

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Untersuchtes Gewebe

Grundlage dieser Arbeit sind die von Tierarztpraxen und Tierkliniken eingesandten Gewebeproben aus dem Archiv des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin. In die Untersuchung werden 194 Histiozytome von bis zu zwei Jahre alten Hunden aus den Jahren 1997 bis 1999 einbezogen. Die Gewebe liegen nach 4-10%iger Formalinfixierung in Paraffin eingebettet vor. Soweit vorhanden werden die Daten über Rasse, Alter, Geschlecht und Lokalisation der Neoplasien aus den Vorberichten der Einsendungen ausgewertet. Die untersuchten Gewebeproben sind chronologisch nach ihren E-Nummern und dem Einsendungsjahr in den Tabellen im Anhang (S. 103-107) aufgeführt. Für die immunhistochemischen Untersuchungen der Lymphozytenmarker werden zur Kontrolle unveränderte Lymphknoten vom Hund aus dem Sektionsgut eingesetzt.

3.1.2 Antikörper, Seren, Antiseren, Reagenzien, Materialien und Geräte

3.1.2.1 Antikörper

Zur Darstellung der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen werden vier (drei T-Zell-spezifische, ein B-Zell-spezifischer) Antikörper getestet. Zusätzlich kommt der Proliferationsmarker MIB1 zur Anwendung.

Tabelle 4: T-Lymphozyten-Antikörper

Primärantikörper	Zellspezifität	Klon	Gewebespezifität	Hersteller
CD3	Pan-T-Zell-Marker neoplastische T-Zellen	polyklonal	Mensch	Dako (A 0452)
CD4	T-Helfer-Zellen	monoklonal YKIX 302.9	Hund	Serotec (MCA1038)
CD8	T-Suppressor-Zellen	monoklonal YCATE 55.9	Hund	Serotec (MCA1039)

Tabelle 5: B-Lymphozyten und Proliferations-assoziiertes-Antikörper

Primärantikörper	Zellspezifität	Klon	Gewebespezifität	Hersteller
CD 79a	Pan-B-Zell-Marker neoplastische B-Zellen Plasmazellen	monoklonal HM57	Mensch	DAKO (M 7051)
MIB1	Zellproliferations- assoziiertes, nukleäres Ki-67-Antigen	monoklonal MIB1	Maus	DAKO (M 7240)

3.1.2.2 Seren, Reagenzien, Materialien und Geräte

Die zur Anfertigung und Färbung der Schnitte benötigten Substanzen und Geräte werden in den nachfolgenden Tabellen 6-9 aufgelistet.

Tabelle 6: Antiseren und Substrate der B-SA-Methode:
Super Sensitive Multi Link (Sekundärantikörper), Super Sensitive Label

Antikörper gegen	Klon	Hersteller (Bestellnummer)
StrAviGen Super Sensitive Immundefektion System bestehend aus: Biotinylierter IgG für Maus, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten Antikörper Alkaline Phosphatase konjugiertes Streptavidin	Polyklonal	BioGenex (Q A900-9L)

Tabelle 7: Antiseren und Substrate der ABC-Methode

Antikörper	Hergestellt in Tierart	Hersteller (Bestellnummer)
StreptABComplex/HRP bestehend aus: Reagenz A: Streptavidin Reagenz B: biotinylierte Meerrettich-Peroxidase	Streptomyces avidinii	DAKO (K 0377)
Biotinylierte Ziege-anti-Maus Immunglobuline	Maus	DAKO (E 0433)

