	21,2 / 24,4	0,234
	Digital	1 / 2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
TRI		21 / 11	7,6 (0,7-21,6) / 7,9 (3,3-19,4)	4,5 / 3,9	13,3 / 18,7	0,787

Ki67-LI: Ki67-labelling index; i: intakt; k: kastriert; MZT: Mastzelltumor; WGS: Weichgewebssarkom; APD: Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen; PLA: Plasmoytom; TRI: Trichoblastom; n. a.: nicht auswertbar.

#### **5.4 Assoziation des Ki67-labelling index mit Körpergewicht und –größe**

Als letzte patientenbezogene Einflussfaktoren wurde die Abhängigkeit des Ki67-LI vom Körpergewicht sowie der Körpergröße untersucht. Aufgrund einer großen Anzahl von Mischlingen ohne Angabe von Körpergewicht oder -größe beziehungsweise fehlender Rasseinformationen bei einzelnen Tieren in der Studienpopulation waren die Tierzahlen zum Teil nicht ausreichend für eine statistische Auswertung. In den übrigen möglichen Vergleichen konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Ki67-LI und dem Gewicht oder der Größe der Tiere nachgewiesen werden (Anhang Abbildung 34 und Abbildung 35; Tabelle 18; Tabelle 19).

Tabelle 18: Ergebnisse der statistischen Analyse der Assoziation des Ki67-LI mit dem geschätzten Körpergewicht der Hunde.

Tumor		Anzahl Tiere				Ki67-LI in %, $\bar{x}$ (Range)				P-Wert
		<10kg	10 bis <20kg	20 bis <30kg	≥30kg	<10kg	10 bis <20kg	20 bis <30kg	≥30kg	
MZT	Gesamt	12	11	14	16	4,7 (0,6-19,0)	13,5 (1,1-22,6)	2,3 (0,4-17,2)	6,7 (0,8-30,5)	0,109
	Patnaik Grad I	2	1	5	1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Patnaik Grad II	7	5	4	12	3,3 (0,7-19,0)	13,5 (1,1-20,7)	n/d	5,2 (0,8-11,7)	0,404
	Patnaik Grad III	3	5	5	3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Kiupel low grade	9	6	9	12	4,1 (0,7-19,0)	8 (1,1-20,7)	2,2 (0,4-17,2)	5,2 (0,8-11,7)	0,355
	Kiupel high grade	3	5	5	4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
WGS	Gesamt	5	4	9	11	9,6 (3,6-29,8)	n. a.	3,3 (1,1-16,9)	5,2 (1,2-16,6)	0,115
	Grad I	4	1	7	10	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Grad II	1	3	2	1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
APD		28	8	11	19	3,8 (0,2-13,9)	3,1 (0,5-6,3)	2,5 (0,3-20,0)	1,7 (0,5-14,4)	0,346
PLA	Gesamt	20	11	21	12	17,2 (3,8-32,2)	14,7 (0,7-24,6)	12,2 (2,9-24,4)	16,8 (3,9-32,2)	0,1
	Kutan	8	5	10	5	14,8 (8,7-27,1)	15,1 (0,7-24,2)	13,4 (4,3-21,1)	11,5 (8,8-16,2)	0,516
	Mukokutan	8	5	6	3	15,7 (3,8-28,9)	12,6 (3,8-24,6)	15,7 (2,9-24,4)	n. a.	0,701
	Digital	3	1	5	4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
TRI		15	12	11	6	8,1 (0,7-21,3)	8 (3,9-17,6)	13,3 (2,5-21,6)	10,1 (4,1-22,7)	0,801
LZT		23	5	16	6	1,2 (0,2-19,1)	1,4 (0,7-2,4)	1,2 (0,3-4,8)	2,5 (0,4-8,3)	0,761
SZT		18	4	9	11	7,4 (0,6-27,9)	n. a.	7,2 (4,7-29,1)	7,5 (2-25,1)	0,631

Ki67-LI: Ki67-labelling index; MZT: Mastzelltumor; WGS: Weichgewebssarkom; APD: Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen; PLA: Plasmozytom; TRI: Trichoblastom; LZT: Leydigzelltumor; SZT: Sertolizelltumor; n. a.: nicht auswertbar.

Tabelle 19: Ergebnisse der statistischen Analyse der Assoziation des Ki67-LI mit der geschätzten Körpergröße der Hunde.

Tumor		Anzahl Tiere			Ki67-LI in %, $\bar{x}$ (Range)			P-Wert
		Klein	Mittel	Groß	Klein	Mittel	Groß	
MZT	Gesamt	22	19	12	6,5 (0,6-22,6)	3,7 (0,4-20,7)	4,1 (0,8-30,5)	0,784
	Patnaik Grad I	3	5	1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Patnaik Grad II	11	9	8	3,3 (0,7-19)	2,4 (0,4-20,7)	5,9 (1,7-11,7)	0,417
	Patnaik Grad III	8	5	3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Kiupel low grade	14	14	8	3,7 (0,7-19,0)	2,6 (0,4-20,7)	5,9 (1,7-11,7)	0,446
	Kiupel high grade	8	5	4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
WGS	Gesamt	8	11	10	9,4 (2,5-29,8)	5,1 (1,1-16,9)	4,8 (1,2-16,6)	0,145
	Grad I	4	9	9	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Grad II	4	2	1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
APD		34	14	18	3,4 (0,2-13,9)	1,9 (0,3-20,0)	2,2 (0,3-14,4)	0,389
PLA	Gesamt	31	27	6	15,5 (3,8-32,2)	14,6 (0,7-32,2)	19,3 (3,9-24,4)	0,285
	Kutan	13	14	1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Mukokutan	12	8	2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Digital	5	5	3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
TRI		24	11	9	7,7 (0,7-21,3)	13,3 (2,6-21,6)	12,0 (2,5-22,7)	0,425
LZT		27	17	6	1,2 (0,2-19,1)	1,3 (0,3-8,3)	2,0 (0,5-3,6)	0,589
SZT		20	12	10	7,9 (0,6-27,9)	8,7 (2,0-29,1)	7,7 (2,9-25,1)	0,702

Klein: <45 cm; mittel: 45 ≤ 60 cm; groß: >60 cm; Ki67-LI: Ki67-labelling index; MZT: Mastzelltumor; WGS: Weichgewebssarkom; APD: Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen; PLA: Plasmozytom; TRI: Trichoblastom; LZT: Leydigzelltumor; SZT: Sertolizelltumor; n. a.: nicht auswertbar.

## 5.5 Ki67-labelling index und Tumorcharakteristika

Neben dem Einfluss der bereits aufgeführten, patientenbezogenen Parameter auf die Proliferation wurde der Ki67-LI auch im Hinblick auf Charakteristika den Tumor selbst betreffend, wie Größe und Lokalisation, evaluiert.

### 5.5.1 Assoziation des Ki67-labelling index mit der Tumorgröße

Lediglich zwei der untersuchten Tumorarten waren durch eine Assoziation der Tumorgröße mit dem Ki67-LI gekennzeichnet, mit konträren Beobachtungen (Anhang Abbildung 36; Tabelle 20). Eine signifikante Korrelation des Ki67-LI mit der maximalen Tumordimension konnte bei kutanen MZT und APD beobachtet werden.

Der mediane Ki67-LI von 6,0 % von kutanen MZT nahm mit jedem zusätzlichen Zentimeter Tumorgröße um das 1,26-Fache zu (KI [1,1-1,5];  $P < 0,01$ ) (Abbildung 27 a). Nach Unterteilung der Tumore gemäß dem Grading von Kiupel (Kiupel et al. 2011) zeigte sich weiterhin eine Tendenz zu einem höheren Ki67-LI mit zunehmender Tumorgröße, jedoch ohne statistische Signifikanz. Low und high grade MZT wiesen eine Steigerung des Ki67-LI um 1,18 beziehungsweise 1,19 (MZT low grade: KI [0,95-1,48]; MZT high grade: KI [0,9-0,57]) pro zusätzlichem Zentimeter Tumorgröße auf (Abbildung 27 b, c). Bei der Betrachtung der MZT gemäß dem Grading von Patnaik (Patnaik et al. 1984) wiesen MZT Grad III den geringsten Anstieg des Ki67-LI mit zunehmender Tumorgröße mit einem Faktor von 1,15 auf (KI [0,86-1,53];  $P = 0,307$ ), gefolgt von MZT Grad II mit einem Anstieg um den Faktor 1,21 (KI [0,93-1,57];  $P = 0,137$ ). MZT Grad I zeigten mit einer Verdreifachung des Ki67-LI pro Zentimeter Tumorgröße den stärksten Anstieg, jedoch bei recht kleiner Gruppengröße von lediglich 10 Individuen (Steigung: 3,15; KI [1,15-8,59];  $P < 0,05$ ) (Abbildung 27 d-f).

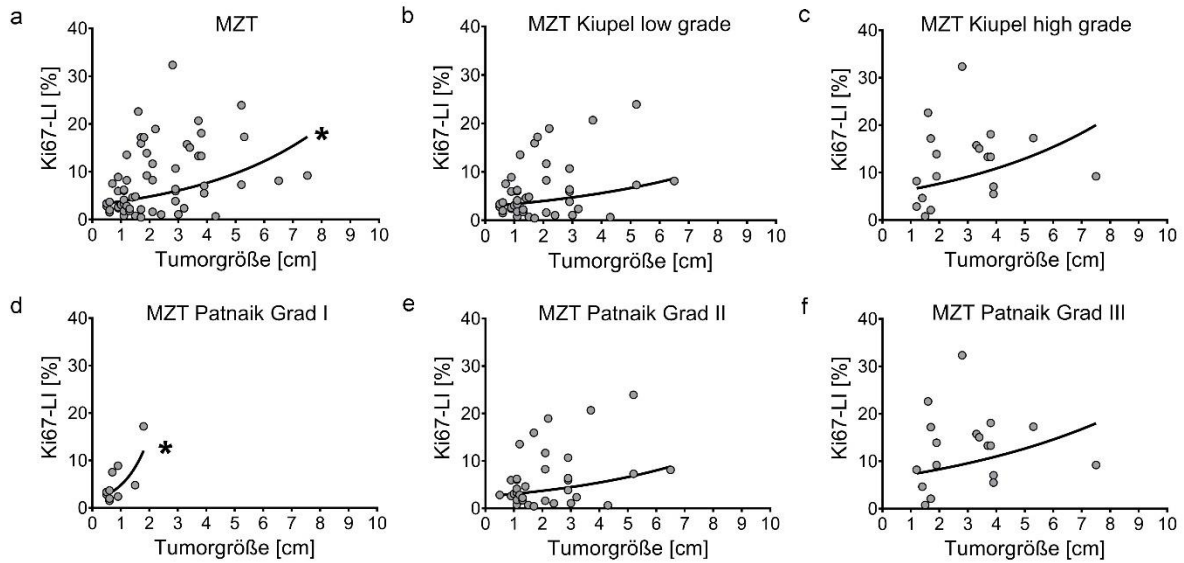


Abbildung 27: Assoziation der Tumorgröße mit dem Ki67-labeling-Index (Ki67-LI) von kutanen Mastzelltumoren (MZT) ohne Berücksichtigung der Tumorgrade (a) und unterteilt nach den Malignitätsgraden gemäß (b, c) Kiupel (Kiupel et al. 2011) und (d-f) Patnaik (Patnaik et al. 1984); die Regressionskurven wurden anhand eines log-linearen Modells angepasst;  $P < 0,05$ .

Im Gegensatz zu den MZT mit steigendem Ki67-LI bei zunehmender Tumorgröße nahm der Ki67-LI von APD signifikant ab. Der mediane Ki67-LI von 2,8 % sank in dieser Tumorart um den Faktor 0,76 pro Zentimeter Tumorgröße (KI [0,62-0,93];  $P < 0,01$ ) (Abbildung 28).

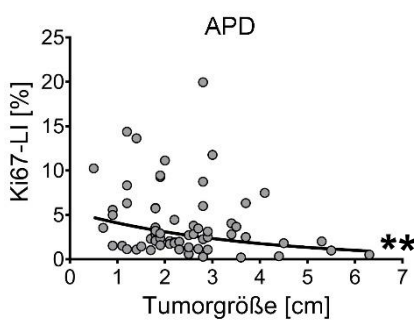


Abbildung 28: Assoziation der Tumorgröße mit dem Ki67-labeling-Index (Ki67-LI) von Adenomen der hepatoiden perianalen Duftdrüsen (APD); die Regressionskurve wurde anhand eines log-linearen Modells angepasst;  $P < 0,01$ .



Tabelle 20: Detaillierte Ergebnisse der Assoziation der Tumorgröße mit dem Ki67-LI mittels linearer Regressionsanalyse.

Tumor	Anzahl	Ki67-LI in %, $\bar{x}$ (Range)	Steigung pro cm Tumorgröße	95 % Konfidenzintervall		P-Wert	
				Untere Grenze	Obere Grenze		
MZT	Gesamt	62	6,0 (0,4-32,3)	<b>1,26</b>	1,07	1,49	<b>0,006</b>
	Patnaik Grad I	10	3,5 (1,5-17,2)	<b>3,15</b>	1,15	8,59	<b>0,03</b>
	Patnaik Grad II	34	4,0 (0,4-23,9)	1,21	0,93	1,57	0,137
	Patnaik Grad III	18	13,3 (0,8-32,3)	1,15	0,86	1,53	0,307
	Kiupel low grade	43	3,9 (0,4-23,9)	1,18	0,95	1,48	0,121
	Kiupel high grade	19	13,3 (0,8-32,3)	1,19	0,90	1,57	0,193
WGS	Gesamt	57	4,2 (0,9-29,8)	1,01	0,91	1,11	0,905
	Grad I	41	4,2 (0,9-18,5)	0,96	0,84	1,10	0,538
	Grad II	16	4,2 (1,6-29,8)	1,02	0,82	1,27	0,818
APD		64	2,8 (0,2-20,0)	<b>0,76</b>	0,62	0,93	<b>0,007</b>
PLA	Gesamt	58	15,6 (0,7-32,3)	1,17	0,92	1,49	0,19
	Kutan	37	14,6 (0,7-30,5)	1,22	0,90	1,65	0,186
	Mukokutan	13	16,5 (4,7-24,6)	1,21	0,69	2,12	0,467
	Digital	8	21,3 (10,0-32,2)	1,21	0,34	4,32	0,724
TRI		45	7,9 (0,7-22,7)	0,90	0,75	1,08	0,251
LZT		52	1,2 (0,2-19,1)	1,12	0,85	1,49	0,402
SZT		36	8,0 (0,6-27,9)	1,02	0,92	1,13	0,647

Ki67-LI: Ki67-labelling index; MZT: Mastzelltumor; WGS: Weichgewebssarkom; APD: Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen; PLA: Plasmoytom; TRI: Trichoblastom; LZT: Leydigzelltumor; SZT: Sertolizelltumor.

### 5.5.2 Assoziation des Ki67-labelling Index mit der Tumorlokalisation

Der Ki67-LI war in allen untersuchten Tumorarten mit Ausnahme von TRI unabhängig von der Lokalisation des Tumors, jedoch entfielen aufgrund mangelnder Gruppengrößen einzelne Vergleiche (Tabelle 21). TRI dieser Studie wurden hauptsächlich vom Kopf oder Hals der Tiere exzidiert (n = 48; 87 %) und nur sehr wenige Tumoren fanden sich an den Extremitäten (n = 6; 11 %) beziehungsweise am Rumpf (n = 1; 2 %). In der Regio inguinalis und perinealis traten keine TRI auf. Der Ki67-LI lag bei dieser Tumorart an den Extremitäten mit einem Median von 13,5 % (KI [9,1-21,3]) signifikant höher im Vergleich zu Tumoren aus dem Bereich des Kopfes oder Halses mit 6,9 % (KI [5,0-8,8];  $P < 0,05$ ) (Abbildung 29).

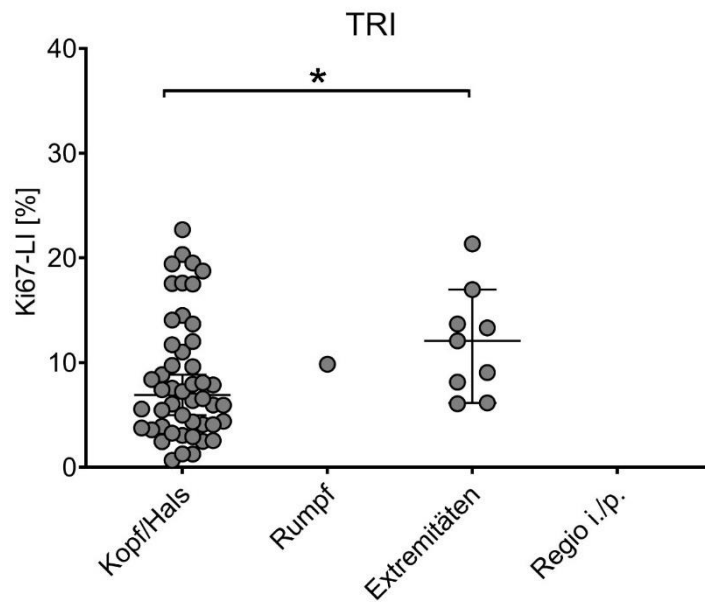


Abbildung 29: Vergleich des Ki67-labelling Index (Ki67-LI) von Trichoblastomen (TRI) an verschiedenen Lokalisationen; Regio i./p.: Regio inguinalis/perinealis; \* $P < 0,05$ ; Scatter-Dot-Plot; Balken: Median; Fehlerbalken: 95 % Konfidenzintervall.

In den übrigen möglichen Vergleichen konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Ki67-LI und der Tumorlokalisation identifiziert werden (Abbildung 37; Tabelle 21).

Tabelle 21: Ergebnisse der statistischen Analyse der Assoziation des Ki67-LI mit der Lokalisation der Tumore.

Tumor		Anzahl Tiere				Ki67-LI in %, $\bar{x}$ (Range)				P-Wert
		K/H	R	E	R. i/p	K/H	R	E	R. i/p	
<b>MZT</b>	Gesamt	6	26	21	9	2,7 (0,8-13,1)	6,1 (0,7-32,3)	5,9 (0,4-20,7)	5,5 (1,6-22,6)	0,497
	Patnaik Grad I	2	3	4	0	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Patnaik Grad II	3	13	14	5	n. a.	6,0 (0,7-23,9)	3,4 (0,4-20,7)	3,5 (1,6-7,3)	0,64
	Patnaik Grad III	1	10	3	4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
	Kiupel low grade	5	15	18	5	2,0 (0,8-7,5)	4,8 (0,7-23,9)	3,8 (0,4-20,7)	3,5 (1,6-7,3)	0,638
	Kiupel high grade	1	11	3	4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
<b>WGS</b>	Gesamt	3	11	38	4	n. a.	4,2 (1,1-18,5)	4,4 (0,9-29,8)	n. a.	0,806
	Grad I	2	8	28	2	n. a.	5,2 (1,1-10,9)	4,3 (0,9-16,9)	n. a.	0,588
	Grad II	1	3	10	2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
<b>PLA</b>	Kutan	19	10	11	2	15,1 (4,3-30,5)	12,8 (7,6-22,9)	12,6 (0,7-27,1)	n. a.	0,631
<b>TRI</b>		48	1	6	0	6,9 (0,7-22,7)	n. a.	13,5 (9,1-21,3)	n. a.	<b>0,025</b>

K/H: Kopf und Hals; R: Rumpf; E: Extremitäten; R. i/p: Regio inguinalis und perinealis; Ki67-LI: Ki67-labelling index; MZT: Mastzelltumor; WGS: Weichgewebssarkom; PLA: Plasmozytom; TRI: Trichoblastom; n. a.: nicht auswertbar.

### 5.6 Resektionsränder unterschiedlicher Tumorarten

Zuletzt wurden die Resektionsränder der einzelnen Tumorarten, mit Ausnahme der Hodentumore, miteinander verglichen. Die Breite des Resektionsrandes der Tumore wies zwischen den untersuchten Tumorarten signifikante Unterschiede auf ( $P < 0,0001$ ). Auffallend breite Resektionsränder konnten bei MZT mit einem Median von 1,2 cm ermittelt werden (KI [0,9-1,45]). Diese Beobachtung war unabhängig vom Malignitätsgrad der Tumore (Abbildung 30; Tabelle 22). So wiesen MZT Grad I und MZT high grade die breitesten Resektionsränder mit 1,3 cm (KI [0,3-4,0]) respektive 1,4 cm (KI [0,7-2,0]) auf, gefolgt von MZT Grad III und MZT low grade mit jeweils 1,2 cm (MZT Grad III: KI [0,7-2,0]; MZT low grade: KI [0,9-1,4]). Den geringsten Resektionsrand wiesen MZT Grad II mit 1,1 cm (KI [0,65-1,45]) auf. Im Gegensatz dazu wurden PLA sowie TRI mit nur sehr geringen Resektionsrändern von 0,2 cm (KI [0,05-0,35]) beziehungsweise 0,45 cm (KI [0,25-0,6]) reseziert. WGS und APD wurden in dieser Studie weitestgehend ohne Resektionsrand mit einem Median von jeweils 0,0 cm exziiert (WGS: KI [0,0-0,45]; APD: KI [0,0-0,05]).

