

EEN VOORBEREIDENDE STUDIE:
TRANSMISSIE-
ELEKTRONENMICROSCOPIE BIJ
CANIENE MASTCELTUMOREN
DEEL 1: RATIONALE

Rag Platteau

Studentennummer: 01803273

Promotor: Prof. dr. Ward De Spiegelaere

Promotor: Prof. dr. Hilde de Rooster

Promotor: Dierenarts Shana De Vos

Onderdeel van de Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de diergeneeskunde

Academiejaar: 2022 – 2023

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

Inhoudsopgave

1. Situering.....	1
1.1. Vooruitblik.....	1
1.2. De mastcel.....	1
1.3. Etiologie van caniene mastceltumor.....	1
1.4. Stagering en graderingssystemen van caniene MCTn.....	2
1.5. Behandeling van caniene MCTn.....	2
1.6. TEM.....	3
2. Probleemstelling.....	3
3. Doelstelling	4
4. Plan van aanpak.....	4
4.1. Werkwijze.....	4
4.2. Beperkingen.....	5
5. Literatuurlijst.....	6

Deze rationale is onderverdeeld in 3 hoofdpunten. Bij de situering wordt een beeld geschetst over wat een mastcel (MC), mastceltumor (MCT) en een transmissie elektronenmicroscop (TEM) is. Vervolgens wordt een beeld geschetst over wat deze masterproef wil onderzoeken en hoe dit een aanvulling kan zijn op de reeds beperkte bestaande kennis. Dit wordt de onderdelen “probleemstelling” en “doelstelling” besproken. Ten slotte wordt bij het onderdeel “plan van aanpak” aangehaald hoe men het onderzoek zal uitvoeren en enkele mogelijke complicaties die hiermee gepaard gaan.

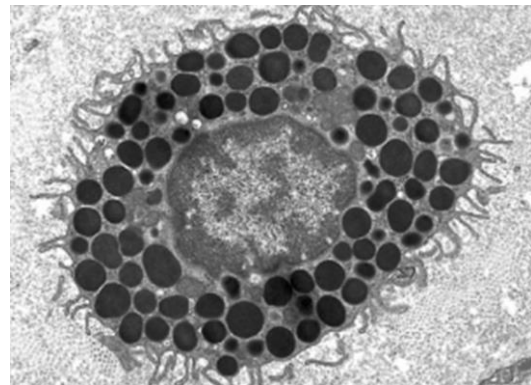
1. Situering

1.1 Vooruitblik

De rationale gaat over het gebruik van TEM voor de morfologische karakterisatie van caniene MCTn. Morfologische eigenschappen van een MCT zijn goed gekend onder de lichtmicroscop maar bij elektronenmicroscopie is hierover amper iets gekend. Deze masterproef heeft als doel deze kennis te vergroten.

1.2 De mastcel

Mastcellen komen algemeen in het lichaam voor. Ze ontstaan uit de differentiatie van hematopoëtische stamcellen, welke worden aangemaakt in het rode beenmerg (Parwaresch et al., 1985). Parwaresch vermeldde hierbij ook dat de definitieve differentiatie pas gebeurt in het bindweefsel of mucosa. Deze MCn bevatten een cytoplasma met granulen. Bij contact met een allergeen zal er degranulatie van de MC plaatsvinden waarbij de inhoud van de granulen vrijgesteld wordt. (Parwaresch et al., 1985). De granulen kunnen histamine, heparine, prostaglandines, serine protease, tumornecrosefactor, chemokines, cytokines, platelat activating factor, transforming growth factor β 1, interleukines of leukotriënen bevatten (Parwaresch et al., 1985; Huang et al., 1998). Deze componenten zijn verantwoordelijk voor de functie van de mastcel, namelijk de inductie van inflammatie en type I overgevoeligheidsreacties (Parwaresch et al., 1985; Huang et al., 1998).



Figuur 1: Normale mastcel onder de TEM. Uit: The Mast Cell Disease Society. Overview, Diagnosis, Definitions and Classification.