Tabelle 8: Materialien und Substanzen, Hersteller und Bestellnummern

Materialien/Substanzen	Hersteller (Bestellnummer)
3-Aminopropyltriethoxy-Silane	Sigma (A 3648)
Xylol	Merck (8685)
Aceton	Merck (13)
Objekträger	Langenbrink (1492277)
Aqua destillata	B. Braun Meisungen AG (0886/11)
Trizma Base	Sigma (T 1503)
Trizma Hydrochlorid	Sigma (T 3253)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (6404)
Alkohol	
Protease aus <i>Streptomyces griseus</i>	Sigma (P 6911)
RPMI 1640 Medium	Biochrome KG (F 1215)
Levamisole	Sigma (L 9756)
Fast-Red TR Salz	Sigma (F 2768)
NaOH (2N)	Merck (9136)
EDTA	Merck (8421)
Fetales Kälberserum	Seromed (SO 113)
Ziegennormalserum	Sigma (G 9023)
Natriumazid	Merck (6688)
Naphthol-AS-MX-Phosphat	Sigma (N 4875)
Naphthol-AS-BI-Phosphat	Sigma (N 2250)
Wasserstoffperoxid	Merck (822287)
3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB)	DAKO (K 3466)
N,N-Dimethylformamid (= DMF)	Merck (3053)
Neufuchsin	Merck (4040)
Natriumnitrit (NaNO ₃)	Merck (102 F 0220)
Kaiser's Glyceringelatine	Merck (9242)
Target Retrieval Solution, 10x konzentriert	DAKO (S1699)
Histosafe-Enhacer (Corbitbalsam)	Camon (E 7000)
Hämatoxylin	Chroma (5B535)
Eisenhämatoxylin	Chroma (2EO52)

Tabelle 9: Geräte und Artikel, Gerätetyp bzw. Bestellnummer und Hersteller

Geräte, Artikel	Gerätetyp / Bestellnummer	Hersteller
Mikrotom	Microm HM 350 Heidelberg Ser.-No. 2864	Microm GmbH D-6909 Walldorf
Mikrowellengerät (750 Watt)	Type HMT – 712 A (weiß) A-001	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, D-Berlin
Mikrowellen-Kochtopf aus Glas	Pyrex®	Corning, LTD Consumer Division, Sunderland
Sequenza™	73300003	Shandon
Cover-Plates®	72110013	Shandon
Digitalkamera	Coolpix 4500	Nikon
Mikroskop	Axioplan	Zeiss

3.2 Methoden

3.2.1 Rasse-, Alters- und Geschlechtsverteilung

Den Vorberichtsbögen werden Rasse, Geschlecht einschließlich eventuell durchgeführter Kastrationen und das Alter der Patienten entnommen. Das Alter wird in Jahren angegeben.

3.2.2 Lokalisation der Tumore

Anhand der Vorberichtsbögen wird die Lokalisation der einzelnen Tumore ermittelt, einer bestimmten Körperregion zugeordnet und mit einer Zahl bezeichnet. Die Einteilung erfolgt nach dem in Tabelle 10 beschriebenen Schema.

Tabelle 10: Zuordnung der Tumorlokalisation zu verschiedenen Körperregionen

Region	Enthaltende Körperteile	Zahl
Kopf und Hals	Ohren, Lefze, Unterlippe, Stirn, Nase, Oberlid, Hals	1 Kopf
		2 Hals
Extremitäten	Metatarsus, Unter- u. Oberschenkel, Tarsus, Kniefalte, Sprunggelenk, Oberschenkel, Schulter, Ellenbogen, Unterarm, Carpalgelenk, Achsel	3 Vorderextremitäten
		6 Hinterextremitäten
Rumpf	Kruppe, Thorax Abdomen	4 Rücken
		5 Abdomen
Rute		7
Pfoten	Zehen, Mittelfuß	9
Ohne Angabe		8

3.2.3 Größe der Tumore

Da die Angaben aus den Vorberichten der Einsendungen zumeist wenig Aufschluss über die exakte Größe des jeweiligen Tumors gaben, weiterhin durch die Fixation während der Versendungszeiten Änderungen eintreten und die Aufzeichnungen in den Institutstagebüchern vor der Einbettung der Proben ebenfalls zu unterschiedlich in ihrer Genauigkeit sind, werden die Tumore anhand ihres Erscheinungsbildes in den Paraffinblöcken in drei Gruppen eingeteilt:

Tabelle 11: Größeneinteilung der Tumore

bis 1 cm ²	Größe 1
1-2 cm ²	Größe 2
> 2 cm ²	Größe 3

3.2.4 Gewebeaufbereitung

3.2.4.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Von den vorhandenen Proben werden Serien zu je sechs Schnitten pro Gewebeprobe mit einer Dicke von 3-5µm auf einem Mikrotom angefertigt. Die für die Immunfärbungen (inklusive Vorversuchen) vorgesehenen Schnitte werden anschließend auf mit 3-Aminopropyltriethoxy-Silane beschichtete Objektträger gezogen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Für die HE-Färbung bestimmte Schnitte werden auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen und ebenfalls über Nacht getrocknet.