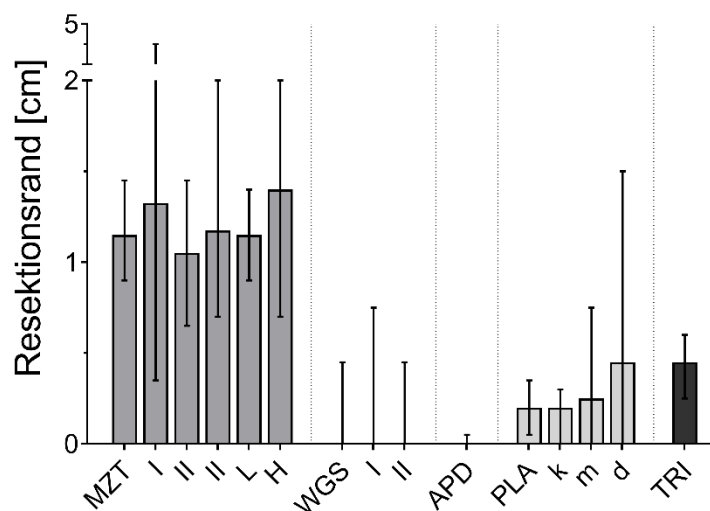


Abbildung 30: Resektionsränder der untersuchten Tumorarten in cm; ANOVA,  $P < 0,0001$ ; Balken: Median; Fehlerbalken: 95 % Konfidenz-intervall; ; I: Grad I; II: Grad II; III: Grad III; L: low grade; H: high grade; k: kutan; m: mukokutan; d: digital.

Tabelle 22: Resektionsränder der untersuchten Tumorarten

Tumor		Anzahl	Ki67-LI in %, $\bar{x}$ (Range)	95 % Konfidenzintervall		P-Wert (ANOVA)
				Untere Grenze	Obere Grenze	
MZT	Gesamt	62	1,15 (0,0-5,3)	0,9	1,45	< 0,0001
	Patnaik Grad I	10	1,33 (0,2-4,25)	0,35	4,0	
	Patnaik Grad II	34	1,05 (0,0-4,15)	0,65	1,45	
	Patnaik Grad III	18	1,18 (0,4-4,9)	0,7	2,0	
	Kiupel low grade	43	1,15 (0,0-4,45)	0,9	1,4	
	Kiupel high grade	19	1,4 (0,4-4,9)	0,7	2,0	
WGS	Gesamt	57	0,0 (0,0-2,65)	0,0	0,45	
	Grad I	41	0,0 (0,0-2,65)	0,0	0,75	
	Grad II	16	0,0 (0,0-0,95)	0,0	0,45	
APD		63	0,0 (0,0-2,5)	0,0	0,05	
PLA	Gesamt	58	0,2 (0,0-1,5)	0,05	0,35	
	Kutan	37	0,2 (0,0-1,3)	0,0	0,3	
	Mukokutan	13	0,25 (0,0-0,85)	0,0	0,75	
	Digital	8	0,45 (0,0-1,5)	0,0	1,5	
TRI		45	0,45 (0,0-2,0)	0,25	0,6	

Ki67-LI: Ki67-labelling index; MZT: Mastzelltumor; WGS: Weichgewebssarkom; APD: Adenom der hepatoiden perianalen Duftdrüsen; PLA: Plasmazytom; TRI: Trichoblastom.

## 6 Diskussion

---

Die Proliferation von Tumorzellen ist für Pathologen bei der Beurteilung vieler Tumorarten ein wichtiger Baustein, um den Malignitätsgrad eines Tumors zu beurteilen und dessen biologisches Verhalten einzuschätzen. Die Tumorzellproliferation wird hier entweder als unabhängiger, prognostischer Faktor verwendet (Laver et al. 2018, Sabbatini et al. 2015, Bergin et al. 2011, Laprie et al. 2001) oder kann auch Teil eines komplexen Grading-Schemas sein (Pena et al. 2013, Kiupel et al. 2011, McSparran 2009, Patnaik et al. 1984). Unberücksichtigt bei der Proliferationsbeurteilung bleiben in der Tiermedizin derzeit individuelle Faktoren, wie patienten- oder tumorbezogene Parameter, welche einen Einfluss auf die Proliferationsaktivität von Zellen haben können. Bereits bekannt ist, dass diese Faktoren sowohl bei Tieren als auch beim Menschen für Unterschiede in der Proliferation von gesunden Geweben verantwortlich sind (Kil et al. 2010, Xiao et al. 2001, Ogawa et al. 2000, Corazza et al. 1998, Roncucci et al. 1988). Auch bei ex vivo Kultivierung von Zellen ist das Spenderalter ausschlaggebend für die Frequenz und Dauer der Proliferationsaktivität der kultivierten Zellen (Lee et al. 2017, Phillips et al. 1994, Schultz und Lipton 1982). In der Onkologie sind beeinflussende Effekte auf die Proliferation für die Humanmedizin bereits für verschiedene Tumorarten beschrieben (Ha et al. 2016, Chang et al. 2015, Aloysius et al. 2010, Godballe et al. 1994) und vereinzelt werden Korrekturen von Tumorgradings basierend auf individuellen Parametern angestrebt (Teshiba et al. 2014, Diaz et al. 2013). In der Tiermedizin fehlen jedoch noch Studien, die diese Aspekte umfassend beleuchten. Dabei ist eine möglichst präzise Beurteilung des Malignitätsgrades, bei der die Proliferation bei den meisten Tumorarten eine tragende Rolle spielt (Laver et al. 2018, Bergin et al. 2011, Kiupel et al. 2011, Laprie et al. 2001, Patnaik et al. 1984), essenziell für eine erfolgreiche Prognose und Therapie. Vor dem Hintergrund eines vermehrt individualisierten Therapieansatzes stellt sich bereits bei Diagnosestellung durch den Tierpathologen die Frage, ob eine Optimierung der Malignitätsbeurteilung oder von Tumorgradings unter anderem durch eine Alters- oder Geschlechts-Korrektur der Proliferation erreicht werden kann. Als Beispiel könnte das bedeuten, dass ein Mastzelltumor Grad II (Patnaik et al. 1984) bei einem jungen Tier mit hoher basaler Proliferation als Grad I und im Gegensatz dazu derselbe Tumor bei einem alten Tier mit langsamer Proliferationsrate als Grad III eingestuft werden muss, oder umgekehrt.

Aufgrund der Assoziation der Tumorzellproliferation mit dem Alter oder Geschlecht der Patienten in der Humanmedizin werden auch für die Veterinär-onkologie vergleichbare Zusammenhänge zwischen patientenbezogenen Parametern und der Proliferation von Tumorzellen hypothetisiert. Daher war das Ziel dieser Studie, anhand von häufigen, kaninen Tumoren eine Assoziation zwischen der Tumorzellproliferation und patientenbezogenen

Parametern zu untersuchen und deren Ausmaß zu ermitteln. Bestandteil der Untersuchung waren folgende Eigenschaften der Hunde: Alter, Geschlecht, Kastrationsstatus, Körpergewicht/-größe. Darüber hinaus wurde die Fragestellung zusätzlich um Eigenschaften des Tumors, wie Größe und Lokalisation, erweitert. Um möglichst große Gruppen mit vielfältigen Eigenschaften zu erhalten, wurde diese Untersuchung als historische Studie mit Querschnittsdesign durchgeführt. Für die Detektion der Proliferation der Tumore wurde der häufig in der Forschung und Diagnostik verwendete Proliferationsmarker Ki67 gewählt (Goodlad 2017, Berlato et al. 2015, Bergin et al. 2011). Die immunhistochemisch markierten Schnitte wurden als vollständige Schnittbilder digital mit eigens angepassten Algorithmen ausgewertet und die Daten statistisch ausgewertet. Die Analyse von vollständigen Schnittbildern hat im Vergleich zu einer manuellen Zählung einzelner Regionen unter anderem den Vorteil, dass drastische Abweichungen in der Verteilung der proliferierenden Zellen zwischen verschiedenen Bereichen des Tumors ausgeschlossen werden können. Denn wie Bertram et al. festgestellt haben, hat die Wahl der Analyseregion durch den Untersuchenden einen substantiellen Einfluss auf das Ergebnis der Mitosenzählung (Bertram et al. 2020). Darüber hinaus ist durch eine digitale Bildanalyse von immunhistochemischen Signalen eine Reproduzierbarkeit der Daten mit sehr hoher Übereinstimmung gegeben (Dietert et al. 2018, Chen et al. 2014). Die hier verwendete Software wurde in der Vergangenheit erfolgreich für verschiedene andere Anwendungen mit Reproduzierbarkeitsraten von über 99 % eingesetzt (Dietert et al. 2018). Um eine optimale Genauigkeit der Auswertung zu erreichen, wurden im Rahmen dieser Studie für jede Tumorart eigene Algorithmen entwickelt und optimiert, indem diese für die spezifische Morphologie der Zellkerne der jeweiligen Tumorart angepasst wurden. Als weitere Vorteile entfallen durch die digitale Auswertung der hohe Zeitaufwand einer manuellen Zählung sowie Schwankungen zwischen unterschiedlichen Untersuchern oder unterschiedlichen Untersuchungen durch dieselbe Person (Stalhammar et al. 2018). Eine Ausnahme stellten hier die MZT dar. Diese Tumorart wurde in repräsentativen Bereichen manuell ausgezählt. Hier war eine digitale Auswertung aufgrund einer variablen Infiltration mit eosinophilen Granulozyten nicht belastbar möglich (Meuten 2017).

Zusammenfassend konnten mehrere, teils überraschende, statistisch signifikante Assoziationen zwischen dem Ki67-LI und einzelnen patienten- und tumorbezogenen Parametern identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eindeutig, dass die Proliferationsaktivität von Tumorzellen bei Hunden tatsächlich vom Alter, Geschlecht oder Kastrationsstatus des Patienten bzw. von der Tumorgröße oder -lokalisation abhängen kann. Wichtig ist jedoch, dass solche Zusammenhänge in hohem Maße tumorspezifisch sind und bei anderen Tumoren keine oder entgegengesetzte Assoziationen bestehen können. Noch komplexer wird es, wenn beobachtete Assoziationen mit Drittvariablen kombiniert werden, wie

z. B. die geschlechtsabhängigen Assoziationen des Ki67-LI mit dem Patientenalter bei MZT und APD zeigen. Dennoch konnte als wichtigste Schlussfolgerung dieser Studie anhand der Ergebnisse keine allgemeingültigen Assoziationen und Zusammenhänge eines der ausgewählten Parameter über alle untersuchten Tumorarten festgestellt werden.

Die Ergebnisse werden im Folgenden im Detail diskutiert und abschließend die Notwendigkeit zur Anpassung und Korrektur von Grading-Systemen unter Berücksichtigung der Parameter beleuchtet.

### **6.1 Patienteneigenschaften und Tumorproliferation – besteht ein Zusammenhang?**

#### **6.1.1 Alter**

Passend zur Hypothese dieser Studie und ähnlich wie für einzelne Tumorarten auch in der Humanmedizin beschrieben (Shen et al. 2014, Aloysius et al. 2010, Godballe et al. 1994) konnte für kutane Mastzelltumoren (MZT) und Adenome der hepatoiden perianalen Duftdrüsen (APD) ein Anstieg des Ki67-LI mit zunehmendem Patientenalter identifiziert werden. Interessanterweise war dieser Anstieg bei Hunden mit MZT lediglich bei Hündinnen signifikant. Im Gegensatz dazu war der Anstieg bei Hunden mit APD in der gesamten Population bzw. bei Rüden signifikant. Das jeweils andere Geschlecht, Rüden mit MZT und Hündinnen mit APD, zeigte sogar einen gegenläufigen Effekt mit einer Abnahme des Ki67-LI bei zunehmendem Patientenalter.

Als eine mögliche Ursache für diese Beobachtung muss man beachten, dass das Patientenalter bei einem gewissen Anteil in der Studienpopulation auch mit dem Alter des Tumors und dadurch auch mit der Dauer einer malignen Progression korrelieren kann. Diese Vermutung erscheint besonders für MZT plausibel, da für diese Tumorart das Risiko einer malignen Progression bereits beschrieben ist (Smiech et al. 2018, Mochizuki et al. 2017). Auch weisen ältere Hunde mit MZT kürzere Überlebenszeiten auf, wie Kiupel et al. zeigen konnte (Kiupel et al. 2005). Diese mögliche Erklärung wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Altersabhängigkeit schwächer wird, wenn die verschiedenen MZT-Grade getrennt analysiert werden. Im Gegensatz zu MZT konnten für WGS keine Assoziationen zwischen dem Ki67-LI und dem Alter, Geschlecht und Kastrationsstatus des Patienten bzw. Größe und Lokalisation des Tumors festgestellt werden. Dies ist im Hinblick auf mögliche Ursachen und Mechanismen solcher Zusammenhänge bemerkenswert. Wie auch MZT können WGS ein breites Spektrum maligner Prozedion durchlaufen, wobei für Diagnostik- und Prognosezwecke üblicherweise ein Klassifizierungsschema verwendet wird, das auch die Tumorzellproliferation in Form des Mitotic Count beinhaltet (Dennis et al. 2011, Stefanello et al. 2011, Ettinger et al. 2006).



Interessanterweise wurde sowohl bei WGS als auch bei MZT das Patientenalter als einzelner Parameter mit dem Krankheitsverlauf assoziiert und besitzt auch prognostische Relevanz (Moore et al. 2020, Smiech et al. 2017, Stefanello et al. 2011, Kiupel et al. 2005). Das Fehlen eines Zusammenhangs zwischen dem Ki67-LI und dem Alter, Geschlecht oder Kastrationsstatus des Patienten bzw. der Größe oder Lokalisation des Tumors im Fall von WGS deutet also darauf hin, dass es sich bei den für MZT beobachteten Assoziationen möglicherweise nicht um einfache und allgemein gültige Verbindungen zwischen Zeit, Tumorgöße und progressionsabhängiger Zunahme der Zellteilung handelt. Schlüssige Erklärungen für die Beobachtungen lassen sich derzeit nicht finden, insbesondere im Hinblick auf die eindeutig gegensätzlichen geschlechtsspezifischen Effekte des Patientenalters bei MZT und APD. Weitere Überlegungen sollten auch spezifische Faktoren von Vorläuferzellen der Tumoren einbeziehen, bei denen altersabhängige Effekte belegt sind (Xie et al. 2014).

Weitere mögliche Ursachen für eine erhöhte Proliferationsaktivität mit steigendem Alter kommen bei APD ins Spiel, da das Auftreten dieser Tumorart mit dem Vorhandensein von LZT assoziiert ist. Hepatoide perianale Duftdrüsen exprimieren Androgenrezeptoren, wobei die Expression in Adenomen im Vergleich zu normalen Drüsen erhöht ist (Pisani et al. 2006). Vor dem Hintergrund, dass APD gehäuft bei Rüden mit LZT auftreten, wird ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Androgenlevel und der Entstehung von APD vermutet (Hayes und Wilson 1977). Da unkastrierte Rüden mit steigendem Alter im Vergleich zu Hündinnen ein wesentlich höheres Risiko haben, an APD zu erkranken (Withrow 2013, Gross et al. 2005, Hayes und Wilson 1977), ist die in der vorliegenden Studie beobachtete Altersabhängigkeit des Ki67-LI ausschließlich bei Rüden nicht überraschend. Es erscheint naheliegend anzunehmen, dass erhöhte Androgenlevel durch LZT nicht nur die Inzidenz von APD fördern, sondern auch das Wachstum der Tumoren und ihre Proliferationsaktivität stimulieren. Dies würde auch die Geschlechtsunterschiede in der Altersabhängigkeit des Ki67-LI bei dieser Tumorart erklären. Ähnlich ist für kanine MZT-Zellen seit langem die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren bekannt (Elling und Ungemach 1982). Dennoch bleiben sowohl für APD als auch für MZT die Mechanismen unbekannt, die die Geschlechtsunterschiede mit der Altersabhängigkeit der Proliferationsaktivität verbinden.

### **6.1.2 Geschlecht**

Neben den bereits beschriebenen Effekten des Geschlechts im Zusammenhang mit dem Alter konnten auch nur auf das Geschlecht bzw. den Kastrationsstatus zurückzuführende Beobachtungen getätigt werden. Die Proliferationsaktivität von MZT Patnaik Grad II bzw. Kiupel low grade kastrierter Hündinnen war signifikant höher als von MZT unkastrierter Hündinnen. Diese Beobachtung legt nahe, dass bei MZT niedrigen oder intermediären Grades

für die Proliferationsaktivität neben dem Alter auch hormonelle Effekte der Kastration eine Rolle spielen. Bemerkenswerterweise ist diese Auswirkung des Kastrationsstatus das Gegenteil von dem, was aufgrund der beobachteten Unterschiede der Proliferationsaktivität zwischen dem weiblichen gegenüber dem männlichen Geschlecht zu erwarten gewesen wäre. Im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen konnten White et al. (2011) in einer Studie zu MZT Grad II und III jedoch feststellen, dass kastrierte Hündinnen generell ein höheres Risiko besitzen, diesen Tumor zu entwickeln. Passend dazu war in einer anderen Studie mit einer Studienpopulation bestehend aus Vizslas die Wahrscheinlichkeit, einen MZT zu entwickeln, bei kastrierten Tieren um das 3,5-Fache höher (Zink et al. 2014). Darüber hinaus stellten Kiupel et al. kürzere Überlebenszeiten von kastrierten Hunden mit MZT fest (Kiupel et al. 2005). Obwohl sich auch Hinweise aus der Literatur ergeben, dass die Kastration bei der Entstehung und Proliferation von MZT eine Rolle spielt, bleiben die komplexen hormonellen Zusammenhänge zunächst unklar.

Entgegengesetzt zu MZT war die Proliferationsaktivität von PLA bei Rüden signifikant höher im Vergleich zur Proliferationsaktivität von PLA bei Hündinnen. Interessanterweise war auch der Anteil Rüden mit PLA in der Studienpopulation 1,96-fach höher als der Anteil Hündinnen mit PLA. In einer Studie von Cangul et al. betrug vergleichbar dazu das Verhältnis von Rüden zu Hündinnen mit PLA 1,56 : 1 (Cangul et al. 2002), jedoch wurde hier die Proliferationsaktivität nicht untersucht. Obwohl diese Tumorart gehäuft bei männlichen Tieren aufzutreten scheint und zumindest in der Studienpopulation der vorliegenden Studie auch eine höhere Proliferationsaktivität bei Rüden hatte, bleiben auch hier die Mechanismen unbekannt, die zu den beobachteten Unterschieden beitragen.

### **6.1.3 Körpergewicht und Körpergröße**

Zwei weitere Patientenparameter, die in dieser Studie mit der Tumorzellproliferation assoziiert wurden, waren das geschätzte Körpergewicht sowie die Körpergröße in Form der Widerristhöhe der Hunde (Smiech et al. 2018). Hier zeigten die Untersuchungen bei keiner der ausgewählten Tumorarten einen Einfluss auf die Proliferationsaktivität. Viele Hunderassen sind jedoch durch Prädispositionen für die Entwicklung einer oder mehrerer spezifischer Tumorarten gekennzeichnet (Smiech et al. 2018, Mochizuki et al. 2017, Gruntzig et al. 2016), weshalb die Untersuchung dieser Parameter als relevant erachtet wurde. Allerdings sollte eine Kategorisierung der Tiere nicht nur nach Körpergewicht und -größe erfolgen, sondern vielmehr eine Einteilung auf Basis des genetischen Hintergrunds der einzelnen Rassen angestrebt werden. Eine solche Einteilung wurde unter Verwendung der Nomenklatur der Fédération Cynologique Internationale (FCI) in erster Linie eruiert, jedoch waren die Zahlen aufgrund der

großen Rassevielfalt in der Studienpopulation zu gering für eine zuverlässige statistische Analyse der Gruppen.

## **6.2 Mit welchen Parametern des Tumors selbst ist die Proliferation assoziiert?**

Neben Parametern, welche den Patienten allgemein betreffen, wurden auch Parameter des Tumors selbst wie Tumorgöße und Lokalisation in der Studie berücksichtigt.

Die stärksten Assoziationen innerhalb der gesamten Studie wurden zwischen dem Ki67-LI und der Tumorgöße bei zwei der untersuchten Tumorarten, MZT und APD, festgestellt. Diese Beobachtung war nicht unerwartet, da davon auszugehen ist, dass größere Tumore im Allgemeinen mehr Zeit für eine maligne Progression und die Akkumulation von Mutationen haben, welche die Zellteilung vorantreiben können (Hanahan und Weinberg 2011). Passend dazu weisen verschiedene Tumorarten beim Menschen mit zunehmender Tumorgöße eine höhere Proliferationsaktivität auf (Ha et al. 2015, Shen et al. 2014, Aloysius et al. 2010). Selbiges scheint auch eine nachvollziehbare Erklärung für die ausgeprägte Assoziation des Ki67-LI mit der Tumorgöße von MZT in dieser Studie zu sein. Für diese Tumorart ist bekannt, dass das Risiko einer steigenden Malignität im Laufe der Krankheitsdauer besteht (Smiech et al. 2018, Mochizuki et al. 2017). Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass der Effekt weniger ausgeprägt ist, wenn die verschiedenen MZT-Grade getrennt voneinander analysiert werden. Allerdings konnte eine solche Assoziation zwischen der Proliferationsaktivität und der Tumorgöße bei den ebenfalls malignen WGS nicht beobachtet werden. Jedoch waren in dieser Studie lediglich Tumore der Malignitätsgrade I und II vertreten, sodass hier kein adäquater Vergleich zwischen den beiden malignen Tumorarten in dieser Studie möglich war.