1.3 Etiologie van caniene MCTn

Mastceltumoren zijn de meest voorkomende huidtumoren bij de hond (21% van alle huidtumoren) en ze bestaan uit prolifererende mastcellen (Brodey, 1970; Finnie en Bostock, 1979; Bostock, 1986; Rothwell et al., 1987). Naast MCn zijn er ook vaak eosinofielen en fibroblasten aanwezig in deze tumor (Welle et al., 2008). Bij de lokale huidvorm spreekt men over solitaire/enkelvoudige of multipele MCTn. Hierbij worden subcutane MCTn als een aparte categorie beschouwd aangezien ze vaker een minder agressief karakter vertonen dan hooggradige cutane MCTn (Kiupel, 2016). Naast de lokale huidvorm bestaan ook viscerale MCTn en systemische MCTn (Davies et al., 1981; O’Keefe et al., 1987). Deze laatste beschrijft men als mastocytosis, maar deze presentatie is eerder zeldzaam bij de hond (Davies et al., 1981; O’Keefe et al., 1987). Hiervan zijn enkele gevallen geobserveerd bij puppy’s (Davis et al., 1992; Kiupel, 2016).

De etiologie is niet bij elke MCT bekend maar in ongeveer 30 tot 50% van de gevallen spelen mutaties in het c-kit gen een rol waardoor de MCn ongecontroleerd kunnen prolifereren zonder binding van stem cel factoren (Furitsu et al., 1993; Tsujimura et al., 1994; Downing et al., 2002). Er bestaan verschillende soorten mutaties in c-kit (London et al., 1999; Downing et al., 2002.). In tegenstelling tot de mens is er nog geen eenduidige mutatie aangetoond die op zichzelf het ontstaan van de MCT kan

verklaren maar men heeft wel een verband aangetoond tussen deze mutatie en een hogere gradering van de MCTn (Downing et al., 2002; London et al., 2007.). De oorzaken van deze mutatie en de etiologie van de overige MCTn is niet volledig gekend. Zoals de meeste tumoren is deze waarschijnlijk multifactorieel. Vooral bij oudere honden, gemiddeld 9 jaar, komen MCTn voor maar er zijn ook cases beschreven in jongere honden (Davis et al., 1992; Kiupel, 2016). Gender predispositie is niet duidelijk beschreven (Welle et al., 2008; London en Thamm, 2020). Anderzijds bestaan wel raspre-disposities, voornamelijk bij de boxer, bulldog, boston terriër, labrador & golden retriever, beagle, rhodesian ridgeback en weimaraner (Misdorp, 2004; Dobson en Scase, 2007; Welle et al., 2008; London en Thamm, 2020).

1.4 Stagering en graderingssystemen van caniene MCTn

Preoperatief is stagering van de MCT mogelijk. Met deze techniek kan men een beeld scheppen over hoe uitgebreid de MCT is, wat een directe invloed heeft op de therapeutische aanpak en de prognose (Thamm, 2013). Men kan 4 stages onderscheiden, waarbij een hoger stagering een slechtere prognose/verminderde levensduur heeft (Welle et al., 2008). De stagering is gebaseerd op de infiltratie van de MCT en de betrekking van regionale lymfeknopen in het proces wat vanaf stage 2 mogelijk is (Sledge et al., 2016). De mediane overlevingstijd voor stage 1 is 6,2 jaar terwijl men bij stage 2 slechts 0,8 jaar heeft (Krick et al., 2009). Goede informatie over de drainerende lymfeknopen is de basis voor een juiste stagering. Worley (2014) vermeldt dat metastasen niet altijd in de lymfeknoop gebeuren die anatomisch gezien het dichtste bij de MCT ligt. Bijgevolg is “mapping van sentinel lymfhe nodes” noodzakelijk. Men beschrijft dit als lymfeknopen die materiaal van de tumor, zoals cellen, draineren. Met andere woorden zijn dit de lymfeknopen met de hoogste kans op metastasen. Deze worden dan geselecteerd voor verder onderzoek (Worley, 2014).