3.2.4.2 Herstellung der Gefrierschnitte

Unveränderte Lymphknoten aus dem Sektionsgut werden in Aluminiumfolie eingewickelt und in flüssigen Stickstoff getaucht. Anschließend werden 4-5 µm dicke Schnitte im Kryostaten angefertigt, auf 3-Aminopropyltriethoxy-Silane beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgt eine zehnmünütige Fixierung bei Raumtemperatur in Aceton mit anschließender Lufttrocknung. Die so angefertigten

Schnitte werden fünf Minuten in Trispuffer inkubiert und können dann zur immunhistochemischen Färbung verwendet werden.

3.2.5 Nachweismethoden

3.2.5.1 Routinefärbung

Es werden routinemäßig HE-gefärbte Schnitte hergestellt, um zunächst grundsätzlich die Diagnose „Histiozytom“ zu überprüfen. Zusätzlich wird anhand dieser Schnitte das Ausmaß an Ulzeration und Nekrosen innerhalb der einzelnen Gewebeproben beurteilt. Die Färbung wird entsprechend der Anweisung von Romeis und Böck (1989b) durchgeführt.

3.2.5.2. Immunhistochemie

3.2.5.2.1. Färbemethoden

Die Antigendarstellung erfolgt bei allen verwendeten Antikörpern mittels des B-SA-Nachweissystems (Boenisch, 1989). Im Falle des CD79 α wird darüber hinaus eine Antigendarstellung mit Hilfe der ABC-Methode versucht. Das Prinzip dieser Färbungen sowie die verschiedenen Methoden zur Antigendemaskierung werden im Literaturteil dieser Arbeit näher erläutert (s. Punkt 2.6, S. 19-24). Die detaillierte und modifizierte Färbeanleitung (s. Punkt 3.2.5.2.6, S. 37) für die ABC-Methode wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. Monir Majzoub, wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Tierpathologie der Universität München, zur Verfügung gestellt.

3.2.5.2.2 Rezepturen für die immunhistochemischen Färbungen

Silane

3-Aminopropyltriethoxysilane	4 ml
Aceton	196 ml
Objektträger in die Lösung einstellen	1 min
2 Küvetten Aceton mit jeweils	200 ml
Objektträger kurz spülen	2x
Trocknen im Wärmeschrank bei 60°C	über Nacht

Blockierung der endogenen Peroxidase:

aqua dest.	194 ml
30% iges H ₂ O ₂	6 ml

Tris-Puffer (TBS), pH 7,4-7,6

aqua dest.	5,0 l
Trizma Base	4,5 g
Trizma Hydrochlorid	33,0 g
Natriumchlorid	43,9 g

TBS auf pH 7,4-7,6 mit Natriumhydroxid (NaOH) einstellen

Zitratpuffer 10mM, pH 6,0

Stammlösung A	9 ml
(0,1 M Zitronensäure = 21,01 g C ₆ H ₅ O ₇ x H ₂ O in 1000 ml aqua dest.)	
Stammlösung B	41 ml
(29,41 g C ₆ H ₅ O ₇ Na x 2H ₂ O in 1000 ml aqua dest.)	
aqua dest.	ad 500 ml

Pronase

Protease (aus Streptomyces griseus)	0,2 g
TBS	200 ml

EDTA

EDTA	125 g
aqua dest.	100 ml
40%ige NaOH (1 molar)	25 ml
aqua dest.	ad. 400 ml

Target-Lösung

DAKO Target Retrieval Solution 10x konzentriert:
1 Teil Target-Lösung auf 9 Teile aqua dest.

RPMI-Verdünnungspuffer 1

RPMI 1640	50 ml
Inaktiviertes Kälberserum (FKS)	5,0 ml
NaAzid	1-2 Spatelspitzen

Der pH wird mit Trizma-Hydrochlorid und Trizma-Base auf 7,4-7,6 eingestellt.