Bei APD, die im Allgemeinen keine maligne Prozeption durchlaufen, wurde jedoch eine gegenteilige Assoziation beobachtet. Hier wiesen größere Tumore eine signifikant geringere Proliferationsaktivität auf als kleinere Tumore. Man könnte bei den im Allgemeinen gutartigen APD mutmaßen, dass bei zunehmender Tumorgöße Faktoren wie Hypoxie oder steigender Druck die Proliferationsaktivität der Tumorzellen einschränken. Unbeantwortet bleibt jedoch die Frage, warum dieser Zusammenhang bei anderen gutartigen Tumoren, wie TRI oder PLA, in dieser Studie nicht beobachtet werden konnte. Zudem würden Effekte wie Hypoxie oder steigender Druck ebenso auf einen malignen Tumor mit zunehmender Größe wirken und damit im Gegensatz zu den Beobachtungen bei MZT stehen.

Hinsichtlich der Tumorlokalisierung konnte lediglich bei einer der untersuchten Tumorarten in dieser Studie ein signifikanter Zusammenhang mit dem Ki67-LI festgestellt werden. TRI an

den Gliedmaßen wiesen einen signifikant höheren mittleren Ki67-LI im Vergleich zu derselben Tumorart an Kopf oder Hals der Hunde auf. Als mögliche Ursache für die höhere Proliferationsaktivität an den Gliedmaßen kommt ein größeres Risiko für Traumatisierung aufgrund der vermehrten Exposition oder auch durch Automutilation (z.B. Belecken) in Frage. Ähnliche Effekte können auch bei mechanisch beanspruchtem Epithel oder Granulationsgewebe beobachtet werden. Andere Erklärungen für diesen Unterschied innerhalb derselben Tumorart an verschiedenen Lokalisationen am Körper erscheinen weit weniger schlüssig. Zudem spricht die große Überschneidung der Datenpunkte im Bereich hoher Proliferationsaktivität gegen zwei verschiedene Tumorentitäten, wie für Plattenepithelkarzinome an verschiedenen Lokalisationen beschrieben (Meuten 2017, Marino et al. 1995).

### **6.3 Assoziation der Proliferation mit Tumorgraden maligner Tumoren**

Neben den bereits beschriebenen Zusammenhängen war der Ki67-LI von MZT auch signifikant mit dem Tumorgrad assoziiert. Diese Beobachtung galt sowohl für die Einteilung der Tumore nach dem Patnaik- als auch nach dem Kiupel-Schema zum Grading von MZT (Kiupel et al. 2011, Patnaik et al. 1984). Erstaunlicherweise fielen zudem große Überschneidungen des Ki67-LI zwischen den aufeinanderfolgenden Tumorgraden auf. Die proliferationsaktivsten MZT niedrigerer Grade überschritten sich um etwa ein Drittel mit den am wenigsten proliferationsaktiven MZT des nächsthöheren Grades bzw. übertrafen diese sogar in ihrer Proliferationsaktivität. Sogar zwischen Patnaik Grad I und Grad III MZT konnte eine deutliche Überlappung festgestellt werden, was dafür spricht, dass der Ki67-LI allein ein deutlich schlechterer Prädiktor ist als die derzeit etablierten komplexen Klassifizierungsschemata von Patnaik (Patnaik et al. 1984) oder Kiupel (Kiupel et al. 2011). Ähnliche Beobachtungen sind bereits in der Literatur beschrieben, allerdings mit geringeren Überlappungen der Proliferationsaktivität zwischen den Graden I und III im Vergleich zu der Studienpopulation dieser Studie (Gil da Costa et al. 2007, Romansik et al. 2007).

Im Gegensatz dazu war der Ki67-LI von WGS nicht signifikant mit dem Tumorgrad assoziiert, was zumindest teilweise darauf zurückzuführen sein könnte, dass es in dieser Studie keine WGS vom Grad III gab. McSporran et al. haben jedoch eine signifikante Assoziation des MI mit dem Tumorgrad beschrieben, allerdings mit einer sehr viel größeren Studienpopulation von 139 Tieren (McSporran 2009). Dennoch war der Anteil an WGS Grad III mit lediglich 7 % sehr gering im Vergleich zu Grad I (51 %) und Grad II (42 %) WGS.

#### **6.4 Überraschende Zusammenhänge zwischen Breite des Resektionsrands und Tumorart**

Bei der Breite des Resektionsrands handelt es sich nicht um einen individuellen, biologischen Parameter des Patienten oder Tumors, wie die anderen untersuchten Parameter in dieser Studie, sondern er stellt einen menschengemachten Sicherheitsabstand zur eigentlichen Umfangsvermehrung dar. Das Vorhandensein bzw. die Breite des Resektionsrands sind für verschiedene Tumorarten beim Hund wichtige Faktoren zur Beurteilung des Risikos eines lokalen Rezidivs, wie beispielsweise bei kaninen Mammatumoren (Rasotto et al. 2017), Melanomen (Raleigh et al. 2021) und WGS sowie MZT (Scarpa et al. 2012). Aus diesem Grund wurden die Resektionsränder der verschiedenen untersuchten Tumorarten dieser Studie erfasst und miteinander verglichen, mit überraschenden Ergebnissen. Die Resektionsränder unterschieden sich signifikant in ihrer Breite und MZT wurden unabhängig vom Tumorgrad mit dem breitesten Sicherheitsabstand exzidiert. Je nach Studie werden für MZT von <4 cm Tumorgröße Resektionsränder von mindestens 1 cm (Sledge et al. 2016, Schultheiss et al. 2011) bzw. 2 cm (Selmic und Ruple 2020) empfohlen. Die in dieser Studie gemessenen, medianen Resektionsränder von MZT liegen mit 1,1-1,4 cm, je nach Tumorgrad, zwischen den Empfehlungen aus der Literatur. Es stellt sich also die Frage, ob vor Exzision die jeweilige Tumorart für den Chirurgen bereits bekannt war und deshalb die empfohlenen Sicherheitsabstände für MZT überwiegend eingehalten wurden. Ein wichtiges Hilfsmittel stellt hier eine der Exzision vorausgehende Feinnadelaspiration (FNA) dar, bei der MZT mit großer Sicherheit identifiziert (Sledge et al. 2016) und sogar Rückschlüsse auf den Grad gezogen werden können (Scarpa et al. 2016). Aufgrund dieser diagnostischen Möglichkeit und des relativ präzisen Einhaltens der Empfehlungen aus der Literatur erscheint es wahrscheinlich, dass einige oder sogar der Großteil der untersuchten MZT vorab mittels Zytologie diagnostiziert wurden. Hinzu kommt eine klinische Besonderheit des MZT. Einige, wenn auch nicht alle Tumore, zeigen insbesondere bei Manipulation eine massenhafte Degranulierung der Tumorzellen (Meuten 2017), welche makroskopisch als plötzliche Größenzunahme der Umfangsvermehrung sichtbar ist und ebenfalls Rückschlüsse auf die Tumorart zulässt.

Eine weitere überraschende Beobachtung bei dem Vergleich der Resektionsränder bestand darin, dass die ebenfalls malignen und bei unvollständiger Exzision häufig zu lokalen Rezidiven neigenden WGS (Milovancev et al. 2019) praktisch ohne Resektionsrand exzidiert wurden. Für eine Diagnose vor Exzision kann für diese Tumorart ebenfalls eine FNA durchgeführt werden, allerdings häufig mit mäßiger Genauigkeit (Lapsley und Selmic 2021, Akerman 1998). Zudem neigen WGS zu infiltrativem Wachstum und können bei nicht rechtzeitiger Exzision eine beträchtliche Größe erreichen (Chiti et al. 2021, Bray et al. 2014). Diese beiden Faktoren können eine vollständige chirurgische Entfernung des Tumors mit

ausreichend Sicherheitsabstand deutlich erschweren, was sich möglicherweise in den äußerst schmalen Resektionsrändern dieser Tumorart in dieser Studie widerspiegelt. Gleiches gilt für die Exzision von APD. Auch bei dieser Tumorart kann aufgrund der Lokalisation chirurgisch nicht immer ein breiter Resektionsrand realisiert werden, was bei dieser benignen Tumorart nicht klinisch indiziert ist, auch da eine Kastration in der Regel zu einer Tumorregression führt (Wilson und Hayes 1979). Allerdings sind differenzialdiagnostisch Adenokarzinome der apokrinen Analdrüsen zu berücksichtigen, mit hohem Metastasierungs- und Rezidivpotential (Bennett et al. 2002, Meuten et al. 1981), für die meist keine oder nur sehr schmale Resektionsränder realisiert werden können (Pradel et al. 2018). Jedoch kann auch hier vorab eine FNA Aufschluss über die vorliegende Umfangsvermehrung geben (Sabattini et al. 2019).

### **6.5 Methodenkritik**

Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns können Abweichungen aufgrund unterschiedlicher Behandlung des Gewebes vor der Einsendung an das Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin nicht ausgeschlossen werden. Die Zeit bis zur Fixierung sowie die Dauer der Fixierung können die Detektion von Ki67-positiven Zellen beeinflussen und zum Teil zu Unterschieden im Ki67-LI führen (Arima et al. 2016). Ab der Ankunft der Proben im Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin wurden diese einheitlich prozessiert, sodass eine verlängerte Fixierdauer oder Abweichungen in einzelnen Prozessschritten während der Einbettung ausgeschlossen werden können, welche ebenfalls den Ki67-LI beeinflussen (Arima et al. 2016). Jedoch war die Dauer der Lagerung des Gewebes im Archiv des Instituts variabel.

Eine weitere Limitation dieser Studie besteht in der manuellen Auszählung der Ki67-positiven und -negativen Kerne der MZT. Obwohl für den v9-Algorithmus ein breites Spektrum an Adaptationsmöglichkeiten zur Verfügung steht und mehrere Anpassungsrunden durchgeführt wurden, konnte überraschenderweise bei der Qualitätskontrolle kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. Die mit Hämalaun gefärbten eosinophilen Granulozyten konnten vom Algorithmus nicht sicher von apoptotischen oder fragmentierten, Ki67-negativen neoplastischen Mastzellen unterschieden werden. Dieses Problem trat bei keinem der anderen hier untersuchten Tumore auf. Aufgrund dessen mussten die Ki67-positiven und -negativen Kerne der MZT manuell wie beschrieben gezählt werden. Diese Vorgehensweise könnte die Vergleichbarkeit der Daten der MZT mit den Daten der anderen Tumore beeinträchtigt haben. Allerdings hat diese abweichende Art der Analyse keinen Einfluss auf die Schlussfolgerungen, da der Ki67-LI der einzelnen Tumorarten nicht quantitativ miteinander verglichen wurde.

Des Weiteren ist bei der Messung der Tumorgöße sowie des Resektionsrands nach Fixierung zu berücksichtigen, dass sich die Größe von Gewebestücken um bis zu 30 % während der Fixierung reduzieren kann (Reimer et al. 2005, Johnson et al. 1997). Aufgrund der einheitlichen Probenprozessierung kann allerdings von einem gleichmäßigen Fehler im Probenmaterial dieser Studie ausgegangen werden. Allerdings sei darauf hingewiesen, dass die gemessenen Tumorgößen und Resektionsränder dieser Studie je nach Vorgehensweise nicht uneingeschränkt mit den Daten aus anderen Studien vergleichbar sind.

Zuletzt ist auch die Auswahl der hier untersuchten Tumore kritisch zu betrachten. Das Ziel in dieser Studie war es, die Hypothese zunächst an mehreren, möglichst unterschiedlichen Tumorarten zu testen. Hierfür wurden häufige, kanine Tumore ausgewählt, die nach Anwendung der Ausschlusskriterien dennoch ausreichende Gruppengrößen ermöglichen würden. Gleichzeitig wurden Tumorarten mit möglichst homogener Morphologie bevorzugt, um das Risiko von Datenabweichungen aufgrund struktureller Heterogenität, wie beispielsweise bei Mammatumoren, zu reduzieren. Trotzdem gelang es nicht, für alle angestrebten Vergleiche ausreichende Gruppengrößen zu erzielen, sodass einige Vergleiche gar nicht möglich oder nur bedingt aussagekräftig waren. Auch ließ das explorative Studiendesign nur die Untersuchung einer Auswahl an häufigen, kaninen Tumoren zu.

## **6.6 Fazit zur Frage: Besteht die Notwendigkeit zur Berücksichtigung von patienten- oder tumorbezogenen Parametern in der Diagnostik?**

Schließlich stellt sich die Frage, ob in dieser Studie beobachtete Zusammenhänge zwischen patienten- sowie tumorbezogenen Parametern und dem Ki67-LI berücksichtigt werden sollten, wenn die Proliferationsaktivität für diagnostische und prognostische Zwecke quantifiziert wird, wie beispielsweise für MZT. Betrachtet man das Patientenalter so ist dieses, wie auch die Proliferationsaktivität, als unabhängiger Indikator für die Überlebenszeit bei verschiedenen kaninen Tumorerkrankungen anerkannt, darunter MZT, WGS, Melanome, intestinale Adenokarzinome und Mammatumore (Moore et al. 2020, Canadas et al. 2019, Smith et al. 2019, Laver et al. 2018, Stefanello et al. 2011). In dieser Studie konnten für einzelne Tumorarten eine Assoziation zwischen dem Patientenalter und dem Ki67-LI identifizieren. Folglich sprechen die Daten dafür, dass der prognostische Wert der Proliferationsaktivität bei einigen Tumorarten möglicherweise von einer Anpassung an das Patientenalter profitieren würde und bei Klassifizierungsschemata berücksichtigt werden sollte. Es stellt sich beispielsweise bei einer älteren Hündin mit einem MZT mit hoher Proliferationsaktivität die Frage, wie viel hierbei lediglich auf das Alter zurückzuführen ist und wie viel der Proliferationsaktivität zusätzlich zum Alter prognostische Relevanz hat. Für den Fall, dass die Proliferationsaktivität und das Alter beziehungsweise auch andere Eigenschaften des

Patienten abhängige prognostische Variablen sind, würden Klassifizierungsschemata wahrscheinlich von Korrekturen für Patientenparameter profitieren. Studien aus der Humanmedizin haben gezeigt, dass sowohl der MI als auch der Ki67-LI auch nach Korrektur für das Patientenalter belastbare und unabhängige Indikatoren für das Überleben der Patienten beispielsweise mit Brustkrebs oder Meningiomen sind (Puripat und Loharamtaweethong 2019, Colman et al. 2006).

Nach unserer Kenntnis wurde bisher noch bei keiner kaninen Tumorart getestet, ob die Anpassung von Mitoseindexen oder des Ki67-LI für das Patientenalter deren prognostische Aussagekraft verbessern kann. Unsere Beobachtung, dass die Proliferationsaktivität bei MZT von Hündinnen mit dem Patientenalter assoziiert ist, nicht aber bei WGS, obwohl die Proliferationsaktivität als auch das Alter bei beiden Tumorarten als prognostisch relevant angesehen werden, spricht dafür, dass solche Zusammenhänge vermutlich wie beim Menschen tumorspezifisch sind (Moore et al. 2020, Puripat und Loharamtaweethong 2019, Teshiba et al. 2014, Stefanello et al. 2011, Colman et al. 2006). Dennoch erscheint eine lückenlose und vollständige Aufklärung der Zusammenhänge unter Berücksichtigung der individuellen Unterschiede verschiedener Tumorarten weit entfernt. Dies beinhaltet insbesondere mögliche Handlungsempfehlungen zur konkreten Anpassung von Klassifizierungsschemata in der Diagnostik sowie deren Interpretation in Hinblick auf die Prognose für den einzelnen Patienten.

Bei der Frage nach der Notwendigkeit zur Berücksichtigung von patienten- oder tumorbezogenen Parametern sollten auch die von uns in dieser Studie gemessenen Effektgrößen und ein Vergleich mit dem Ausmaß der bekannten Unsicherheiten von häufig verwendeten Klassifizierungsschemata berücksichtigt werden. Beispielsweise erhöhte sich der mittlere Ki67-LI zwischen den jüngsten und den ältesten Hunden mit MZT innerhalb desselben Tumorgades um etwa das Doppelte. Gleiches gilt auch für den Effekt der Tumorgöße auf den Ki67-LI bei dieser Tumorart. Andererseits sollte auch das Ausmaß der bereits bekannten Unsicherheiten bei der routinemäßigen Quantifizierung der Proliferationsaktivität berücksichtigt werden. Dazu gehören unter anderem Schwankungen bei der Mitosenzählung durch unterschiedliche Untersucher oder denselben Untersucher zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Maier et al. 2020, Bertram et al. 2018, Meyer et al. 2009, Meyer et al. 2005) oder auch technische Artefakte, die während der Gewebeprozessierung verursacht werden können. Die Schwankungen bei der Mitosenzählung an HE-gefärbten Schnittpräparaten zwischen zwei verschiedenen Untersuchern können bis zu 35 % betragen (Malon et al. 2012). Als Beispiel für das Ausmaß eines technischen Artefakts kann der Ki67-LI durch eine Verzögerung der Fixierung von 16 h um bis zu 17 % niedriger sein (Arima et al. 2016). Stärker ist der Effekt durch eine ungenügende oder auch durch eine zu lange Fixierung.



Hier kann sich der tatsächliche Ki67-LI sogar um bis zu 60 % künstlich reduzieren (Arima et al. 2016). Im Vergleich dazu erscheinen die in dieser Studie ermittelten Effektgrößen von bis zu 100 % für Assoziationen des Ki67-LI mit dem Patientenalter oder der Tumorgröße recht hoch. Diese Ergebnisse sprechen für den Versuch, durch Berücksichtigung individueller Parameter der Patienten auf positive Auswirkungen zu testen oder dadurch sogar eine präzisere Diagnosestellung und Prognose zu erreichen. Jedoch können zum jetzigen Zeitpunkt keine allgemeingültigen Regeln für alle Tumorarten in Bezug auf die untersuchten Parameter definiert werden. Für die Diagnostik erscheint es demnach erforderlich, jeden Zusammenhang sowie mögliche Konsequenzen insbesondere in Hinblick auf die Prognose, für jede noch nicht berücksichtigte Tumorart gesondert zu testen. Dies gilt vor allem für Tumorarten, für die eine prognostische Relevanz der Proliferationsaktivität bereits nachgewiesen ist, wie z.B. kanine Lymphome oder Mammatumore (Pena et al. 2013, Valli et al. 2011).

### **6.7 Ausblick auf mögliche anschließende Untersuchungen**

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei den vorliegenden Beobachtungen in Bezug auf Assoziationen der Proliferationsaktivität mit dem Alter, Geschlecht, Kastrationsstatus, Tumorgröße und -lokalisierung um komplexe, tumorspezifische Zusammenhänge handelt, ähnlich wie für verschiedene Tumorarten beim Menschen bereits beschrieben (Ha et al. 2016, Chang et al. 2015, Shen et al. 2014, Aloysius et al. 2010, Godballe et al. 1994). Um jedoch die genauen prognostischen Vorteile einer individuellen Anpassung der Proliferationsaktivität zu eruieren, sind klinische, prospektive Langzeitstudien mit regelmäßigen Verlaufskontrollen inkl. Erfassung möglicher Rezidiven oder Metastasen sowie der Überlebenszeit getrennt für jede Tumorart empfohlen. Insbesondere ist bei einer derartigen Untersuchung auf ausreichend große Gruppen zu allen untersuchten Parametern zu achten, um komplexere statistische Tests mit multivariaten Analysen zu ermöglichen.

## 7 Zusammenfassung

---

### **Wie unabhängig ist die Proliferationsaktivität kaniner Tumorzellen?**

### **Assoziation des mittels digitaler Bildanalytik erhobenen Ki67-Labeling Index ausgewählter Hundetumore mit individuellen Patienten- sowie Tumorparametern**

Theresa C. Brömel (geb. Firsching)

Die Proliferationsaktivität von Tumorzellen ist ein essenzieller Baustein bei der pathologisch-mikroskopischen Beurteilung der Tumormalignität oder des Tumorgrads von Neoplasien sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin. In diesem Zusammenhang oder auch als unabhängiger Parameter ist die Proliferationsaktivität ausschlaggebend für die Prognose am jeweiligen Patienten. Die vermehrte Integration einer individualisierten Tumorthherapie, nicht nur in der Humanmedizin, macht eine präzise Diagnosestellung und Einschätzung der Proliferationsaktivität von Tumorzellen erforderlich. Allerdings werden individuelle Eigenschaften des Patienten hierbei bisher nicht berücksichtigt. Vor dem Hintergrund, dass sowohl gesunde Gewebe als auch ex vivo Kulturen und verschiedene Tumorarten beim Menschen und zum Teil auch bei Tieren eine alters- oder geschlechtsabhängige Proliferationsaktivität zeigen, drängt sich die Frage auf, warum der Einfluss dieser individuellen Eigenschaften bisher in der Diagnostik unberücksichtigt geblieben ist. Sollten individuelle patienten- oder tumorbezogene Parameter einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferationsaktivität von Tumorzellen haben, könnte weiterführend die Tumordiagnostik möglicherweise durch eine Alters- oder Geschlechts-Korrektur der Proliferation optimiert und präzisiert werden.