Postoperatief zal men het biologische karakter van de MCTn indelen op basis van histologische gradering. Vroeger gebruikten veel laboratoria 2 systemen, namelijk het graderingssysteem van Patnaik (1984) met 3 graden en het 2-tier gradering systeem van Kiupel (2011). Via het Patnaik gradering systeem werden MCTn ingedeeld in graad I, graad II of graad III tumoren. Men beschouwt hier graad I als een benigne MCT met lage mortaliteit en weinig tot geen herval na behandeling terwijl graad III een maligne MCT is met hoge mortaliteit. Graad II zal vaak een onduidelijke prognose geven. Bijkomend bestaat er een grote variabiliteit tussen de pathologen bij de gradering van een MCT (Patnaik et al., 1984). Deze onduidelijkheid en variabiliteit heeft men minder bij het 2-tier gradering systeem van Kiupel (Kiupel et al., 2011). Hierbij zijn er 2 graden, een lage en een hoge graad die respectievelijk goedaardige en kwaadaardige eigenschappen hebben en dus een goede of slechte prognose (Kiupel et al., 2011). De recente consensus gebruikt een graderingssysteem met 4 graden waarbij men een graad I laag, graad II laag, graad II hoog en graad III hoog heeft (Berlato et al., 2021). Er wordt geadviseerd om beide graderingssystemen, Patnaik en Kiupel, te gebruiken bij de gradering van een MCT waardoor er 4 graden kunnen ontstaan (Berlato et al., 2021).

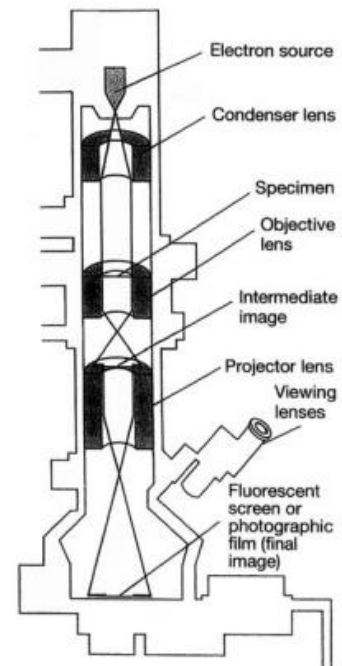
1.5 Behandeling van caniene MCTn

De beste prognose wordt nog steeds bekomen door chirurgische excisie (Dobson en Scase, 2007). Hierbij hebben de marges en de diepte bij excisie rondom de MCT invloed op het risico op lokale terugkeer van de tumor. Volgens Sledge et al. (2016) probeerden verschillende studies concrete marges voorop te stellen maar hierover is nog geen consensus. Men raadt aan om minstens 3 cm rondom de MCT en minstens 1 fascielaag diep te snijden (Teske et al, 2007; Sledge et al., 2016). Helaas is de histologische gradering nooit gekend voor de excisie plaatsvindt, wat de chirurgie bemoeilijkt. Cytologische gradering via een fijne naald aspiratie is wel mogelijk voor chirurgische excisie. Deze techniek is volgens De Nardi et al. (2022) goed voor de diagnose van een MCT maar kan slechte resultaten geven. De cytologische gradering gebeurt op basis van criteria uitgewerkt door camus et al. (2016) maar is geen vervanging voor histologische gradering. In de review van De nardi et al. werd als voorbeeld 5 “high-grade” tumoren gegeven die op cytologische gradering als “low-grade” werden

geclassificeerd (De Nardi et al., 2022). De marges zullen beïnvloed worden door de lokalisatie van de tumor en de gebruikte chirurgische techniek. Hierna is goede follow-up aangewezen en eventuele bijkomende therapie naargelang de gradering, staging en evaluatie van de marges na excisie (Sledge et al., 2016).

1.6 TEM

Elektronenmicroscopen gebruiken een elektronenbundel om stalen in beeld te brengen in tegenstelling tot een lichtbundel bij lichtmicroscopen (Reimer, 1984). Bij een transmissie elektronen microscoop (= TEM) zal de elektronenbundel doorheen een staal en verschillende lenzen gaan, waarbij de objectief lens voor vergroting van het beeld zorgt (Reimer, 1984; Hogg, 2013). Dit wordt geïllustreerd in figuur 2. Uiteindelijk vallen de elektronen op een fluorescent scherm wat het signaal omzet tot een waarneembaar beeld (Reimer, 1984; Hogg, 2013). Men kan dankzij de TEM structuren van elkaar onderscheiden die op 1 – 2nm van elkaar liggen (Hogg, 2013). De elektronen kunnen botsen met moleculen in de lucht waardoor ze afwijken van hun oorspronkelijke richting (Hogg, 2013). Om dit probleem te voorkomen, zal het proces plaatsvinden in een vacuüm wat in stand gehouden wordt door een pomp dat lucht wegduwt uit de microscoop wanneer men een staal inbrengt (Hogg, 2013).