Antikörper-Lösung

RPMI-Verdünnungslösung (Menge abhängig
von Antikörper-Konzentration und Präparatenanzahl)
Antikörper (abhängig von der Verdünnung)

Die ausgetesteten Verdünnungsstufen sind in Tabelle 12 (S. 35) dokumentiert.

Biotinylierter Antikörper

Zu der benötigten Antikörpermenge des biotinylierten Ziege-anti-Maus-Ig-Antikörpers werden 5% dieser Menge Ziegennormalserum absorbiert. Anschließend wird diese Mischung im Verhältnis 1:200 in TBS verdünnt.

ABC-Komplex

TBS	1000 µl
Reagenz A (Avidin)	10 µl
Reagenz B (Biotin)	10 µl

Nach dem Mischen muss die Lösung vor der Anwendung 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen werden.

DAB-Chromogen-Lösung

DAB	6 mg
0,05 M TBS (pH 7,6)	10 ml
H ₂ O ₂ (3 %ig)	0,1 ml

Die 6 mg DAB werden in 10 ml TBS gelöst und anschließend die 0,1 ml Wasserstoffperoxid zugegeben.

Substrat/Fast-Red Gemisch

Naphthol-AS-MX-Phosphat	20 mg
N,N-Dimethylformamid (DMF)	2 ml
TBS, pH 8,2 (+ NaOH)	98 ml
Levamisole 1M	2,5 mg
aqua dest.	100 µl
Fast-Red TR Salz	100 mg

Naphthol-AS-MX-Phosphat wird in N,N-Dimethylformamid gelöst und mit TBS (pH 8,2) aufgefüllt. Diese Mischung ist im Kühlschrank mindestens vier Wochen haltbar. Unmittelbar vor Gebrauch wird das Levamisol in aqua dest. gelöst, hinzugefügt und in diesem Gemisch das Fast-Red TR Salz gelöst und anschließend filtriert.

Neufuchsin-Gemisch

TBS, pH 8,7 (+ NaOH)	200 ml
Natriumnitrit (NaNO ₃)	0,1 g (4%)
in 2,5 ml aqua dest. gelöst	
Neufuchsin	0,4 ml
Levamisole 1M	2,5 mg
In 200 µl aqua dest. gelöst	
Naphthol-AS-BI-Phosphat	0,1 g
N,N-Dimethylformamid (=DMF)	1,2 ml

0,1 g Natriumnitrit werden in 2,5 ml aqua dest. gelöst und davon 1 ml mit dem Neufuchsin gemischt (ca. 30-60 Sekunden schütteln – Vorsicht: Druckentwicklung!). Anschließend wird das entstandene Gemisch dem TBS hinzugefügt und das in aqua dest. gelöste Levamisole dazugegeben. Das Naphthol-AS-BI wird dann mit dem DMF gemischt und ebenfalls der Lösung zugefügt. Das entstandene Gemisch wird nachfolgend filtriert.

Lösungen für die Kernfärbung

Hämalaun nach Mayer (Romeis, 1989b)

Eisenhämatoxylin nach Weigert (Romeis 1989b)

3.2.5.2.3 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemische Färbung wird im Falle der B-SA-Methode in den Inkubationskammern (SequenzaTM) der Firma Shandon durchgeführt. Hierzu werden die Objektträger in Coverplates[®] eingelegt und in die SequenzaTM senkrecht platziert. Dabei entsteht ein kapillarer Spalt zwischen Objektträger und Coverplate[®] mit einem Volumen von 80 µl. In diesem Spalt wird die aufpipettierte Reagenz bis zur Zugabe weiterer Flüssigkeit gehalten. Für die ABC-Methode wird das Prinzip der feuchten Kammer verwendet.