Aufgrund der bereits bekannten Alters- und Geschlechtsabhängigkeiten der Proliferationsaktivität in einzelnen humanen Tumorarten wurde auch für kanine Tumoren eine Assoziation zwischen patientenbezogenen Parametern und der Proliferation von Tumorzellen hypothesiert. Daher war das Ziel dieser explorativen Studie, anhand einer Auswahl von häufigen, kaninen Tumorarten vergleichbare Zusammenhänge zwischen patientenbezogenen Eigenschaften und der Tumorzellproliferation zu identifizieren. Zudem wurden die Eigenschaften mit bereits bekannten Abhängigkeiten (Alter, Geschlecht) um weitere Eigenschaften der Patienten (Kastrationsstatus, Körpergewicht/-größe) sowie der Tumoren (Größe, Lokalisation) erweitert. Die Tumorarten für diese Studie sollten häufige Vertreter kaniner Neoplasien sein und eine möglichst homogene Morphologie aufweisen. Hierauf basierend wurden folgende Tumorarten für die Studie ausgewählt: kutane Mastzelltumore

(MZT), Weichgewebssarkome (WGS), Adenome der hepatoiden perianalen Duftdrüsen (APD), Plasmazytome (PLA), Trichoblastome (TRI), Leydigzelltumore (LZT), Sertolizelltumore (SZT). Die Studie wurde retrospektiv an insgesamt 495 Tumoren aus dem histologischen Archiv des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin aus den Jahren 2010 bis 2018 durchgeführt. Für eine belastbare und reproduzierbare Identifikation proliferationsaktiver Tumorzellen wurde der häufig in der Forschung und Diagnostik verwendete Proliferationsmarker Ki67 gewählt, immunhistochemisch ermittelt und mittels digitaler Auswertung der gesamten Schnittbilder analysiert.

Als zentrales Ergebnis konnten keine allgemeingültigen Assoziationen und Zusammenhänge zwischen der Proliferationsaktivität der Tumorzellen und den untersuchten patienten- und tumorspezifischen Parametern identifiziert werden. Vielmehr handelt es sich bei den auffälligen Befunden eher um vereinzelte, tumorspezifische Beobachtungen. So konnte ohne Berücksichtigung des Geschlechts lediglich für APD eine Assoziation zwischen dem Ki67-LI und dem Patientenalter beobachtet werden mit zunehmendem Ki67-LI bei steigendem Alter. Nicht überraschend war hierbei nach zusätzlicher Unterteilung der Studienpopulation nach dem Geschlecht, dass diese Zunahme des Ki67-LI nur bei Rüden vorlag, der Ki67-LI bei Hündinnen jedoch mit dem Alter abnahm. Da APD vermehrt bei unkastrierten Rüden auftreten und häufig mit hormonproduzierenden Hodentumoren assoziiert sind, erscheinen die Unterschiede in der Proliferationsaktivität zwischen den Geschlechtern vorhersehbar. Eine vergleichbare Assoziation des Alters mit dem Ki67-LI beschränkte sich bei MZT auf Hündinnen. Allerdings erscheint bei dieser Tumorart eine weiter fortgeschrittene maligne Progression bei älteren Tieren als wahrscheinliche Ursache für diese Beobachtung. Weiterhin wurden Effekte des Geschlechts und der Kastration auf die Proliferationsaktivität untersucht. Obwohl hier signifikante Unterschiede in der Proliferationsaktivität zwischen kastrierten und nicht kastrierten Rüden mit PLA sowie Hündinnen mit MZT beobachtet werden konnten und sich zumindest für MZT Hinweise aus der Literatur ergeben, dass die Kastration bei der Entstehung und Proliferation eine Rolle spielt, bleiben die komplexen hormonellen Zusammenhänge in dieser Studie zunächst unklar. Als letzte Eigenschaften des Patienten wurde das Körpergewicht bzw. -größe der Hunde mit dem Ki67-LI assoziiert, jedoch wurden hier keine Zusammenhänge beobachtet. Die zuerst angestrebte Unterteilung der Tiere nach dem genetischen Hintergrund war aufgrund der geringen Gruppengrößen nicht möglich, wodurch potenzielle Assoziationen der Rasse mit dem Ki67-LI möglicherweise nicht aufgedeckt werden konnten. Ein weiterer Schwerpunkt der Studie lag auf der Assoziation von Eigenschaften der Tumoren mit dem Ki67-LI. Hier konnte eine signifikante Zunahme des Ki67-LI mit zunehmender Tumorgöße bei MZT identifiziert werden. Diese Beobachtung passt zu der Eigenschaft dieser und anderer maligner Tumorarten auch aus der Humanmedizin, im

Laufe der Krankheitsdauer eine maligne Progression zu durchlaufen mit Akkumulation von Mutationen, welche die Zellteilung vorantreiben können. Interessanterweise konnte für die benignen APD eine gegensätzliche Beobachtung getätigt werden, möglicherweise begründet in einer steigenden Hypoxie mit zunehmender Tumorgröße. Zuletzt wurden auch mögliche Effekte der Tumorlokalisation untersucht, welche jedoch ausschließlich bei TRI auftraten. Abgesehen von den erwähnten Beobachtungen fanden sich bei den ausgewählten Tumorarten keine weiteren Assoziationen zwischen patienten- oder tumorbezogenen Parametern und dem Ki67-LI.

Zusammengefasst lässt sich auf der Grundlage der Ergebnisse dieser explorativen Studie sagen, dass bei den untersuchten Tumorarten vereinzelt und abhängig von der Tumorart Assoziationen zwischen der Proliferationsaktivität und Eigenschaften des Patienten oder des Tumors vorliegen. Allerdings lassen sich hiervon keine allgemeingültigen Aussagen ableiten, insbesondere auch nicht auf mögliche positive Effekte durch eine Berücksichtigung dieser Eigenschaften bei der Anwendung von Tumorgradings. Für eine Adaptation oder Korrektur der Malignitätsbeurteilung in der Routinediagnostik sind anschließende Studien mit prospektivem Design notwendig. Dennoch hat diese Studie gezeigt, dass die Proliferationsaktivität von Tumoren in Einzelfällen signifikant mit Eigenschaften des Patienten oder des Tumors assoziiert sein kann. Vor dem Hintergrund einer immer personalisierteren Präzisionsmedizin sollten auch diese Einflussgrößen in der Diagnostik nicht unbeachtet bleiben.

## 8 Summary

---

### **Is the proliferative activity of canine tumour cells independent?**

#### **Association of the Ki67-labelling index with individual patient characteristics and tumour parameters using digital image analysis**

Theresa C. Brömel (née Firsching)

The proliferative activity of tumour cells is an essential component in the histopathological assessment of tumour malignancy in general or the tumour grade of neoplasms in both human and veterinary medicine. As an independent parameter or as part of grading schemes the proliferative activity is correlated with the disease outcome and prognosis of the patient. There is an increased trend towards an individualised tumour therapy, not only in human medicine. For that, highest precision in the assessment of the proliferative activity of tumour cells is necessary. However, individual patient characteristics have not been considered for diagnostics so far. In human and partly also in veterinary medicine, the proliferative activity showed age- or sex-dependencies in healthy tissues, ex vivo cultures and different tumour types. Therefore, the question arises as to why the influence of these individual characteristics have not been taken into account in diagnostics so far. In the case that individual patient- or tumour-related parameters have a decisive influence on the proliferative activity of tumour cells, tumour diagnostics could possibly be optimised and made more precise by correcting the proliferation for age, sex, or other parameters.

Based on the known age and sex dependencies of the proliferative activity in individual human tumour types, we hypothesised an association between patient-related parameters and tumour cell proliferation for canine tumours. Therefore, the aim of this exploratory study was to identify comparable associations between patient-related characteristics and tumour cell proliferation using a selection of common canine tumour types. In addition to patient age and sex, the evaluated patient parameters were extended by the castration status as well as the body weight/size, and tumour characteristics such as size and location were added. The tumour types chosen for this study should represent common canine neoplasms with homogenous morphologies. Based on that, the following tumour types were selected: cutaneous mast cell tumours (MCT), soft tissue sarcomas (STS), adenomas of the hepatoid perianal glands (PGA), plasmacytomas (PLA), trichoblastomas (TRI), interstitial or Leydig cell tumours (ICT), and Sertoli cell tumours (SCT). In this retrospective study a total of 495 tumours from the histological archive of the Institute of Veterinary Pathology at Freie Universität Berlin from 2010

to 2018 met the inclusion criteria. For the identification of proliferating tumour cells the proliferation marker Ki67 was chosen which is frequently used in research and diagnostics. The immunohistochemically stained sections were scanned and whole slide sections were digitally analysed. This enabled reliable and reproducible data of the proliferative activity.

As a core result of this study it was impossible to identify universal associations or correlations between the proliferative activity of tumour cells and the investigated patient- and tumour-related parameters. Instead, the results turned out to be sporadic and rather tumour type specific. Thus, without considering gender, an association between Ki67-LI and patient age could only be observed for PGA with increasing Ki67-LI with increasing age. Not surprisingly, after stratification of the study population by sex, this increase in Ki67-LI was present only in males, whereas Ki67-LI in females decreased with increasing age. Since PGA occur more frequently in unneutered males and are often associated with hormone-producing testicular tumours, the differences in proliferative activity between the sexes seem rather predictable. In MCT, stratification of the study population by sex led to increasing Ki67-LI with increasing age only in females. However, for this type of tumour, more advanced malignant progression in older animals appears to be a likely cause for this observation. Additionally to age, effects of sex and castration on proliferative activity were investigated. Significant differences in proliferative activity were observed between castrated and intact males with PLA and females with MCT. For MCT, few studies exist claiming that castration plays a role in development and proliferation for that type of tumour, however, the complex hormonal relationships remain unclear so far. Further patient-related parameters investigated in this study were the body weight or size of the dogs but no associations with the Ki67-LI were observed here. Initially, subdivision of the study population by genetic background was sought but proved not to be possible due to small group sizes. This may have prevented the detection of potential associations of Ki67-LI with breed of the patient. Another focus of the study was on the association of tumour characteristics with the Ki67-LI. Here, a significant increase of the Ki67-LI with increasing tumour size was identified in MCT. This observation corresponds to characteristic of this and other malignant tumour types also from humans to undergo malignant progression with accumulation of mutations that can drive cell division. Conversely, Ki67-LI decreased in PGA with increasing tumour size. As a possible cause for this observation increasing hypoxia with increasing tumour size was hypothesized. Finally, possible effects of tumour location on the Ki67-LI were also investigated, which, however, were observed exclusively in TRI. Apart from the observations mentioned, no further associations between patient- or tumour-related parameters and Ki67-LI were found in the selected tumour types.

Based on the results of this explorative study proliferative activity is indeed sporadically associated with patient or tumour characteristics in some tumour types. However, no general

conclusions can be drawn from the results, especially not on possible positive effects by taking these characteristics into account when using tumour gradings. Subsequent studies with a prospective design are necessary to evaluate positive effects by adaptation or correction of malignancy assessment in routine diagnostics. Nevertheless, this study has shown that proliferative activity of tumour cells may indeed be associated with patient or tumour characteristics in individual cases. With the background of growing personalised precision medicine, the influence of these variables should not be neglected.

## 9 Literaturverzeichnis

---

- Abadie JJ, Amardeilh MA, Delverdier ME (1999): Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 215, 1629-1634.
- Akerman M (1998): Fine-needle aspiration cytology of soft tissue sarcoma: benefits and limitations. *Sarcoma*, 2, 155-161.
- Alison MR (1995): Assessing cellular proliferation: what's worth measuring? *Hum Exp Toxicol*, 14, 935-944.
- Aloysius MM, Hewavisenthi SJ, Bates TE, Rowlands BJ, Lobo DN, Zaitoun AM (2010): Predictive value of tumor proliferative indices in periampullary cancers: Ki-67, mitotic activity index (MI) and volume corrected mitotic index (M/V) using tissue microarrays. *World J Surg*, 34, 2115-2121.
- Arima N, Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, Fujisue M, Okumura Y, Nakano M, Tashima R, Toyozumi Y (2016): The importance of tissue handling of surgically removed breast cancer for an accurate assessment of the Ki-67 index. *J Clin Pathol*, 69, 255-259.
- Avallone G, Rasotto R, Chambers JK, Miller AD, Behling-Kelly E, Monti P, Berlato D, Valenti P, Roccabianca P (2021): Review of Histological Grading Systems in Veterinary Medicine. *Vet Pathol*, 58, 809-828.
- Bauer NB, Zervos D, Moritz A (2007): Argyrophilic nucleolar organizing regions and Ki67 equally reflect proliferation in fine needle aspirates of normal, hyperplastic, inflamed, and neoplastic canine lymph nodes (n = 101). *J Vet Intern Med*, 21, 928-935.
- Bennett PF, DeNicola DB, Bonney P, Glickman NW, Knapp DW (2002): Canine anal sac adenocarcinomas: clinical presentation and response to therapy. *J Vet Intern Med*, 16, 100-104.
- Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M (2011): Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet Pathol*, 48, 41-53.
- Berlato D, Murphy S, Monti P, Stewart J, Newton JR, Flindall A, Maglennon GA (2015): Comparison of mitotic index and Ki67 index in the prognostication of canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 13, 143-150.
- Bertram CA, Aubreville M, Gurtner C, Bartel A, Corner SM, Dettwiler M, Kershaw O, Noland EL, Schmidt A, Sledge DG, Smedley RC, Thaiwong T, Kiupel M, Maier A, Klopffleisch R (2020): Computerized Calculation of Mitotic Count Distribution in Canine Cutaneous Mast Cell Tumor Sections: Mitotic Count Is Area Dependent. *Vet Pathol*, 57, 214-226.



- Bertram CA, Aubreville M, Marzahl C, Maier A, Klopffleisch R (2019): A large-scale dataset for mitotic figure assessment on whole slide images of canine cutaneous mast cell tumor. *Sci Data*, doi: 10.1038/s41597-019-0290-4.
- Bertram CA, Gurtner C, Dettwiler M, Kershaw O, Dietert K, Pieper L, Pischon H, Gruber AD, Klopffleisch R (2018): Validation of Digital Microscopy Compared With Light Microscopy for the Diagnosis of Canine Cutaneous Tumors. *Vet Pathol*, 55, 490-500.
- Bolton WE, Mikulka WR, Healy CG, Schmittling RJ, Kenyon NS (1992): Expression of proliferation associated antigens in the cell cycle of synchronized mammalian cells. *Cytometry*, 13, 117-126.
- Bostock DE (1986): Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *Br Vet J*, 142, 1-19.
- Bostock DE, Dye MT (1980): Prognosis after surgical excision of canine fibrous connective tissue sarcomas. *Vet Pathol*, 17, 581-588.
- Bostock DE (1973): The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J Small Anim Pract*, 14, 27-41.
- Bray JP, Polton GA, McSporran KD, Bridges J, Whitbread TM (2014): Canine soft tissue sarcoma managed in first opinion practice: outcome in 350 cases. *Vet Surg*, 43, 774-782.
- Canadas A, Franca M, Pereira C, Vilaca R, Vilhena H, Tinoco F, Silva MJ, Ribeiro J, Medeiros R, Oliveira P, Dias-Pereira P, Santos M (2019): Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study. *Vet Pathol*, 56, 208-219.
- Cangul IT, Wijnen, Garderen V, Ingh vd (2002): Clinico-pathological Aspects of Canine Cutaneous and Mucocutaneous Plasmacytomas. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 49, 307-312.
- Celis JE, Celis A (1985): Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 3262-3266.
- Chang JM, McCullough AE, Dueck AC, Kosiorek HE, Ocal IT, Lidner TK, Gray RJ, Wasif N, Northfelt DW, Anderson KS, Pockaj BA (2015): Back to Basics: Traditional Nottingham Grade Mitotic Counts Alone are Significant in Predicting Survival in Invasive Breast Carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 22, 509-515.
- Chen Z, Shin D, Chen S, Mikhail K, Hadass O, Tomlison BN, Korkin D, Shyu CR, Cui J, Anthony DC, Gu Z (2014): Histological quantitation of brain injury using whole slide imaging: a pilot validation study in mice. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0092133.

- Chijiwa K, Uchida K, Tateyama S (2004): Immunohistochemical evaluation of canine peripheral nerve sheath tumors and other soft tissue sarcomas. *Vet Pathol*, 41, 307-318.
- Chiti LE, Ferrari R, Roccabianca P, Boracchi P, Godizzi F, Busca GA, Stefanello D (2021): Surgical Margins in Canine Cutaneous Soft-Tissue Sarcomas: A Dichotomous Classification System Does Not Accurately Predict the Risk of Local Recurrence. *Animals (Basel)*, 11, 2367.
- Colman H, Giannini C, Huang L, Gonzalez J, Hess K, Bruner J, Fuller G, Langford L, Pelloski C, Aaron J, Burger P, Aldape K (2006): Assessment and prognostic significance of mitotic index using the mitosis marker phospho-histone H3 in low and intermediate-grade infiltrating astrocytomas. *Am J Surg Pathol*, 30, 657-664.
- Cooper GM (2000): The Eukaryotic Cell Cycle. In: *The Cell: A Molecular Approach*./Hrsg.: Cooper GM, 2. Auflage, Washington, D.C: ASM Press, ISBN 978-0-87893-106-4.
- Corazza GR, Ginaldi L, Quaglione G, Ponzielli F, Vecchio L, Biagi F, Quaglino D (1998): Proliferating cell nuclear antigen expression is increased in small bowel epithelium in the elderly. *Mech Ageing Dev*, 104, 1-9.
- Coyle VJ, Rassnick KM, Borst LB, Rodriguez CO, Jr., Northrup NC, Fan TM, Garrett LD (2015): Biological behaviour of canine mandibular osteosarcoma. A retrospective study of 50 cases (1999-2007). *Vet Comp Oncol*, 13, 89-97.
- Dennis MM, McSporran KD, Bacon NJ, Schulman FY, Foster RA, Powers BE (2011): Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. *Vet Pathol*, 48, 73-84.
- Diaz J, Stead L, Shapiro N, Newell R, Loudig O, Lo Y, Sparano J, Fineberg S (2013): Mitotic counts in breast cancer after neoadjuvant systemic chemotherapy and development of metastatic disease. *Breast Cancer Res Treat*, 138, 91-97.
- Dietert K, Nouailles G, Gutbier B, Reppe K, Berger S, Jiang X, Schauer AE, Hocke AC, Herold S, Slevogt H, Witzernath M, Suttorp N, Gruber AD (2018): Digital Image Analyses on Whole-Lung Slides in Mouse Models of Acute Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 58, 440-448.
- Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL (2002): Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract*, 43, 240-246.
- Domanitskaya N, Wangari-Talbot J, Jacobs J, Peiffer E, Mahdaviyeh Y, Paulose C, Malofeeva E, Foster K, Cai KQ, Zhou Y, Egleston B, Hopper-Borge E (2014): Abcc10 status affects mammary tumour growth, metastasis, and docetaxel treatment response. *Br J Cancer*, 111, 696-707.

- Donhuijsen K, Schmidt U, Hirche H, van Beuningen D, Budach V (1990): Changes in mitotic rate and cell cycle fractions caused by delayed fixation. *Hum Pathol*, 21, 709-714.
- Donovan TA, Moore FM, Bertram CA, Luong R, Bolfa P, Klopfleisch R, Tvedten H, Salas EN, Whitley DB, Aubreville M, Meuten DJ (2020): Mitotic Figures-Normal, Atypical, and Imposters: A Guide to Identification. *Vet Pathol*, 58, 243-257.
- Edmondson EF, Hess AM, Powers BE (2015): Prognostic significance of histologic features in canine renal cell carcinomas: 70 nephrectomies. *Vet Pathol*, 52, 260-268.
- Elling H, Ungemach FR (1982): Sexual hormone receptors in canine mast cell tumour cytosol. *J Comp Pathol*, 92, 629-630.
- Elston CW, Ellis IO (1991): Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19, 403-410.
- Ettinger SN, Scase TJ, Oberthaler KT, Craft DM, McKnight JA, Leibman NF, Charney SC, Bergman PJ (2006): Association of argyrophilic nucleolar organizing regions, Ki-67, and proliferating cell nuclear antigen scores with histologic grade and survival in dogs with soft tissue sarcomas: 60 cases (1996-2002). *J Am Vet Med Assoc*, 228, 1053-1062.
- Firsching TC, Dietert K, Bartel A, Doherr MG, Gruber AD (2022): Dependence of the Ki67 Labelling Index of Selected Canine Tumours on Patient Age, Sex and Tumour Size. *J Comp Pathol*, 193, 1-8.
- Geraldes M, Gartner F, Schmitt F (2000): Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Vet Rec*, 146, 403-406.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133, 1710-1715.
- Gil da Costa RM, Matos E, Rema A, Lopes C, Pires MA, Gartner F (2007): CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Vet Res*, 3, 19.
- Gillespie V, Baer K, Farrelly J, Craft D, Luong R (2011): Canine gastrointestinal stromal tumors: immunohistochemical expression of CD34 and examination of prognostic indicators including proliferation markers Ki67 and AgNOR. *Vet Pathol*, 48, 283-291.
- Godballe C, Asschenfeldt P, Sorensen JA, Sorensen MW, Jorgensen K (1994): Papillary thyroid carcinoma: correlations between prognosis, age, and clinicopathological and histomorphological findings. *Laryngoscope*, 104, 747-751.