Figuur 2: Illustratie van TEM. (Uit: Hogg, 2013.)

Het principe van TEM bestaat uit elektronen die doorheen een staal passeren en hierbij verstrooid worden naargelang de dichtheid van de verschillende delen (Hogg, 2013). Het beeld is zwart waar elektronen sterk verstrooid worden, hoge dichtheid, en licht waar elektronen amper tot niet verstrooid werden, lage dichtheid (Hogg, 2013). Deze stalen moeten zeer fijn gesneden worden, binnen 100 nm, anders worden de elektronen tegengehouden. (Hogg, 2013; Winey et al., 2014; Tang en Yang, 2017) De voorbereiding van de stalen bestaat uit meerdere stappen maar wordt hier niet besproken. Dit komt later aanbod in masterproef III.

Bij de stalen voorbereiding kunnen in elke stap complicaties optreden met directe gevolgen voor de weergave onder TEM. Deze worden kort besproken bij het onderdeel “plan van aanpak”.

2. Probleemstelling

Vandaag zijn alle graderingssystemen gebaseerd op het morfologisch uitzicht van MCTn onder de lichtmicroscoop. Het morfologisch uitzicht van MCTn bij elektronenmicroscopie is nog niet beschreven. Dit kan waardevolle informatie opleveren over de neoplastische MCn en de tumor in zijn geheel. De TEM is daarom een gepaste tool om MCTn te analyseren op microscopisch niveau met een hoge resolutie. Men kan de volgende onderzoeksvraag stellen: kan men de typische morfologische eigenschappen van de mastcellen en hun tumorale omgeving, die zichtbaar zijn onder de TEM, linken aan het biologisch karakter van caniene MCTn? Nieuwe bevindingen kunnen vastgesteld worden die voorheen niet zichtbaar waren via lichtmicroscopie. Deze bevindingen kunnen zorgen voor nieuwe systemen waardoor men MCTn beter/efficiënter kan classificeren dan met huidige graderingssystemen.

Het onderzoek van Bowles et al. (1972) heeft kort de morfologie beschreven van immature MCn uit caniene MCTn onder de TEM. Hierbij moet men rekening houden dat de studie in 1972 is uitgevoerd, nog voor er een graderingssysteem bestond van MCTn. Hiernaast worden de MCn beschreven als afkomstig uit immature MCTn en dus niet te vergelijken met MCTn dat in het onderzoek van deze masterproef worden geanalyseerd (Bowles et al., 1972). Veel informatie die hier wordt aangehaald is

verouderd of niet volledig correct aangezien er op dat moment nog geen uitgebreid onderzoek was verricht naar caniene MCTn. Zoals vermeld was er op dat moment nog geen graderingssystemen ontwikkeld en heeft men bijgevolg geen informatie over welke graad MCT er werd onderzocht.

3. Doelstelling

Deze masterproef biedt een antwoord op de vraag: “kan men de typische morfologische eigenschappen van de mastcellen en hun tumorale omgeving, die zichtbaar zijn onder de TEM, linken aan het biologisch karakter van caniene MCTn?” en vergroot de kennis van MCTn onder de TEM.

Ook de volgende vragen zullen worden beantwoord met dit onderzoek: “Hoe zien neoplastische MCn eruit onder de TEM?” en “Welke cellen zijn er, naast MCn, aanwezig en in welke maten?”. Hiernaast kan men kort aanhalen of classificeren van het biologisch karakter van een MCT via transmissie elektronenmicroscopie een haalbaar en vervangend alternatief kan zijn voor huidige graderingssystemen.

In de volgende paragrafen wordt de werkwijze van het onderzoek duidelijk gemaakt alsook enkele problemen aangehaald die zich kunnen voordoen tijdens het onderzoek.