3.2.5.2.4 Vorversuche: Antikörperverdünnungen und Vorbehandlungen

Da sich je nach Gewebe die Sensitivität der Antikörper verändert, ist es wichtig, auch bei bereits etablierten Antikörpern diese gezielt neu auszutesten. Daher wird für jeden Antikörper (Tabelle 12, S. 35) die beste Verdünnung und die optimale Vorbehandlung und Einwirkzeit für die Histozytom-Präparate ermittelt. Zur Demaskierung der Oberflächenantigene wurden vier verschiedene Vorbehandlungen getestet:

1. Vorverdauung in einer 0,1%igen Pronase-Lösung
2. Mikrowellenbehandlung bei 600 Watt in Zitratpuffer
3. Mikrowellenbehandlung bei 600 Watt in EDTA-Gemisch
4. Wasserbad bei 95°C in Target Retrieval Solution

Tabelle 12: Vorversuche

CD3	CD4/CD8 P	CD4/CD8 K	CD79	MIB1
<i>AK-Konzentration:</i>	<i>AK-Konzentration:</i>	<i>AK-Konzentration:</i>	<i>AK-Konzentration:</i>	<i>AK-Konzentration:</i>
1:500	1:5	1:5	1:10	1:5
1:600	1:10	1:10	1:20	1:10
1:700	1:50	1:50	1:25	1:20
	1:100	1:100	1:50	1:50
	1:500	1:500	1:80	1:80
<i>AK-Einwirkzeit:</i>	<i>AK-Einwirkzeit:</i>	<i>AK-Einwirkzeit:</i>	<i>AK-Einwirkzeit:</i>	<i>AK-Einwirkzeit:</i>
30 min	30 min	30 min	30 min	30 min
40 min	40 min	40 min	40 min	40 min
60 min	60 min	60 min	60 min	60 min
	bei 4°C über Nacht nach 30-60 min			
<i>Vorbehandlung:</i>	<i>Vorbehandlung:</i>	<i>Vorbehandlung:</i>	<i>Vorbehandlung:</i>	<i>Vorbehandlung:</i>
Pronase	Pronase	Pronase		
10 min	10 min	10 min		
12 min	12 min	12 min		
15 min	15 min	15 min		
20 min	20 min	20 min		
MWO 600 W	MWO 600 W	MWO 600 W	MWO 600 W	MWO 600 W
Zitronensäure	Zitronensäure	Zitronensäure	Zitronensäure	Zitronensäure
2 x 5 min	2 x 5 min	2 x 5 min	2 x 5 min	2 x 5 min
2 x 10 min	2 x 10 min	2 x 10 min	2 x 10 min	2 x 10 min
2 x 15 min	2 x 15 min	2 x 15 min	2 x 15 min	2 x 15 min
	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA
	2 x 5 min			
	2 x 10 min			
	2 x 15 min			
			Wasserbad 95°C	Wasserbad 95°C
			Target-Lösung	Target-Lösung
			20 min	20 min
			30 min	30 min
			40 min	40 min
<i>Färbelösung:</i>	<i>Färbelösung:</i>	<i>Färbelösung:</i>	<i>Färbelösung:</i>	<i>Färbelösung:</i>
Fast-Red TR Salz	Fast-Red TR Salz	Fast-Red TR Salz	Fast-Red TR Salz	Fast-Red TR Salz
30 min	30 min	30 min	30 min	30 min
60 min	60 min	60 min	60 min	60 min
Neufuchsin	Neufuchsin	Neufuchsin	Neufuchsin	Neufuchsin
30 min	30 min	30 min	30 min	30 min
60 min	60 min	60 min	60 min	60 min

P: Paraffinschnitt; K: Kryostatschnitt

MWO 600 W: Mikrowellenvorbehandlung bei 600 Watt

min: Minuten

AK: Antikörper

3.2.5.2.5 Färbearbeitung B-SA-Methode

Die Färbung erfolgt zunächst nach der für den CD79 α entwickelten und publizierten Anleitung (Schulden et al., 1998).

1. Entparaffinieren	20 min Xylol 15 min Aceton 15 min Aceton/TBS-Gemisch
---------------------	--

2. Spülen	2 x 10 min TBS, pH 7,5
3. Vorbehandeln	abhängig vom verwendeten Antikörper
4. Spülen	5 min mit TBS

Einlegen der Schnitte in die Coverplates[®] und einsetzen in die Sequenza[™].