- Gomes P, Torres SM, Plager DA, Jessen CR, Lee JJ (2013): Comparison of three staining methods to identify eosinophils in formalin-fixed canine skin. *Vet Dermatol*, 24, 323-328.
- Goodlad RA (2017): Quantification of epithelial cell proliferation, cell dynamics, and cell kinetics in vivo. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, doi: 10.1002/wdev.274.
- Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK (2005): *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis*. 2nd Edition. Blackwell Science, ISBN: 978-0-470-75247-0, 625-633, 641-664, 866-872.
- Gruntzig K, Graf R, Boo G, Guscetti F, Hassig M, Axhausen KW, Fabrikant S, Welle M, Meier D, Folkers G, Pospischil A (2016): Swiss Canine Cancer Registry 1955-2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development. *J Comp Pathol*, 155, 156-170.
- Ha SY, Choi M, Lee T, Park CK (2016): The Prognostic Role of Mitotic Index in Hepatocellular Carcinoma Patients after Curative Hepatectomy. *Cancer Res Treat*, 48, 180-189.
- Ha SY, Sohn I, Hwang SH, Yang JW, Park CK (2015): The prognosis of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy in young patients. *Oncotarget*, 6, 18664-18673.
- Haapasalo H, Pesonen E, Collan Y (1989): Volume corrected mitotic index (M/V-INDEX). The standard of mitotic activity in neoplasms. *Pathol Res Pract*, 185, 551-554.
- Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP (1993): High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene*, 8, 203-207.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674.
- Hardwick LJA, Kortum AJ, Constantino-Casas F, Watson PJ (2021): Breed-related expression patterns of Ki67, gammaH2AX, and p21 during ageing in the canine liver. *Vet Res Commun*, 45, 21-30.
- Hayes HM, Jr., Wilson GP, Pendergrass TW, Cox VS (1985): Canine cryptorchism and subsequent testicular neoplasia: case-control study with epidemiologic update. *Teratology*, 32, 51-56.
- Hayes HM, Jr., Wilson GP (1977): Hormone-dependent neoplasms of the canine perianal gland. *Cancer Res*, 37, 2068-2071.
- Johnson RE, Sigman JD, Funk GF, Robinson RA, Hoffman HT (1997): Quantification of surgical margin shrinkage in the oral cavity. *Head Neck*, 19, 281-286.
- Juan G, Traganos F, James WM, Ray JM, Roberge M, Sauve DM, Anderson H, Darzynkiewicz Z (1998): Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G2 and mitosis. *Cytometry*, 32, 71-77.

- Jurikova M, Danihel L, Polak S, Varga I (2016): Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem*, 118, 544-552.
- Kandefer-Gola M, Madej JA, Dzimira S, Nowak M, Janus I, Ciaputa R (2015): Comparative analysis of markers of cell proliferation in canine mast cell tumours according to current classifications. *Pol J Vet Sci*, 18, 241-247.
- Kennedy PC (1998): *Histological Classification of Tumors of the Genital System of Domestic Animals (WHO International Classification of Tumors of Domestic Animals)*. 2. Auflage, Washington, D.C.: American Registry of Pathology, ISBN: 9781881041559.
- Kil DY, Vester Boler BM, Apanavicius CJ, Schook LB, Swanson KS (2010): Gene expression profiles of colonic mucosa in healthy young adult and senior dogs. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0012882.
- Kirpensteijn J, Kik M, Rutteman GR, Teske E (2002): Prognostic significance of a new histologic grading system for canine osteosarcoma. *Vet Pathol*, 39, 240-246.
- 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, P WS, 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.
- 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. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 52, 280-286.
- Koehler JW, Miller AD, Miller CR, Porter B, Aldape K, Beck J, Brat D, Cornax I, Corps K, Frank C, Giannini C, Horbinski C, Huse JT, O'Sullivan MG, Rissi DR, Mark Simpson R, Woolard K, Shih JH, Mazcko C, Gilbert MR, LeBlanc AK (2018): A Revised Diagnostic Classification of Canine Glioma: Towards Validation of the Canine Glioma Patient as a Naturally Occurring Preclinical Model for Human Glioma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 77, 1039-1054.
- Laprie C, Abadie J, Amardeilh MF, Net JL, Lagadic M, Delverdier M (2001): MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Vet Dermatol*, 12, 139-147.
- Lapsley J, Selmic LE (2021): Common Neoplastic Diseases Affecting the Forelimb. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 51, 343-356.
- Laver T, Feldhaeusser BR, Robot CS, Baez JL, Cronin KL, Buracco P, Annoni M, Regan RC, McMillan SK, Curran KM, Selmic LE, Shiu KB, Clark K, Fagan E, Thamm DH (2018):

- Post-surgical outcome and prognostic factors in canine malignant melanomas of the haired skin: 87 cases (2003-2015). *Can Vet J*, 59, 981-987.
- Lee J, Lee KS, Kim CL, Byeon JS, Gu NY, Cho IS, Cha SH (2017): Effect of donor age on the proliferation and multipotency of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci*, 18, 141-148.
- Liao AT, Chu PY, Yeh LS, Lin CT, Liu CH (2009): A 12-year retrospective study of canine testicular tumors. *J Vet Med Sci*, 71, 919-923.
- Louis D, Perry A, Reifenberger G (2016): The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131, 803-820.
- Loukopoulos P, Robinson WF (2007): Clinicopathological relevance of tumour grading in canine osteosarcoma. *J Comp Pathol*, 136, 65-73.
- Maga G, Hubscher U (2003): Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci*, 116, 3051-3060.
- Maglennon GA, Murphy S, Adams V, Miller J, Smith K, Blunden A, Scase TJ (2008): Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 6, 268-274.
- Maier DA, Brochner CB, Bartek J, Jr., Eriksson F, Ugleholdt H, Broholm H, Mathiesen T (2020): Mitotic and Proliferative Indices in WHO Grade III Meningioma. *Cancers (Basel)*, doi: 10.3390/cancers12113351.
- Malon C, Brachtel E, Cosatto E, Graf HP, Kurata A, Kuroda M, Meyer JS, Saito A, Wu S, Yagi Y (2012): Mitotic figure recognition: agreement among pathologists and computerized detector. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 35, 97-100.
- Marino DJ, Matthiesen DT, Stefanacci JD, Moroff SD (1995): Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981-1991). *J Am Vet Med Assoc*, 207, 726-728.
- McIntosh JR (2016): Mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8:a023218.
- McNiel EA, Ogilvie GK, Powers BE, Hutchison JM, Salman MD, Withrow SJ (1997): Evaluation of prognostic factors for dogs with primary lung tumors: 67 cases (1985-1992). *J Am Vet Med Assoc*, 211, 1422-1427.
- McSporran KD (2009): Histologic grade predicts recurrence for marginally excised canine subcutaneous soft tissue sarcomas. *Vet Pathol*, 46, 928-933.
- Meuten DJ (2017): Tumors in domestic animals. 5th Edition. John Wiley & Sons, ISBN: 9780813821795, 101-104, 112-115, 171-172, 176-202, 706-719.
- Meuten DJ, Moore FM, George JW (2016): Mitotic Count and the Field of View Area: Time to Standardize. *Vet Pathol*, 53, 7-9.

- Meuten DJ, Cooper BJ, Capen CC, Chew DJ, Kociba GJ (1981): Hypercalcemia associated with an adenocarcinoma derived from the apocrine glands of the anal sac. *Vet Pathol*, 18, 454-471.
- Meyer JS, Cosatto E, Graf HP (2009): Mitotic index of invasive breast carcinoma. Achieving clinically meaningful precision and evaluating tertial cutoffs. *Arch Pathol Lab Med*, 133, 1826-1833.
- Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C, Olson N, Russo I, Russo J, Glass A, Zehnbauer BA, Lister K, Parwaresch R (2005): Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index. *Mod Pathol*, 18, 1067-1078.
- Meyerholz DK, Griffin MA, Castilow EM, Varga SM (2009): Comparison of histochemical methods for murine eosinophil detection in an RSV vaccine-enhanced inflammation model. *Toxicol Pathol*, 37, 249-255.
- Millanta F, Fratini F, Corazza M, Castagnaro M, Zappulli V, Poli A (2002): Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. *Res Vet Sci*, 73, 45-51.
- Milovancev M, Tuohy JL, Townsend KL, Irvin VL (2019): Influence of surgical margin completeness on risk of local tumour recurrence in canine cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcoma: A systematic review and meta-analysis. *Vet Comp Oncol*, 17, 354-364.
- Misdorp W (2004): Mast cells and canine mast cell tumours. A review. *Vet Q*, 26, 156-169.
- Mochizuki H, Motsinger-Reif A, Bettini C, Moroff S, Breen M (2017): Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 15, 829-839.
- Moore AS, Frimberger AE, Taylor D, Sullivan N (2020): Retrospective outcome evaluation for dogs with surgically excised, solitary Kiupel high-grade, cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 18, 402-408.
- Moore PF (2014): A review of histiocytic diseases of dogs and cats. *Vet Pathol*, 51, 167-184.
- Musahl C, Holthoff HP, Lesch R, Knippers R (1998): Stability of the replicative Mcm3 protein in proliferating and differentiating human cells. *Exp Cell Res*, 241, 260-264.
- Northey JJ, Dong Z, Ngan E, Kaplan A, Hardy WR, Pawson T, Siegel PM (2013): Distinct phosphotyrosine-dependent functions of the ShcA adaptor protein are required for transforming growth factor beta (TGFbeta)-induced breast cancer cell migration, invasion, and metastasis. *J Biol Chem*, 288, 5210-5222.
- Ogawa T, Kitagawa M, Hirokawa K (2000): Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages. *Mech Ageing Dev*, 117, 57-68.

- Ogilvie GK, Powers BE, Mallinckrodt CH, Withrow SJ (1996): Surgery and doxorubicin in dogs with hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med*, 10, 379-384.
- Palmieri C, Grieco V (2015): Proposal of Gleason-like grading system of canine prostate carcinoma in veterinary pathology practice. *Res Vet Sci*, 103, 11-15.
- 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.
- Pena L, De Andres PJ, Clemente M, Cuesta P, Perez-Alenza MD (2013): Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol*, 50, 94-105.
- Peralta S, Grenier JK, McCleary-Wheeler AL, Duhamel GE (2019): Ki67 Labelling Index of Neoplastic Epithelial Cells Differentiates Canine Acanthomatous Ameloblastoma from Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Comp Pathol*, 171, 59-69.
- Pereira RS, Schweigert A, Dias de Melo G, Fernandes FV, Sueiro FA, Machado GF (2013): Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms: a novel approach for immunohistological diagnostic and prognostic. *BMC Vet Res*, 9, 83.
- Peters MA, de Jong FH, Teerds KJ, de Rooij DG, Dieleman SJ, van Sluijs FJ (2000): Ageing, testicular tumours and the pituitary-testis axis in dogs. *J Endocrinol*, 166, 153-161.
- Phillips BS, Kass PH, Naydan DK, Winthrop MD, Griffey SM, Madewell BR (2000): Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J Vet Diagn Invest*, 12, 111-117.
- Phillips GD, Stone AM, Schultz JC, Jones BD, Knighton DR (1994): Proliferation of wound derived capillary endothelial cells: young versus aged. *Mech Ageing Dev*, 77, 141-148.
- Pisani G, Millanta F, Lorenzi D, Vannozzi I, Poli A (2006): Androgen receptor expression in normal, hyperplastic and neoplastic hepatoid glands in the dog. *Res Vet Sci*, 81, 231-236.
- Platz SJ, Breuer W, Pfleghaar S, Minkus G, Hermanns W (1999): Prognostic value of histopathological grading in canine extramedullary plasmacytomas. *Vet Pathol*, 36, 23-27.
- Pradel J, Berlato D, Dobromylskyj M, Rasotto R (2018): Prognostic significance of histopathology in canine anal sac gland adenocarcinomas: Preliminary results in a retrospective study of 39 cases. *Vet Comp Oncol*, 16, 518-528.
- Preziosi R, Della Salda L, Ricci A, Simoni P, Marcato PS (1995): Quantification of nucleolar organiser regions in canine perianal gland tumours. *Res Vet Sci*, 58, 277-281.
- Puripat N, Loharamtaweethong K (2019): Phosphohistone H3 (PHH3) as a surrogate of mitotic figure count for grading in meningiomas: a comparison of PHH3 (S10) versus PHH3 (S28) antibodies. *Virchows Arch*, 474, 87-96.



- Raleigh ML, Smith MM, Taney K (2021): Curative Intent Surgery of Oral Malignant Melanoma and Regional Lymph Node Biopsy Assessment in 25 Dogs: 2006-2017. *J Vet Dent*, 38, 193-198.
- Ramos-Vara JA, Miller MA, Valli VE (2007): Immunohistochemical detection of multiple myeloma 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF-4) in canine plasmacytoma: comparison with CD79a and CD20. *Vet Pathol*, 44, 875-884.
- Rasotto R, Berlato D, Goldschmidt MH, Zappulli V (2017): Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Vet Pathol*, 54, 571-578.
- Reimer SB, Seguin B, DeCock HE, Walsh PJ, Kass PH (2005): Evaluation of the effect of routine histologic processing on the size of skin samples obtained from dogs. *Am J Vet Res*, 66, 500-505.
- 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.
- Roncucci L, Ponz de Leon M, Scalmati A, Malagoli G, Pratissoli S, Perini M, Chahin NJ (1988): The influence of age on colonic epithelial cell proliferation. *Cancer*, 62, 2373-2377.
- Roux L, Racoceanu D, Lomenie N, Kulikova M, Irshad H, Klossa J, Capron F, Genestie C, Le Naour G, Gurcan MN (2013): Mitosis detection in breast cancer histological images An ICPR 2012 contest. *J Pathol Inform*, 4, 8.
- Sabattini S, Renzi A, Rigillo A, Scarpa F, Capitani O, Tinto D, Brenda A, Bettini G (2019): Cytological differentiation between benign and malignant perianal gland proliferative lesions in dogs: a preliminary study. *J Small Anim Pract*, 60, 616-622.
- Sabattini S, Bassi P, Bettini G (2015): Histopathological findings and proliferative activity of canine sebaceous gland tumours with a predominant reserve cell population. *J Comp Pathol*, 152, 145-152.
- Sanders K, Cirkel K, Grinwis GCM, Teske E, van Nimwegen SA, Mol JA, Hesselink JW, Kooistra HS, Galac S (2019): The Utrecht Score: A novel histopathological scoring system to assess the prognosis of dogs with cortisol-secreting adrenocortical tumours. *Vet Comp Oncol*, 17, 329-337.
- Santos AA, Lopes CC, Ribeiro JR, Martins LR, Santos JC, Amorim IF, Gartner F, Matos AJ (2013): Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Vet Res*, 9, 1.
- Sarli G, Benazzi C, Preziosi R, Della Salda L, Bettini G, Marcato PS (1999): Evaluating mitotic activity in canine and feline solid tumors: standardizing the parameter. *Biotech Histochem*, 74, 64-76.
- Scarpa F, Sabattini S, Bettini G (2016): Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*, 14, 245-251.

- Scarpa F, Sabbatini 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. *J Am Vet Med Assoc*, 240, 1181-1187.
- 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. *J Vet Intern Med*, 20, 151-158.
- Schafer KA (1998): The cell cycle: a review. *Vet Pathol*, 35, 461-478.
- Schultheiss PC, Gardiner DW, Rao S, Olea-Popelka F, Tuohy JL (2011): Association of histologic tumor characteristics and size of surgical margins with clinical outcome after surgical removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 238, 1464-1469.
- Schultz E, Lipton BH (1982): Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. *Mech Ageing Dev*, 20, 377-383.
- Selmic LE, Ruple A (2020): A systematic review of surgical margins utilized for removal of cutaneous mast cell tumors in dogs. *BMC Vet Res*, 16, 5.
- Shen S, Wolfe R, McLean CA, Haskett M, Kelly JW (2014): Characteristics and associations of high-mitotic-rate melanoma. *JAMA Dermatol*, 150, 1048-1055.
- 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 Genet Epidemiol*, doi: 10.1186/2052-6687-2-1.
- Simoës JP, Schoning P, Butine M (1994): Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet Pathol*, 31, 637-647.
- Simon D, Ruslander DM, Rassnick KM, Wood CA, Frimberger AE, Cotter SM, King NW, Moore AS (2007): Orthovoltage radiation and weekly low dose of doxorubicin for the treatment of incompletely excised soft-tissue sarcomas in 39 dogs. *Vet Rec*, 160, 321-326.
- Sledge DG, Webster J, Kiupel M (2016): Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *Vet J*, 215, 43-54.
- Smiech A, Slaska B, Lopuszynski W, Jasik A, Bochynska D, Dabrowski 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.
- Smiech A, Slaska B, Lopuszynski W, Jasik A, Szczepanik M, Wilkolek P (2017): Epidemiological Study of Canine Mast Cell Tumours According to the Histological Malignancy Grade. *Pol J Vet Sci*, 20, 455-465.
- Smith AA, Frimberger AE, Moore AS (2019): Retrospective study of survival time and prognostic factors for dogs with small intestinal adenocarcinoma treated by tumor excision with or without adjuvant chemotherapy. *J Am Vet Med Assoc*, 254, 243-250.

- Song Y, Yin J, Chang H, Zhou Q, Peng H, Ji W, Song Q (2018): Comparison of four staining methods for detecting eosinophils in nasal polyps. *Sci Rep*, doi: 10.1038/s41598-018-36102-y.
- Stalhammar G, Robertson S, Wedlund L, Lippert M, Rantalainen M, Bergh J, Hartman J (2018): Digital image analysis of Ki67 in hot spots is superior to both manual Ki67 and mitotic counts in breast cancer. *Histopathology*, 72, 974-989.
- Start RD, Flynn MS, Cross SS, Rogers K, Smith JH (1991): Is the grading of breast carcinomas affected by a delay in fixation? *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 419, 475-477.
- Stefanello D, Avallone G, Ferrari R, Roccabianca P, Boracchi P (2011): Canine cutaneous perivascular wall tumors at first presentation: clinical behavior and prognostic factors in 55 cases. *J Vet Intern Med*, 25, 1398-1405.
- Takahashi N, Tarumi W, Hamada N, Ishizuka B, Itoh MT (2017): Cresyl Violet Stains Mast Cells Selectively: Its Application to Counterstaining in Immunohistochemistry. *Zoolog Sci*, 34, 147-150.
- Teshiba R, Kawano S, Wang LL, He L, Naranjo A, London WB, Seeger RC, Gastier-Foster JM, Look AT, Hogarty MD, Cohn SL, Maris JM, Park JR, Shimada H (2014): Age-dependent prognostic effect by Mitosis-Karyorrhexis Index in neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Dev Pathol*, 17, 441-449.
- Treere D (2000): AgNOR staining and quantification. *Micron*, 31, 127-131.
- Trojani M, Contesso G, Coindre JM, Rouesse J, Bui NB, de Mascarel A, Goussot JF, David M, Bonichon F, Lagarde C (1984): Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int J Cancer*, 33, 37-42.
- Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzky F, Durham A, Ehrhart EJ, Johnson Y, Jones C, Kiupel M, Labelle P, Lester S, Miller M, Moore P, Moroff S, Roccabianca P, Ramos-Vara J, Ross A, Scase T, Tvedten H, Vernau W (2011): Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Vet Pathol*, 48, 198-211.
- van Diest PJ, Baak JP, Matze-Cok P, Wisse-Brekelmans EC, van Galen CM, Kurver PH, Bellot SM, Fijnheer J, van Gorp LH, Kwee WS, et al. (1992): Reproducibility of mitosis counting in 2,469 breast cancer specimens: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Hum Pathol*, 23, 603-607.
- Veta M, Heng YJ, Stathonikos N, Bejnordi BE, Beca F, Wollmann T, Rohr K, Shah MA, Wang D, Rousson M, Hedlund M, Tellez D, Ciompi F, Zerhouni E, Lanyi D, Viana M, Kovalev V, Liauchuk V, Phoulady HA, Qaiser T, Graham S, Rajpoot N, Sjoblom E, Molin J, Paeng K, Hwang S, Park S, Jia Z, Chang EI, Xu Y, Beck AH, van Diest PJ, Pluim JPW

- (2019): Predicting breast tumor proliferation from whole-slide images: The TUPAC16 challenge. *Med Image Anal*, 54, 111-121.
- Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Thamm DH, Hamilton E, Kiupel M (2008): Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. *BMC Vet Res*, 4, 32.
- 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.
- White CR, Hohenhaus AE, Kelsey J, Procter-Gray E (2011): Cutaneous MCTs: associations with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. *J Am Anim Hosp Assoc*, 47, 210-216.
- Wilson GP, Hayes HM, Jr. (1979): Castration for treatment of perianal gland neoplasms in the dog. *J Am Vet Med Assoc*, 174, 1301-1303.
- Withrow SJ (2013): *Small animal clinical oncology*. 5th Edition. Elsevier Health Sciences, 423-431, 557-571.
- Wright ZM, Rogers KS, Mansell J (2008): Survival data for canine oral extramedullary plasmacytomas: a retrospective analysis (1996-2006). *J Am Anim Hosp Assoc*, 44, 75-81.
- Xiao ZQ, Moragoda L, Jaszewski R, Hatfield JA, Fligiel SE, Majumdar AP (2001): Aging is associated with increased proliferation and decreased apoptosis in the colonic mucosa. *Mech Ageing Dev*, 122, 1849-1864.
- Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, Dipersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L (2014): Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*, 20, 1472-1478.
- 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. *J Am Vet Med Assoc*, 244, 309-319.