4. Plan van aanpak

4.1 Werkwijze

Eerst zal er een overzicht gemaakt worden van alle beschikbare TEM stalen. Momenteel zijn er 25 stalen van verschillende patiënten. Vervolgens zal er in de literatuur gezocht worden naar de morfologische karakteristieken van verschillende celtypes bij TEM om zo de stalen correct te kunnen beoordelen. Bijkomend zal een checklist opgesteld worden die gebruikt zal worden tijdens de beoordeling. Deze checklist zal bestaan uit de verschillende morfologische eigenschappen van de MC, de andere celtypes, en de tumorale omgeving waaraan de stalen zullen worden afgetoetst (Tabel 1). Aan de hand van deze checklist zal er een schematisch beeld geven worden van het karakter van de tumorcellen en het omliggend weefsel. De criteria in deze checklist zullen moeten rekening houden met de grootte van een staal alsook de vergroting onder de TEM die minimum 250x kan zijn.

Hierna zullen er foto's/snapshots genomen worden van de stalen onder TEM. Dit zal gebeuren op 9 verschillende plaatsen waar telkens 4 snapshots zullen worden genomen op verschillende vergroting. 1 op 400x, 1 op 1000x, 1 op 2000x en 1 op 4000x of 5000x, afhankelijk van de mastcel. In totaal zal men zo 36 foto's bekomen. Er zal geblindeerd worden gewerkt om bias te voorkomen. Met andere woorden op dat moment zal enkel het staalnummer bekend zijn maar niet de histologische gradering. Met deze snapshots zal een 1^{ste} beoordeling uitgevoerd worden. Na de 1^{ste} beoordeling zullen de verschillende stalen met elkaar vergeleken worden en vervolgens een 2^{de} beoordeling krijgen.

Tabel 1: Voorbeeld van een voorlopige checklist.

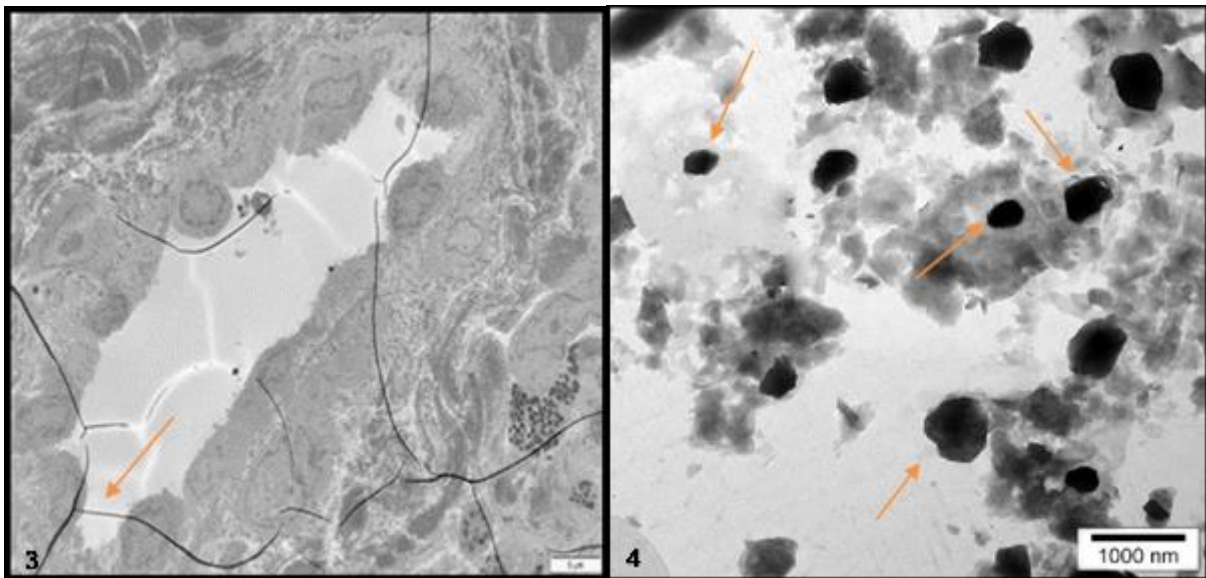
<i>Criteria</i>	<i>Beschrijving</i>
<i>Nucleus mastcel</i>	Compact/rond
<i>Granulen mastcel</i>	Voornameijk klein met veel degranulatie
<i>Vorm mastcel</i>	Langwerpig
<i>Cytoplasma mastcel</i>	Gedefinieerd, matige hoeveelheid
<i>Gegroepeerde mastcellen</i>	Ja: in stroken
<i>Aantal overige lymfoïde cellen</i>	Veel