5. Spülen	5 min TBS
6. Primärantikörper	30-60 min bei Raumtemperatur
7. Spülen	3 x 5 min TBS
8. Multi-Link	20 min bei Raumtemperatur
9. Spülen	3 x 5 min TBS
10. Label	20 min bei Raumtemperatur
11. Spülen	2 x 5 min

Entfernung der Schnitte aus den Coverplates[®] und fünf Minuten spülen in TBS. Die folgenden Schritte unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen Färbelösungen und werden daher nacheinander beschrieben.

Für Fast-Red TR Salz:

12. Entwickeln	30-60 min mit Fast-Red auf dem Rüttler
13. Spülen	5 min in Leitungswasser
14. Gegenfärben	1 min in Hämalun
15. Bläuen	4-8 min in Leitungswasser (lauwarm)
16. Eindecken	aus aqua dest. mit Kaiser's Glyceringelatine

Für Neufuchsin:

12. Entwickeln	30-60 min in Neufuchsin-Gemisch
13. Spülen	5 min in TBS
14. Gegenfärben	1 min in Hämalaun
15. Bläuen	4-8 min in Leitungswasser (lauwarm)
16. Entwässern	aufsteigende Alkoholreihe
17. Eindecken	aus Xylol mit Corbitbalsam

3.2.5.2.6 Färbeanleitung ABC-Methode

Die Schnitte vorab 30 Minuten im Brutschrank inkubieren.

1. Entparaffinieren	je 3 min in absteigender Äthanolreihe (96%, 80% und 70 %iger Alkohol)
2. Spülen	5 min aqua dest.
3. Vorbehandlung	Zitronensäure bzw. Target-Lösung 20 min Abkühlen lassen
4. Spülen	3 x 5 min aqua dest.
5. Blockierung der endogenen Peroxidase	15 min 1%ige H ₂ O ₂
6. Spülen	10 min TBS, pH 7,2

Einlegen der Schnitte in die feuchte Kammer.

7. Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe	30 min unverdünntes Ziegennormalserum
8. Primärantikörper	12 Stunden bei 4°C
9. Spülen	2 x 5 min TBS, pH 7,2
10. Biotinylierter Antikörper	45 min

11. Spülen	2 x 5 min TBS, pH 7,2
12. ABC-Komplex	30 min
13. Spülen	2 x 5 min TBS, pH 7,2
14. DAB-Färbung	10 min

Entfernen der Schnitte aus der feuchten Kammer.

15. Spülen in fließendem Leitungswasser	10 min
16. Gegenfärben	2 min Hämalan
17. Spülen in fließendem Leitungswasser	10 min
18. Dehydrierung	je 1 min in aufsteigender Äthanolreihe (70%, 80% und 96%)
19. Eindecken	aus Xylol mit Corbitbalsam

3.2.5.2.7 Kontrollen

Bei allen immunhistochemischen Färbungen wird eine Positiv- und eine Negativkontrolle durchgeführt. Dabei muss die Positivkontrolle spezifisch positive Reaktionen aufweisen, während bei der Negativkontrolle keine Immunreaktion auftreten darf.

Bei der Negativkontrolle entfällt die Inkubation mit dem primären Antikörper; die Schnitte werden stattdessen nur mit dem RPMI-Verdünnungspuffer inkubiert. Als Positivkontrollen dienen im Falle der Lymphozyten-Marker unveränderte Lymphknoten von Hunden aus dem Sektionsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin.

Im Falle des MIB1-Antikörpers dient das proliferationsaktive *stratum germinativum* (*stratum basale* + *stratum spinosum*) der untersuchten Hauttumoren sowie Haarbälge als interne Positivkontrolle, wohingegen die nicht-proliferationsaktiven Zellschichten der Haut (*stratum granulosum*, *lucidum*, *corneum*) keine Immunreaktivität zeigen dürfen und somit als interne Negativkontrollen fungieren. Um unspezifische Färbungen auszuschließen, werden aus dem verwendeten Probenmaterial einige zusätzliche Schnitte angefertigt, die als Negativkontrollen bei jedem Färbedurchgang mitlaufen.

Die beschriebenen Kontrollen werden in gleicher Weise sowohl bei den Vorversuchen als auch bei den Hauptversuchen durchgeführt.