## 10 Anhang

### 10.1 Zusammenstellung der Softwareeinstellungen für die Zellzählung

Tabelle 23: Einstellungen des Aperio v9 Algorithm zur Quantifizierung verschiedener Tumorarten in immunhistochemisch gegen Ki67 gefärbten Schnitten.

Name des Algorithmus	1 (PLA)	2 (PLA)	3 (PLA)	4 (PLA)
Algorithm	Nuclear v9	Nuclear v9	Nuclear v9	Nuclear v9
Version	9.2	9.2	9.2	9.2
Image Zoom	1	1	1	1
Pixel Size (um)	0.2533	0.2533	0.2533	0.2533
Clear Area Intensity	240	240	240	240
Counterstain Red OD	0.647277	0.647277	0.647277	0.66258
Counterstain Green OD	0.623896	0.623896	0.623896	0.669171
Counterstain Blue OD	0.437934	0.437934	0.437934	0.336448
Biomarker 1 Red OD	0.507292	0.507292	0.507292	0.506332
Biomarker 1 Green OD	0.629655	0.629655	0.629655	0.627614
Biomarker 1 Blue OD	0.588379	0.588379	0.588379	0.591379
Type	Automatic	Default	Default	Default
Method	Default	Automatic	Automatic	Automatic
-- Threshold Lower Limit	0	0	0	0
-- Threshold Upper Limit	230	230	230	230
Smoothing (µm)	1.1	1.1	1.2	1.1
Smoothing (Pixels)	4	4	5	4
Merging	0.8	0.95	1	0.8
Trimming	Medium	Medium	Medium	Medium
Min Size (µm <sup>2</sup> )	10	10	10	10
Min Size (Pixels)	156	156	156	156
Max Size (µm <sup>2</sup> )	1000	1000	1000	1000
Max Size (Pixels)	15586	15586	15586	15586
Roundness	0.2	0.3	0.3	0.2
Compactness	0.1	0.2	0.2	0.1
Elongation	1.e-002	1.00e-02	1.00e-02	1.00e-02
Remove Light Objects	0	0	0	0
Weak (1+) Threshold	210	210	210	210
Moderate (2+) Threshold	188	188	188	188
Strong (3+) Threshold	162	162	162	162
Dark Nuclei Removal	0	0	0	0

Tabelle 23: Fortgeführt

Name des Algorithmus	1 (APD)	2 (APD)	3 (APD)	4 (APD)
<b>Algorithm</b>	Nuclear v9	Nuclear v9	Nuclear v9	Nuclear v9
<b>Version</b>	9.2	9.2	9.2	9.2
<b>Image Zoom</b>	1	1	1	1
<b>Pixel Size (um)</b>	0.254102	0.2533	0.2533	0.254102
<b>Clear Area Intensity</b>	240	240	240	240
<b>Counterstain Red OD</b>	0.657106	0.606163	0.618133	0.657106
<b>Counterstain Green OD</b>	0.693108	0.659331	0.647044	0.693108
<b>Counterstain Blue OD</b>	0.296334	0.444803	0.446369	0.296334
<b>Biomarker 1 Red OD</b>	0.533124	0.466691	0.472463	0.533124
<b>Biomarker 1 Green OD</b>	0.647975	0.594147	0.61284	0.647975
<b>Biomarker 1 Blue OD</b>	0.543974	0.655125	0.633408	0.543974
<b>Type</b>	Default	Default	Default	Default
<b>Method</b>	Automatic	Automatic	Automatic	Automatic
<b>-- Threshold Lower Limit</b>	0	0	0	0
<b>-- Threshold Upper Limit</b>	230	230	230	230
<b>Smoothing (µm)</b>	1	1	1	1
<b>Smoothing (Pixels)</b>	4	4	4	4
<b>Merging</b>	0.8	1.2	1	1
<b>Trimming</b>	Medium	Medium	Medium	Medium
<b>Min Size (µm<sup>2</sup>)</b>	14	17	15	14
<b>Min Size (Pixels)</b>	217	265	234	217
<b>Max Size (µm<sup>2</sup>)</b>	1000	1000	1000	1000
<b>Max Size (Pixels)</b>	15488	15586	15586	15488
<b>Roundness</b>	0.3	0.4	0.3	0.3
<b>Compactness</b>	0.18	0.4	0.3	0.3
<b>Elongation</b>	9.e-002	9.e-002	9.e-002	9.e-002
<b>Remove Light Objects</b>	0	0	0	0
<b>Weak (1+) Threshold</b>	210	210	210	210
<b>Moderate (2+) Threshold</b>	188	188	188	188
<b>Strong (3+) Threshold</b>	162	162	162	162
<b>Dark Nuclei Removal</b>	0	0	0	0

Tabelle 23: Fortgeführt

Name des Algorithmus	1 (TRI)	2 (TRI)	TRI (3)
Algorithm	Nuclear v9	Nuclear v9	Nuclear v9
Version	9.2	9.2	9.2
Image Zoom	1	1	1
Pixel Size (um)	0.2533	0.2533	0.2533
Clear Area Intensity	240	240	240
Counterstain Red OD	0.699315	0.628837	0.681373
Counterstain Green OD	0.658223	0.649905	0.627499
Counterstain Blue OD	0.278748	0.426835	0.376797
Biomarker 1 Red OD	0.630037	0.53166	0.556645
Biomarker 1 Green OD	0.656052	0.642464	0.644518
Biomarker 1 Blue OD	0.415511	0.551886	0.524159
Type	Default	Default	Default
Method	Automatic	Automatic	Automatic
-- Threshold Lower Limit	0	0	0
-- Threshold Upper Limit	230	230	230
Smoothing (µm)	1.1	1.1	1.1
Smoothing (Pixels)	4	4	4
Merging	0.8	0.8	0.8
Trimming	Medium	Medium	Medium
Min Size (µm <sup>2</sup> )	9	10	10
Min Size (Pixels)	140	156	156
Max Size (µm <sup>2</sup> )	1000	1000	1000
Max Size (Pixels)	15586	15586	15586
Roundness	0.1	0.1	0.3
Compactness	0.2	0.2	0.2
Elongation	0.1	0.1	1.00E-02
Remove Light Objects	0	0	0
Weak (1+) Threshold	210	210	210
Moderate (2+) Threshold	188	188	188
Strong (3+) Threshold	162	162	162
Dark Nuclei Removal	0	0	0

Tabelle 23: Fortgeführt

<b>Name des Algorithmus</b>	<b>1 (WGS)</b>	<b>2 (WGS)</b>
<b>Algorithm</b>	Nuclear v9	Nuclear v9
<b>Version</b>	9.2	9.2
<b>Image Zoom</b>	1	1
<b>Pixel Size (um)</b>	0.2533	0.2533
<b>Clear Area Intensity</b>	240	240
<b>Counterstain Red OD</b>	0.692939	0.692939
<b>Counterstain Green OD</b>	0.661505	0.661505
<b>Counterstain Blue OD</b>	0.286786	0.286786
<b>Biomarker 1 Red OD</b>	0.542575	0.542575
<b>Biomarker 1 Green OD</b>	0.62465	0.62465
<b>Biomarker 1 Blue OD</b>	0.561627	0.561627
<b>Type</b>	Default	Default
<b>Method</b>	Automatic	Automatic
<b>-- Threshold Lower Limit</b>	0	0
<b>-- Threshold Upper Limit</b>	230	230
<b>Smoothing (µm)</b>	1.2	1.2
<b>Smoothing (Pixels)</b>	5	5
<b>Merging</b>	0.8	0.8
<b>Trimming</b>	Medium	Medium
<b>Min Size (µm<sup>2</sup>)</b>	10	12
<b>Min Size (Pixels)</b>	156	187
<b>Max Size (µm<sup>2</sup>)</b>	1000	1000
<b>Max Size (Pixels)</b>	15586	15586
<b>Roundness</b>	0.2	0.3
<b>Compactness</b>	0.2	0.3
<b>Elongation</b>	0.1	0.2
<b>Remove Light Objects</b>	0	0
<b>Weak (1+) Threshold</b>	210	210
<b>Moderate (2+) Threshold</b>	188	188
<b>Strong (3+) Threshold</b>	162	162
<b>Dark Nuclei Removal</b>	0	0



Tabelle 23: Fortgeführt

Name des Algorithmus	1 (LZT)	2 (LZT)	3 (LZT)	4 (LZT)
<b>Algorithm</b>	Nuclear v9	Nuclear v9	Nuclear v9	Nuclear v9
<b>Version</b>	9.2	9.2	9.2	9.2
<b>Image Zoom</b>	1	1	1	1
<b>Pixel Size (um)</b>	0.2533	0.2533	0.2533	0.2533
<b>Clear Area Intensity</b>	240	240	240	240
<b>Counterstain Red OD</b>	0.614867	0.639394	0.580935	0.700581
<b>Counterstain Green OD</b>	0.669033	0.658666	0.643361	0.635708
<b>Counterstain Blue OD</b>	0.417533	0.396654	0.498599	0.324132
<b>Biomarker 1 Red OD</b>	0.500914	0.488937	0.411593	0.538226
<b>Biomarker 1 Green OD</b>	0.633152	0.574093	0.571375	0.652072
<b>Biomarker 1 Blue OD</b>	0.590088	0.656778	0.710015	0.533962
<b>Type</b>	Default	Default	Default	Default
<b>Method</b>	Automatic	Automatic	Automatic	Automatic
<b>-- Threshold Lower Limit</b>	0	0	0	0
<b>-- Threshold Upper Limit</b>	230	230	230	230
<b>Smoothing (µm)</b>	1.15	1.13	1.15	1.15
<b>Smoothing (Pixels)</b>	5	4	5	5
<b>Merging</b>	0.8	0.9	1	0.8
<b>Trimming</b>	Medium	Medium	Medium	Medium
<b>Min Size (µm<sup>2</sup>)</b>	20	20	20	20
<b>Min Size (Pixels)</b>	312	312	312	312
<b>Max Size (µm<sup>2</sup>)</b>	300	300	300	300
<b>Max Size (Pixels)</b>	4676	4676	4676	4676
<b>Roundness</b>	0.1	0.1	0.3	0.1
<b>Compactness</b>	0.3	0.3	0.3	0.3
<b>Elongation</b>	0.3	0.3	0.1	0.3
<b>Remove Light Objects</b>	0	0	0	0
<b>Weak (1+) Threshold</b>	210	210	210	210
<b>Moderate (2+) Threshold</b>	188	188	188	188
<b>Strong (3+) Threshold</b>	162	162	162	162
<b>Dark Nuclei Removal</b>	0	0	0	0

Tabelle 23: Fortgeführt

<b>Name des Algorithmus</b>	<b>1 (SZT)</b>	<b>2 (SZT)</b>	<b>3 (SZT)</b>
<b>Algorithm</b>	Nuclear v9	Nuclear v9	Nuclear v9
<b>Version</b>	9.2	9.2	9.2
<b>Image Zoom</b>	1	1	1
<b>Pixel Size (um)</b>	0.2533	0.288364	0.2533
<b>Clear Area Intensity</b>	240	240	240
<b>Counterstain Red OD</b>	0.690061	0.723791	0.690061
<b>Counterstain Green OD</b>	0.642132	0.626185	0.642132
<b>Counterstain Blue OD</b>	0.333889	0.289859	0.333889
<b>Biomarker 1 Red OD</b>	0.524596	0.590348	0.524596
<b>Biomarker 1 Green OD</b>	0.622713	0.627621	0.622713
<b>Biomarker 1 Blue OD</b>	0.580541	0.507524	0.580541
<b>Type</b>	Default	Default	Default
<b>Method</b>	Automatic	Automatic	Automatic
<b>-- Threshold Lower Limit</b>	0	0	0
<b>-- Threshold Upper Limit</b>	230	230	230
<b>Smoothing (µm)</b>	1.2	1	2.2
<b>Smoothing (Pixels)</b>	5	3	9
<b>Merging</b>	0.75	1.3	0.43
<b>Trimming</b>	Medium	Medium	Medium
<b>Min Size (µm<sup>2</sup>)</b>	20	15	15
<b>Min Size (Pixels)</b>	312	180	234
<b>Max Size (µm<sup>2</sup>)</b>	1000	1000	1000
<b>Max Size (Pixels)</b>	15586	15586	15586
<b>Roundness</b>	0.35	0.1	0.3
<b>Compactness</b>	0.225	0	0.23
<b>Elongation</b>	0.1	0.1	0.1
<b>Remove Light Objects</b>	0	0	0
<b>Weak (1+) Threshold</b>	210	210	210
<b>Moderate (2+) Threshold</b>	188	188	188
<b>Strong (3+) Threshold</b>	162	162	162
<b>Dark Nuclei Removal</b>	0	0	0

## 10.2 Assoziation des Ki67-labeling index mit dem Patientenalter, ohne Berücksichtigung des Geschlechts

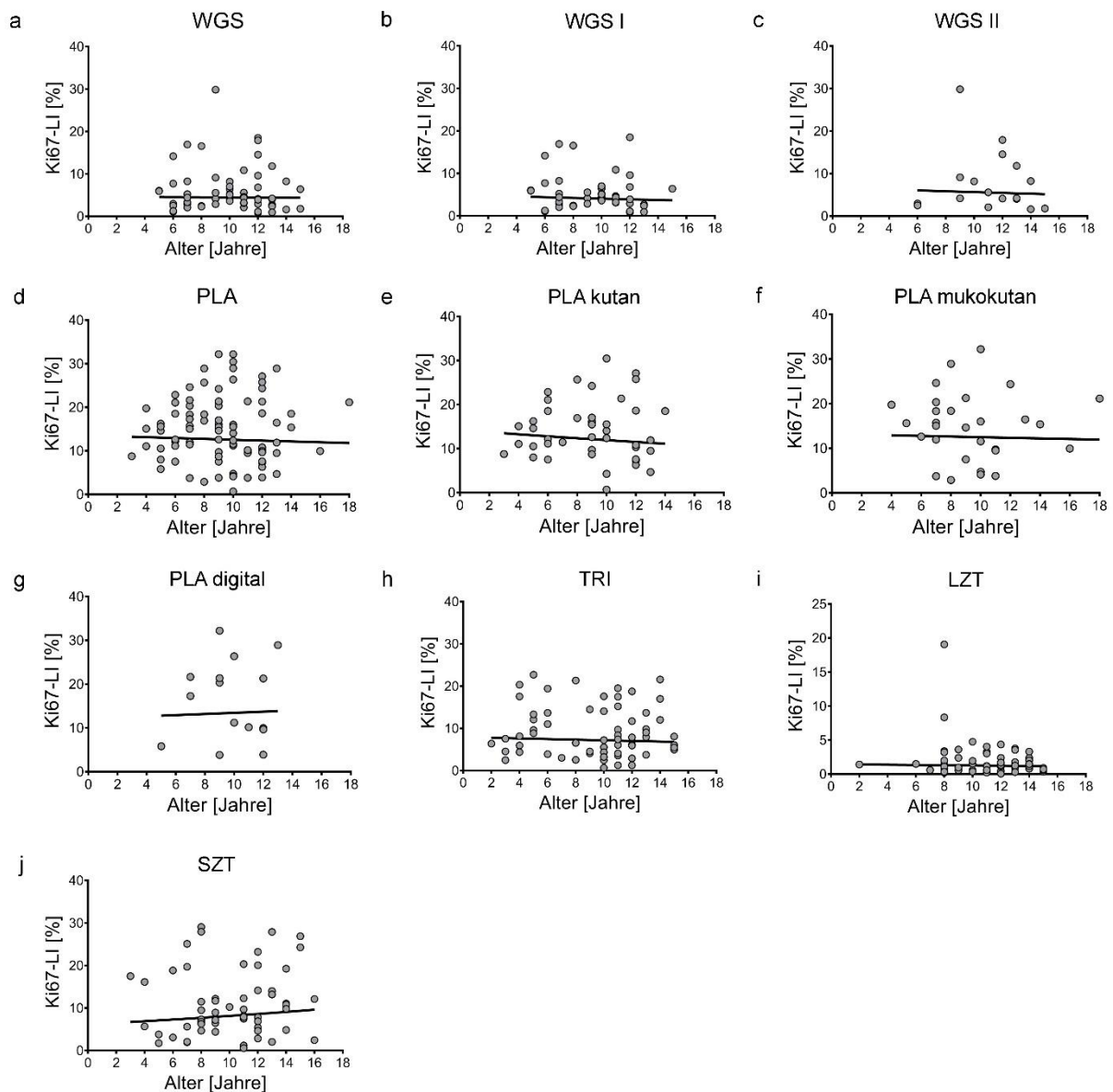
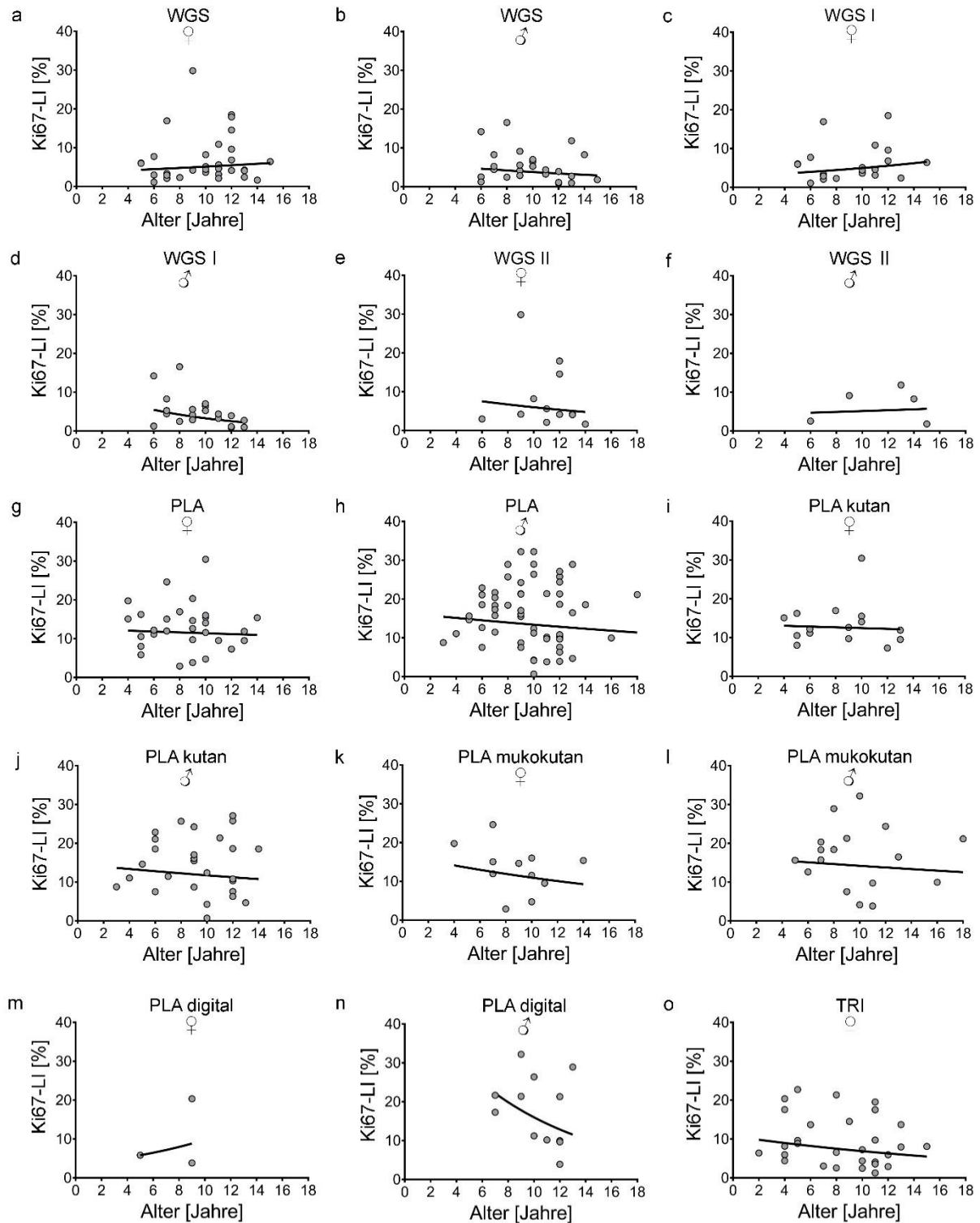


Abbildung 31: Weichgewebssarkome (WGS), Plasmazytome (PLA), Trichoblastome (TRI) sowie die untersuchten Hodentumore (Leydigzelltumore: LZT; Sertolizelltumore: SZT) wiesen keine signifikanten Assoziationen zwischen dem Ki67-LI und dem Patientenalter auf; die Regressionskurve wurde anhand eines log-linearen Modells angepasst.