4.2 Beperkingen van het onderzoek

Artefacten kunnen aanwezig zijn op de stalen. Deze kunnen ontstaan door slechte fixatie van het staal nog voor men een TEM staal maakt. Men raadt aan om het te fixeren monster niet dikker dan 4mm te maken, idealiter 3mm.¹ Een ander soort artefact is een snijartefact. Deze ontstaan tijdens het snijproces van de gewone stalen tot ultradunne stalen voor de TEM. Ultradunne stalen kunnen variëren van 50 µm tot 8 nm dikte. Dit gebeurt aan de hand van een microtoom en daardoor kunnen snijlijnen ontstaan (Hayat, 2000). Een ander soort artefact zijn zwarte vlekken die ontstaan door vuil op het staal zelf. Dit kunnen stofdeeltjes zijn maar ook andere substanties. Een laatste artefact dat wordt aangehaald en vaak aanwezig kan zijn, is een brandvlek. Dit wordt door de electronenbeam zelf veroorzaakt bij eerdere opnames. Deze artefacten kunnen de beoordeling van een staal bemoeilijken. Daarom beoordeelt men best in een beeld waarbij er geen of zo min mogelijk artefacten aanwezig zijn. Ter referentie toont figuur 6 een beeld van TEM waarbij er geen artefacten aanwezig zijn.

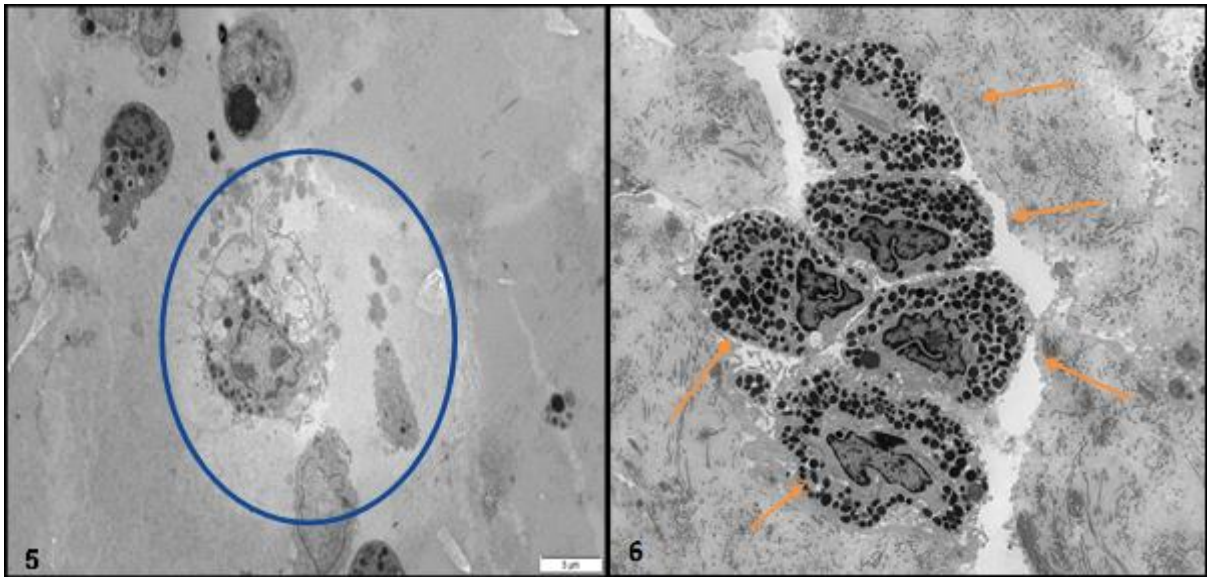
In het ideale scenario zou men van alle soorten MCTn (graderingen) een aantal stalen moeten bezitten. In dit onderzoek zijn er maar een beperkt aantal stalen. Tenzij dit later nog verandert, moet hiermee rekening gehouden worden bij de conclusie van het onderzoek, aangezien dit de power van het onderzoek verlaagd.

Bij de staalname van een MCT zou men meerdere stalen moeten nemen van verschillende regio's in de tumor om representatief te kunnen werken. Er kan bijvoorbeeld op 2 verschillende plaatsen in de tumor een ander uitzicht zijn van MCn. Daarom zijn analyses van meerdere stalen uit dezelfde tumor nodig. In dit onderzoek zijn er soms meerdere stalen genomen maar niet altijd. Indien er meerdere stalen zijn, is dit niet in een constant aantal. Soms zijn er 3 stalen genomen, andere keren 2. Dit kan ervoor zorgen dat de resultaten minder representatief zijn.