**10.3 Assoziation des Ki67-Labeling index mit dem Patientenalter, mit Berücksichtigung des Geschlechts**



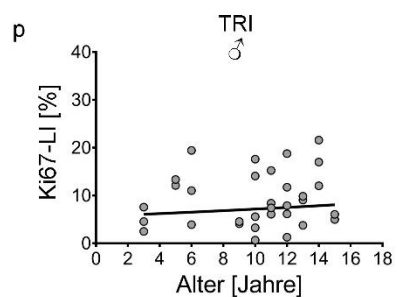
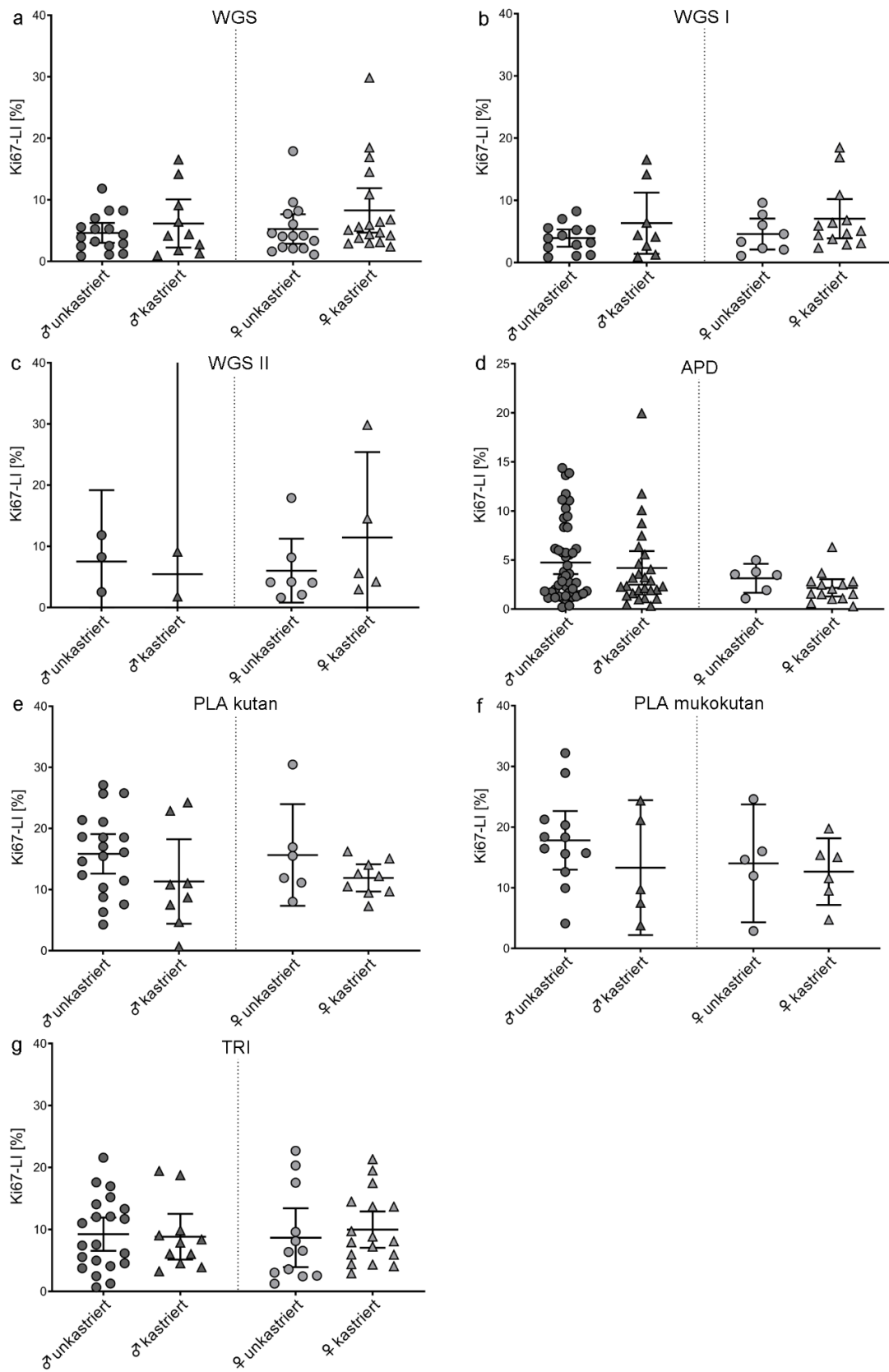


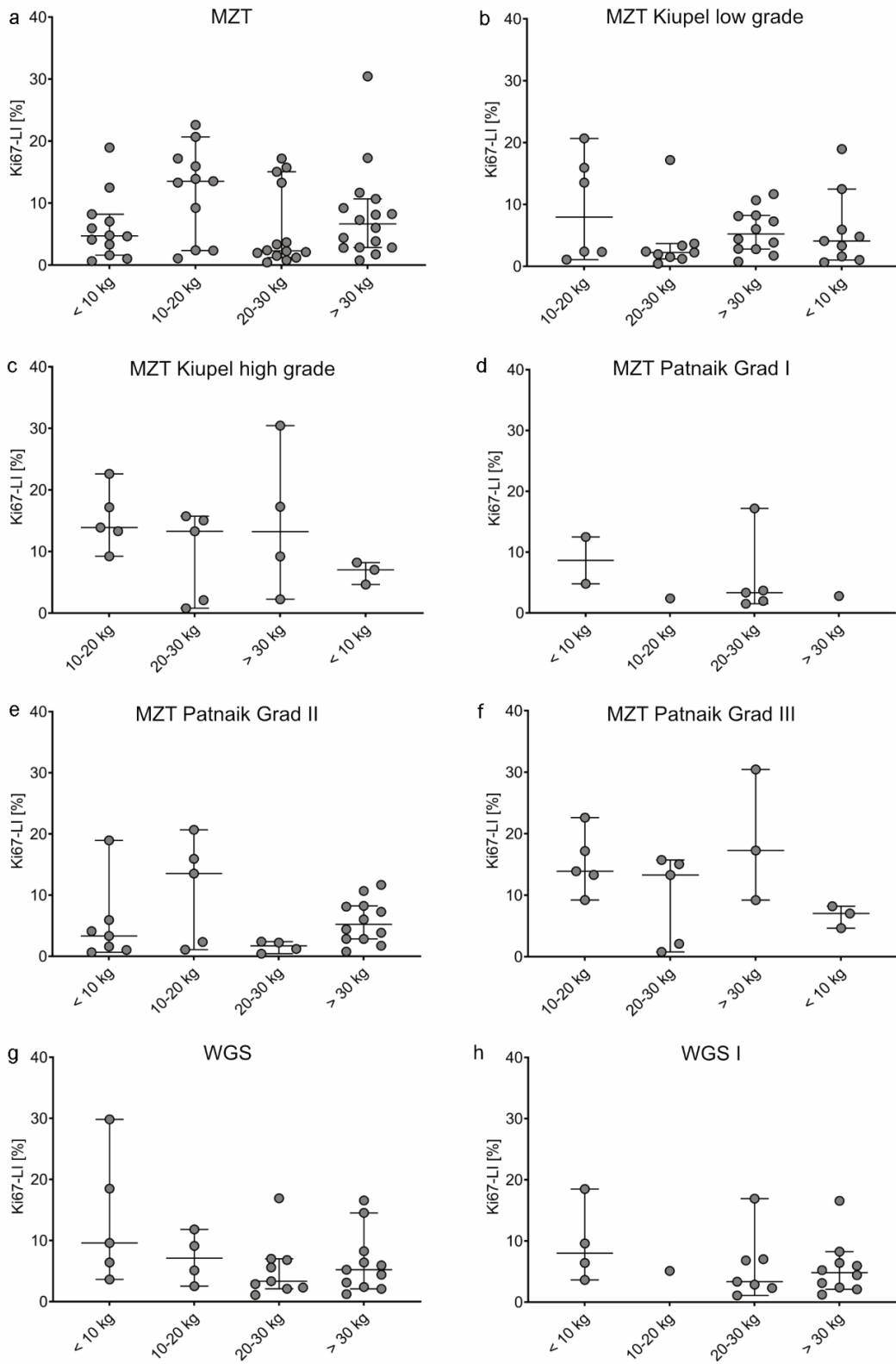
Abbildung 32: Weichgewebssarkome (WGS), Plasmozytome (PLA), und Trichoblastome (TRI) wiesen auch bei Berücksichtigung des Geschlechts der Tiere keine signifikanten Assoziationen zwischen dem Ki67-LI und dem Patientenalter auf; die Regressionskurve wurde anhand eines log-linearen Modells angepasst.

**10.4 Assoziation des Ki67-Labeling index mit dem Geschlecht und Kastrationsstatus**

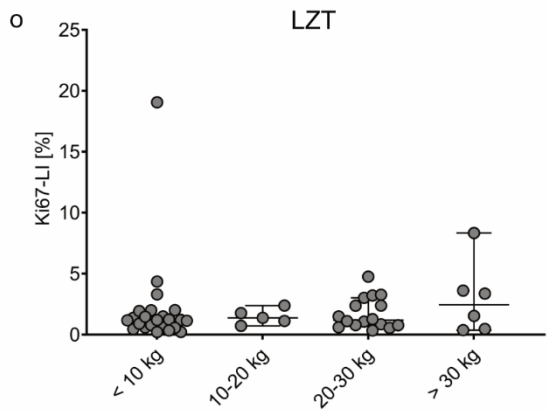
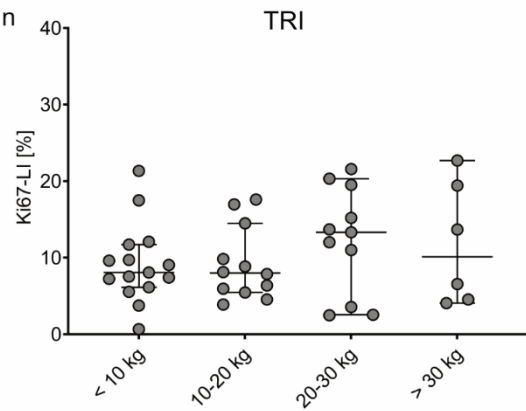
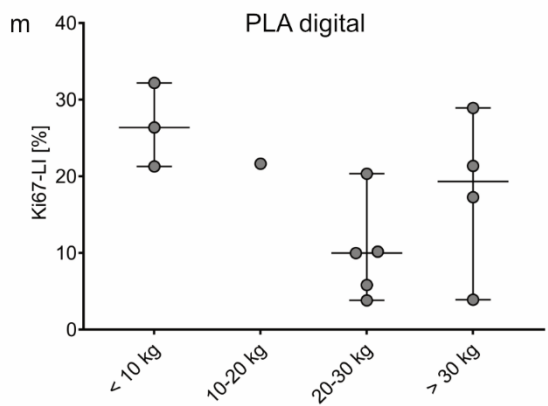
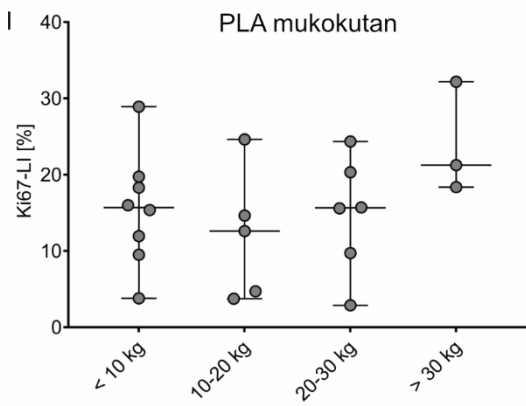
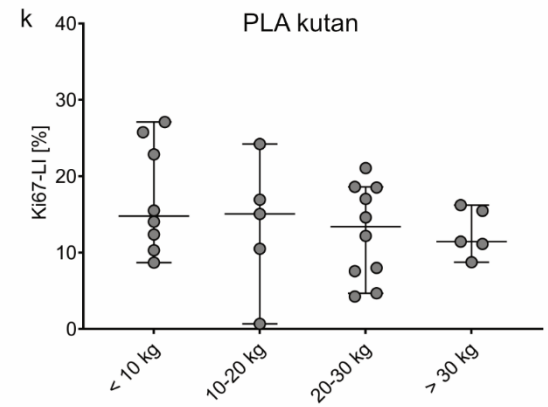
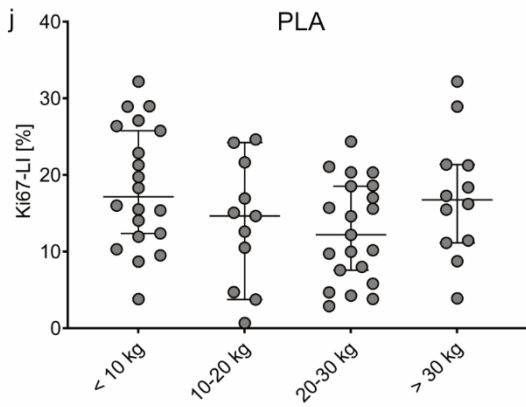
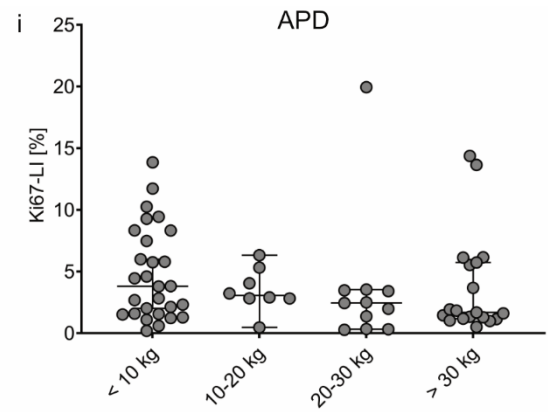
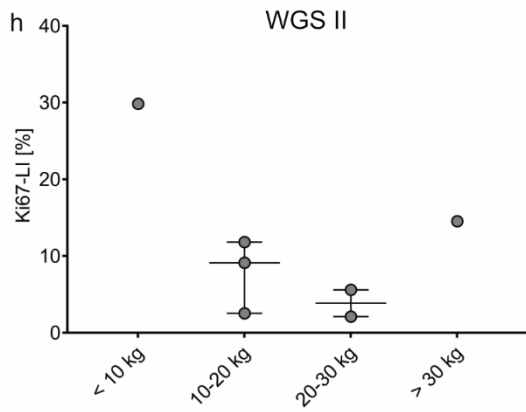


*Abbildung 33: Bei Weichgewebssarkomen (WGS), Plasmozytomen (PLA), und Trichoblastomen (TRI) zeigte sich in Assoziation mit dem Geschlecht oder Kastrationsstatus der Tiere kein signifikanter Unterschied des Ki67-LI; Scatter-Dot-Plot; Balken: Median; Fehlerbalken: 95 % Konfidenzintervall.*

**10.5 Assoziation des Ki67-Labeling index mit dem Körpergewicht sowie der -  
größe der untersuchten Tiere**







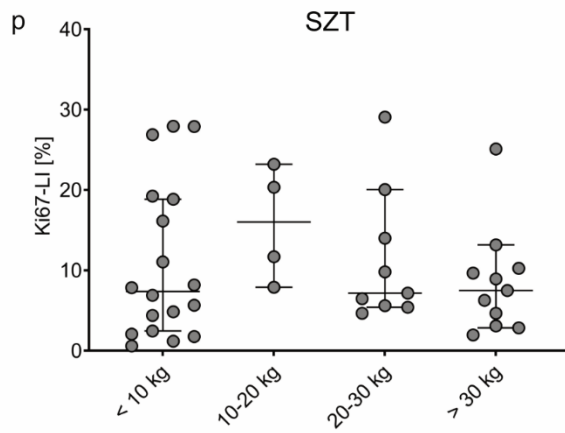
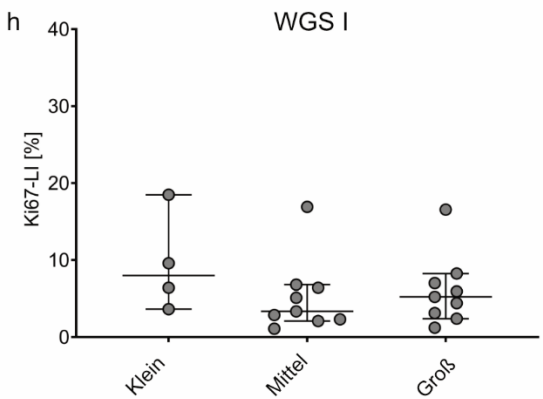
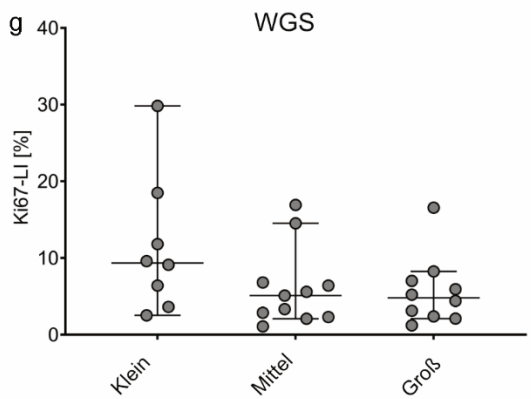
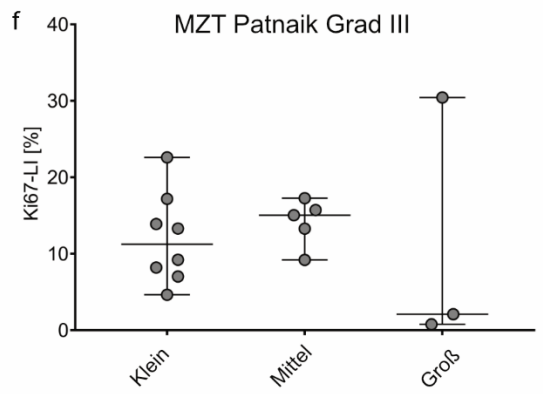
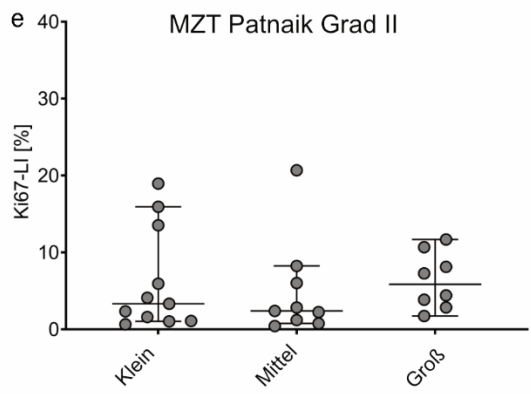
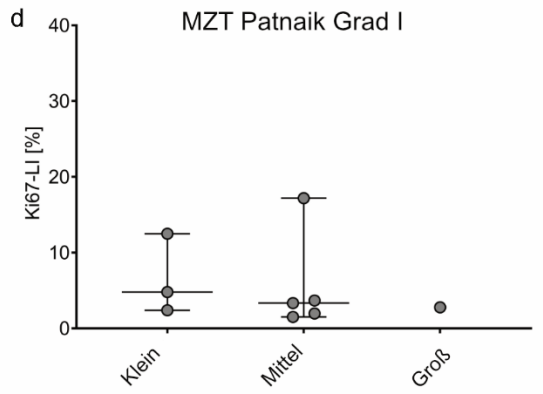
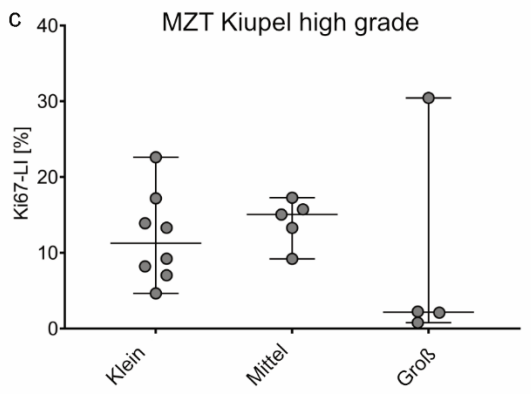
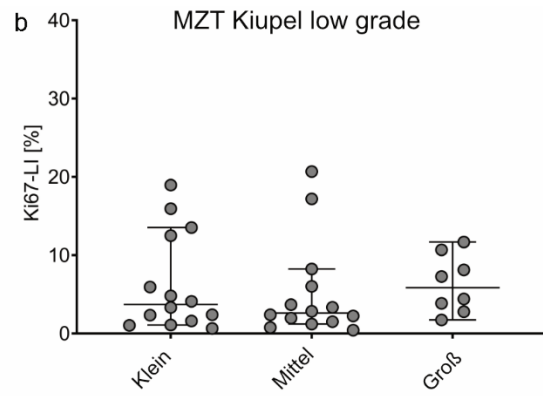
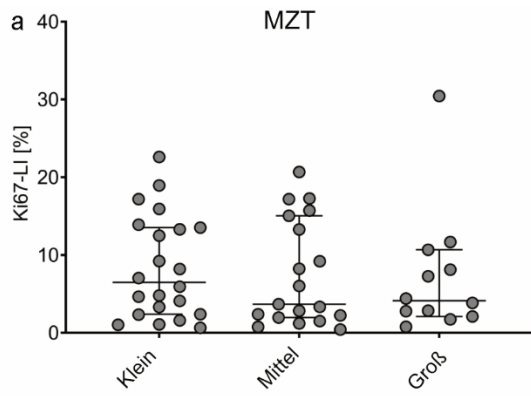
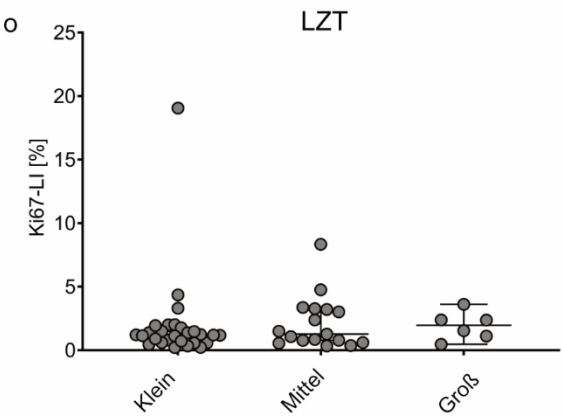
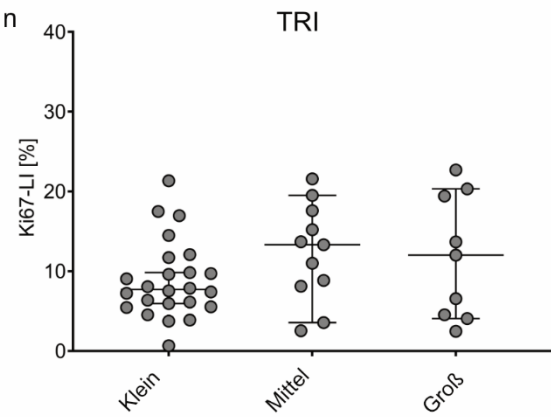
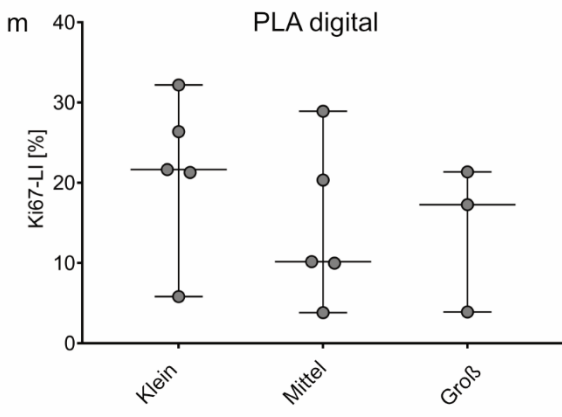
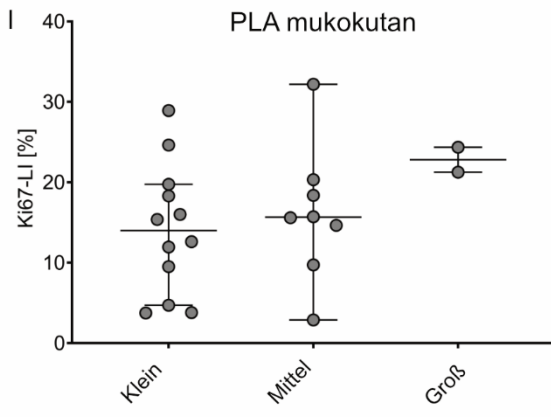
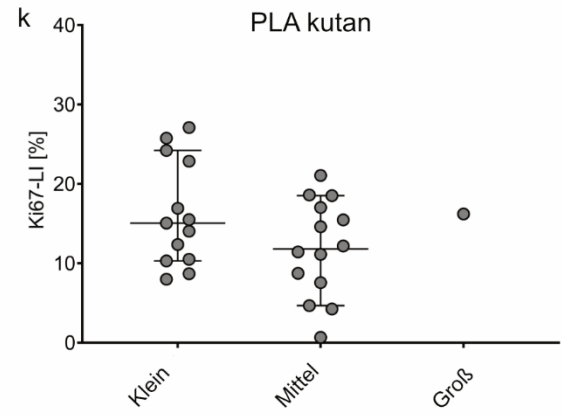
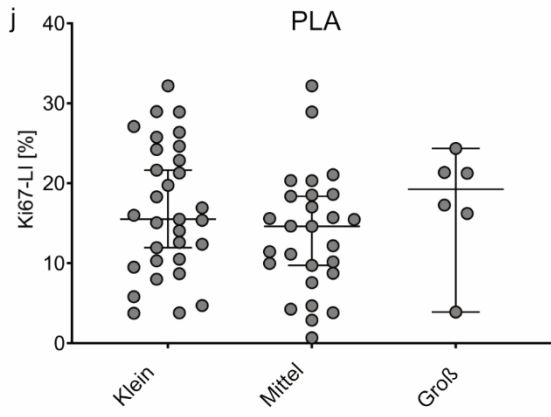
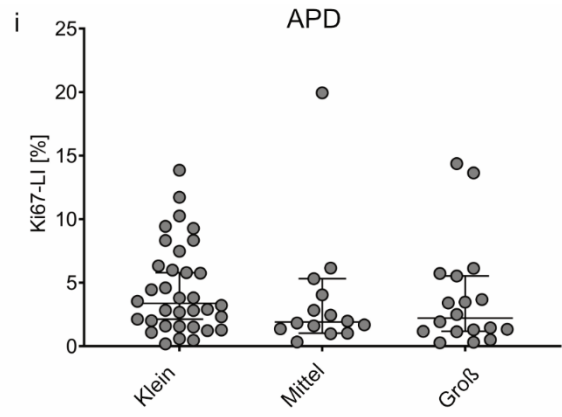
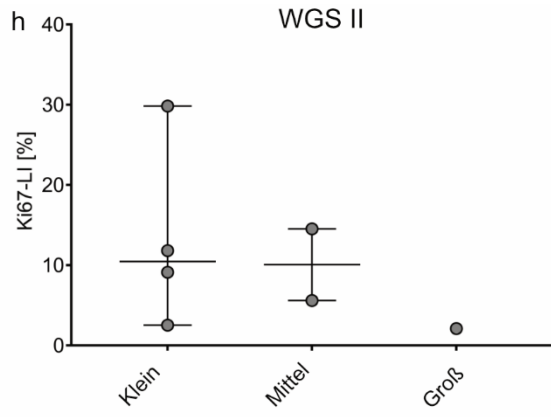


Abbildung 34: Bei keiner der untersuchten Tumorarten zeigte sich in Assoziation mit dem Körpergewicht der Tiere ein signifikanter Unterschied des Ki67-LI; Scatter-Dot-Plot; Balken: Median; Fehlerbalken: 95 % Konfidenzintervall.





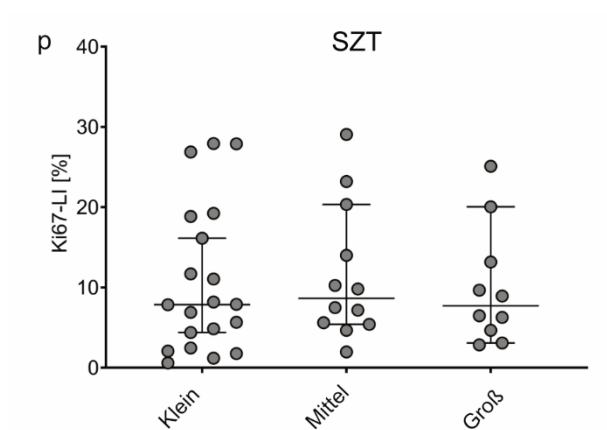


Abbildung 35: Bei keiner der untersuchten Tumorarten zeigte sich in Assoziation mit der Körpergröße der Tiere ein signifikanter Unterschied des Ki67-LI; Scatter-Dot-Plot; Balken: Median; Fehlerbalken: 95 % Konfidenzintervall.

**10.6 Assoziation des Ki67-Labeling index mit der Tumorgröße**

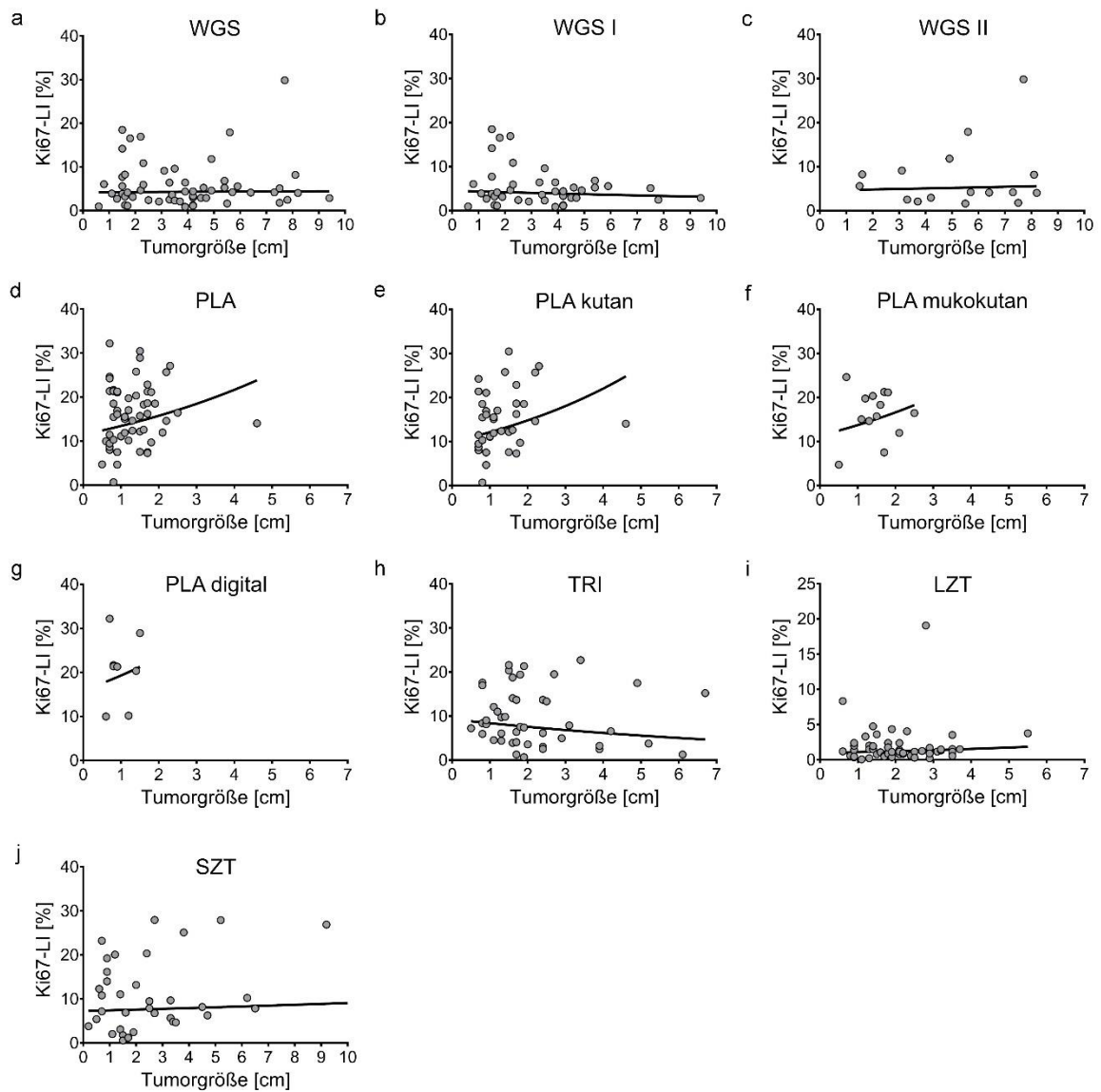
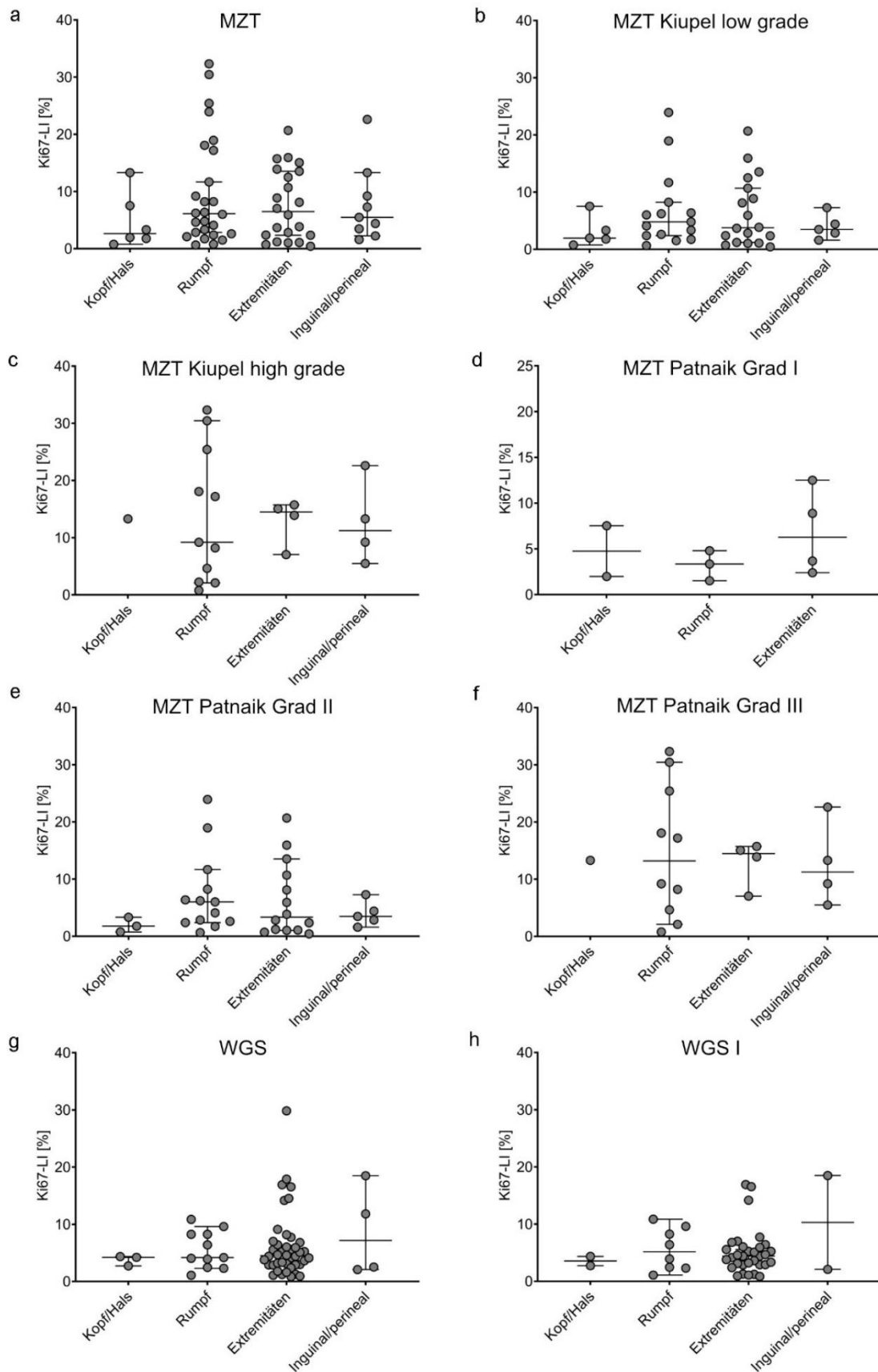


Abbildung 36: Weichgewebssarkome (WGS), Plasmozytome (PLA), Trichoblastome (TRI) sowie die untersuchten Hodentumore (Leydigzelltumore: LZT; Sertolizelltumore: SZT) wiesen keine signifikanten Assoziationen zwischen dem Ki67-LI und der Tumorgröße auf; die Regressionskurve wurde anhand eines log-linearen Modells angepasst.

**10.7 Assoziation des Ki67-Labeling index mit der Tumorlokalisation**



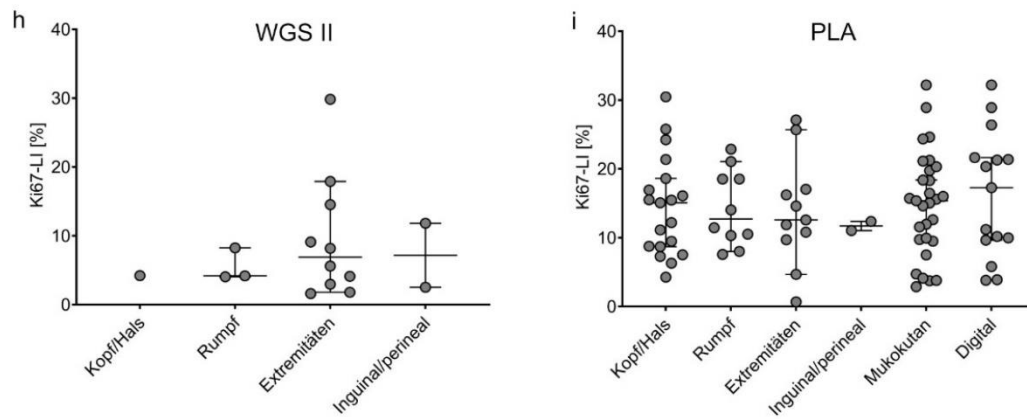


Abbildung 37: Bei keiner der untersuchten Tumorarten zeigte sich in Assoziation mit der Tumorlokalisierung ein signifikanter Unterschied des Ki67-LI; Scatter-Dot-Plot; Balken: Median; Fehlerbalken: 95 % Konfidenzintervall.



## 11 Publikationsverzeichnis

---

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab publiziert:

Zeitschrift mit Peer-Review:

1. Firsching T C, Dietert K, Bartel A, Doherr M G, Gruber A D (2022):

**Dependence of the Ki67 Labelling Index of Selected Canine Tumours on Patient Age, Sex and Tumour Size**

J Comp Pathol, 193, 1-8. doi: 10.1016/j.jcpa.2022.02.001

Eigenanteil: Tumorauswahl aus Archivmaterial, Immunhistochemie, Digitalisierung der immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate, Erstellung geeigneter Algorithmen in Aperio® zur digitalen Quantifizierung, manuelle Quantifizierung (MZT), Evaluierung und Auswertung der Daten

Abstracts und Kongressbeiträge:

1. Firsching T C, Gruber A D (2019):

**Wie alters- und genderneutral ist die Proliferation kaniner Tumorzellen?**

Vortrag: 62. Jahrestagung der Fachgruppe Pathologie in der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 01.-03.03.2019

Tierärztliche Praxis, 47, 209. doi: 10.1055/s-0039-1688608

2. Firsching T C, Dietert K, Gruber A D (2019):

**Does proliferation in canine neoplasms vary with patient age, sex or neutering status?**

Posterpräsentation: Jahrestagung der European Society of Veterinary Pathology und des European College of Veterinary Pathologists 05.-08.09.2018

J Comp Pathol, 166, 115. doi: 10.1016/j.jcpa.2018.10.047

## Danksagungen

---

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Bearbeitung des Projekts betreut, unterstützt, motiviert und inspiriert haben und zum Gelingen dieser Dissertation wesentlich beigetragen haben.

Herrn **Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D.**, geschäftsführender Direktor des Instituts für Tierpathologie, möchte ich für die Vergabe des spannenden Themas und die uneingeschränkte und zielgerichtete Betreuung insbesondere im Publikationsprozess danken. Vor allem bin ich auch dankbar, dass er mich bereits im Studium für eine berufliche Laufbahn in der Tierpathologie begeistert und zum Einschlagen dieser ermutigt hat.

Ebenso möchte ich **Dr. Kristina Dietert, PhD**, für ihr offenes Ohr und viele kleine und große Tipps und Ratschläge danken.

Besonders danken möchte ich auch **Judith Bushe**, die mit mir nicht nur während meiner gesamten Doktorandenzeit das Büro, sondern auch jegliche Freud und Leid geteilt hat. Ihr verdanke ich auch meine Einführung in die Laborarbeiten und zahlreiche schöne gemeinsame Stunden am Mikroskop.

Bei **Alexander Bartel** möchte ich mich für eine exzellente Begleitung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse bedanken.

**Dr. Sina Loriani** verdanke ich die überragenden Illustrationen, bei deren Erstellung er Dank meiner häufigen Änderungswünsche enorme Geduld bewiesen hat.

Bei all meinen KollegInnen des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin bedanke ich mich für eine stets nette und unterstützende Atmosphäre. Insbesondere **Charlene Lamprecht, Cornelia Zieger und Michaela Scholz** danke ich für ihre ausgezeichnete, technische Unterstützung. Meinen MitdoktorandInnen danke ich für das tolle Miteinander und heitere Mittagspausen. **Dr. Olivia Kershaw** danke ich für ihr Wissen, das sie geduldig und verständlich an uns DoktorandInnen weitergegeben hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei **meiner Familie** und insbesondere bei **meiner Mutter** für ihre stetige Unterstützung, ohne die das Studium der Veterinärmedizin für mich nicht möglich gewesen wäre und die geduldig nach Fehlern in dieser Arbeit gesucht haben. Meinem Bruder **Tobias** danke ich für seine finalen Formatierungskorrekturen und dafür, dass er einfach der beste Bruder ist, den man haben kann.

Mein größter Dank gilt jedoch meinem Mann **Philip**, der mich in allen Lebenslagen unterstützt, immer Verständnis und Geduld aufbringt, mich auch mal zum Innehalten ermutigt und mir das Wertvollste gibt, das ich habe. Du bist Alles für mich.

## **Finanzierungsquellen und Interessenskonflikte**

---

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

## **Selbstständigkeitserklärung**

---

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Hamburg, den 17.04.2023

Theresa Catharina Brömel









9 783967 292077  
**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-207-7