Figuur 3: Bloedvat in een mastceltumor. De oranje pijl duidt een snijartefact aan. Snijartefacten zijn zichtbaar als zwarte lijnen. Figuur 4: De zwarte vlekken, waarvan enkelen aangeduid zijn met oranje pijlen, zijn stofdeeltjes.

¹ Rolls, G., 2023. Fixation and Fixatives (2) – Factors Influencing Chemical Fixation, Formaldehyde and Glutaraldehyde.



Figuur 5: Brandvlek aangeduid met een blauwe cirkel (lichtere zone in het beeld) Een mastcel is weergegeven in het midden van de brandvlek. Figuur 6: 5 MCn, elk aangeduid met een oranje pijl, in een MCT. Geen artefacten aanwezig.

5. Literatuurlijst

1. Berlato, D., Bulman-Fleming, J., Clifford, C. A., Garret, L., Intile, J., Jones, P., Kamstock, D. A., Liptak, J. M., Pavuk, A., Powell, R., Rasotto, R., 2021. Value, Limitations, and Recommendations for Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Veterinary pathology* 58, 858-863.
2. Bostock, D. E., 1986. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *British Veterinary Journal* 142, 1 – 19.
3. Bowles, C. A., Kerber, W. T., Rangan, S. R. S., Kwapien, R., Woods, W., Jensen, E. M., 1972. Characterization of a Transplantable, Canine, Immature Mast Cell Tumor. *Cancer Research* 32, 1434–1441.
4. Brodey, R. S., 1970. Canine and feline neoplasia. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* 14, 309 – 354.
5. Camus, M. S., Priest, H. L., Koehler, J. W., Driskell, E. A., Rakich, P. M., Ilha, M. R., Krimer, P. M., 2016. Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome. *Veterinary pathology* 53, 1117 – 1123.
6. Davis, B. J., Page, R., Sannes, P. L., Meuten, D. J., 1992. Cutaneous mastocytosis in a dog. *Veterinary Pathology* 29, 363–365.

7. Davies, A. P., Hayden, D. W., Klausner, J. S., Perman, V., 1981. Noncutaneous systemic mastocytosis and mast cell leukemia in a dog: Case report and literature review. *The Journal of the American Animal Hospital Association* 17, 361-368.
8. De Nardi, A. B., Dos Santos Horta, R., Fonseca-Alves, C. E., De Paiva, F. N., Linhares, L. C. M., Firmo, B. F., Ruiz Sueiro, F. A., De Oliveira, K. D., Lourenço, S. V., De Francisco Strefezzi, R., Brunner, C. H. M., Rangel, M. M. M., Jark, P. C., Castro, J. L. C., Ubukata, R., Batschinski, K., Sobral, R. A., Da Cruz, N. O., Nishiya, A. T., Fernandes, S. C., Dos Santos Cunha, S. C., Gerardi, D. G., Challoub, G. S. G., Biondi, L. R., Laufer-Amorim, R., De Oliveira Paes, P. R., Lavalle, G. E., Huppes, R. R., Grandi, F., De Carvalho Vasconcellos, C. H., Dos Anjos, D. S., Luzo, Â. C. M., Matera, J. M., Vozdova, M., Dagli, M. L. Z., 2022. Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Cells* 11, 618.
9. Dobson, J. M., Scase, T. J., 2007. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. *Journal of Small Animal Practice* 48, 424–431.
10. Downing, S., Chien, M. B., Kass, P. H., Moore, P. F., London, C. A., 2002. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of c- kit in mast cell tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 63, 1718–1723.
11. Finnie J. W., Bostock D. E., 1979. Skin neoplasia in dogs. *Australian veterinary journal* 55, 602 – 604.
12. Furitsu, T., Tsujimura, T., Tono, T., Ikeda, H., Kitayama, H., Koshimizu, U., Sugahara, H., Butterfield, J.H., Ashman, L.K., Kanayama, Y., 1993. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product.. *Journal of Clinical Investigation* 92, 1736–1744.
13. Huang, C., Šali, A., Stevens, R. L., 1998. Regulation and Function of Mast Cell Proteases in Inflammation. *Journal of Clinical Immunology* 18, 169 – 183.
14. Hayat, M. A., 2000. Sectioning. In: *Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications*, Fourth Edn. Cambridge University Press, Cambridge, Verenigd Koninkrijk, pp. 139 – 210.
15. Hogg, S., 2013. Microbiology: What, Why and How?. In: *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons, Chichester, England, pp. 16-17.
16. Kiupel, M., 2016. Mast Cell Tumors. In: *Tumors in Domestic Animals*, Fifth Edn. John Wiley & Sons, Chichester, Engeland; pp. 176–202.
17. Kiupel, M., Webster, J. D., Bailey, K. L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C. J., Fitzgerald, S. D., Gamble, D., Ginn, P. E. et al., 2011. Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine

Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Veterinary Pathology* 48, 147-155.

18. Krick, E. L., Billings, A. P., Shofer, F. S., Watanabe, S., Sorenmo, K.U., 2009. Cytological lymph node evaluation in dogs with mast cell tumours: association with grade and survival*. *Veterinary and Comparative Oncology* 7, 130–138.
19. London, C. A., Kisseberth, W. C., Galli, S. J., Geissler, E. N., Helfand, S. C., 1996. Expression of stem cell factor receptor (c-kit) by the malignant mast cells from spontaneous canine mast cell tumours. *Journal of Comparative Pathology* 115, 399-414.
20. London, C. A., Galli, S. J., Yuuki, T., Hu, Z. -Q., Helfand, S. C., Geissler, E. N., 1999. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Experimental Hematology* 27, 689–697.
21. London, C. A., Thamm, D. H., 2020. Mast Cell Tumors. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, Sixth Edn. Elsevier Saunders, London, England, pp. 382-403.
22. Misdorp, W., 2004. Mast cells and canine mast cell tumours. A review. *Veterinary Quarterly* 26, 156–169.
23. O'Keefe, D. A., Couto, C. G., Burke-Schwartz, C., Jacobs, R. M., 1987. Systemic Mastocytosis in 16 Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1, 75–80.
24. Parwaresch, M. R., Horny, H. -P., Lennert, K., 1985. Tissue Mast Cells in Health and Disease. *Pathology - Research and Practice* 179, 439 – 461.
25. Patnaik, A. K., Ehler, W. J., MacEwen, E. G., 1984. Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. *Veterinary Pathology* 21, 469-474.
26. Reimer, L., 1984. Types of electron microscopy. In: *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*, first Edn. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 1 – 8.
27. Rothwell T. L., Howlett C. R., Middleton D. J., Griffiths, D. A., Duff, B. C., 1987. Skin neoplasms of dogs in Sydney. *Australian veterinary journal* 64, 161 – 164.
28. Sledge, D. G., Webster, J., Kiupel, M., 2016. Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *The Veterinary Journal* 215, 43-54.

29. Tang, C. Y., Yang, Z., 2017. Transmission Electron Microscopy. In: Membrane Characterization. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp 145-159.
30. Teske, E., Kirpensteijn, J., Rutteman, G. R., 2007. Het mastocytoom bij de hond. Tijdschrift voor Diergeneeskunde 132, 122 – 126.
31. Thamm, D. H., 2013. Miscellaneous tumors: Hemangiosarcoma. In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, fifth Edn. Elsevier Saunders, St. Louis, MI, USA, pp. 679–688.
32. Tsujimura, T., Furitsu, T., Morimoto, M., Isozaki, K., Nomura, S., Matsuzawa, Y., Kitamura, Y., Kanakura, Y., 1994. Ligand-independent activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a murine mastocytoma cell line P-815 generated by a point mutation. Blood 83, 2619 – 2626.
33. Welle, M. M., Bley, C. R., Howard, J., Rüfenacht, S., 2008. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. Veterinary Dermatology 19, 321–339.
34. Winey, M., Meehl, J. B., O'Toole, E. T., Giddings Jr., T. H., 2014. Conventional transmission electron microscopy. Molecular Biology of the Cell 25, 319-323.
35. Worley, D. R., 2014. Incorporation of sentinel lymph nodemapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures. Veterinary and Comparative Oncology 12, 215-226.