3.2.6 Auswertungskriterien

3.2.6.1 HE-Routine-Färbung

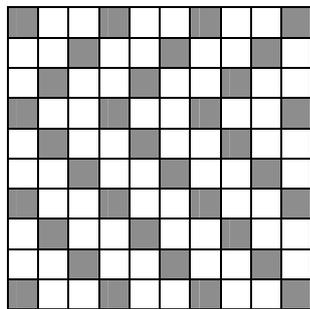
Anhand der HE-Routine-Färbung wird zunächst die Diagnose „Histiozytom“ überprüft. Zusätzlich werden die Tumore in Hinblick auf *Ulzeration* und *Nekrosen* untersucht und nach folgenden Schemata eingeteilt:

<i>Ulzeration:</i>		<i>Nekrosen:</i>	
keine	0	keine	0
<10% der Tumoroberfläche (gering)	1	gering	1
10-30% der Tumoroberfläche (mittel)	2	mittel	2
>30% der Tumoroberfläche (stark)	3	viele	3

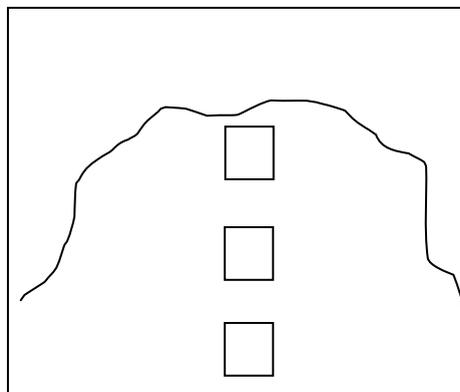
3.2.6.2 Immunhistochemie

3.2.6.2.1 Lymphozytenmarker

In jedem Präparat werden die positiv reagierenden T- bzw. B-Lymphozyten (deutliche rote Färbung) in drei verschiedenen Gesichtsfeldern zu je 34 Kästchen mit Hilfe eines Rasters bei 400facher Vergrößerung gezählt. Dabei stellt sich ein Gesichtsfeld unter Zuhilfenahme eines Rasters ähnlich der folgenden Zeichnung dar. Die grau unterlegten Felder entsprechen dabei den untersuchten Kästchen:



Um der unterschiedlichen Lymphozytenverteilung innerhalb des Gewebes Rechnung zu tragen, werden die Gesichtsfelder senkrecht untereinander (s. Graphik unten) in der Mitte des jeweiligen Präparats ausgewählt (je eines epithelnah, zentral und peripher, d.h. am Übergang der Haut zur Unterhaut). Im Falle stark ulzerierten oder nekrotischen Gewebes wird entweder das gesamte betroffene Gesichtsfeld nach links oder rechts verschoben oder bei kleineren Defekten werden lediglich innerhalb eines Gesichtsfeldes einzelne Kästchen übersprungen.



3.2.6.2.1.1 T-Lymphozyten

Alle Histiocytoome werden mit Hilfe des CD3-Antikörpers angefärbt. Die auf diese Weise markierten T-Lymphozyten werden wie beschrieben gezählt und anhand ihrer Anzahl die Tumore in vier Gruppen eingeteilt:

I	=	≤ 100 Zellen
II	=	$> 100 \leq 300$ Zellen
III	=	$> 300 \leq 550$ Zellen
IV	=	> 550 Zellen

Die Gruppen I-IV stellen dabei die verschiedenen Regressionsstufen dar, d. h. es wird angenommen, dass der Grad der Regression mit steigender Anzahl der T-Zellen zunimmt. Im Gegensatz zu dem Modell von Cockerell und Slauson (Tabelle 3, S. 15) dient dieser Arbeit daher die rein quantitative Auswertung der T-Zell-Population zur Einteilung. Nur in Grenzfällen entscheidet zusätzlich das semiquantitativ beurteilte Verhältnis von Histiocytomzellen zu T-Lymphozyten (s. Anhang S. 112-116) über die Einstufung.

3.2.6.2.1.2 B-Lymphozyten

Zur Beurteilung der B-Zell-Population werden in 60 Fällen die Anzahl und Verteilung der B-Lymphozyten und mögliche Beziehungen zu Nekrosen, Ulzeration und T-Lymphozyten beurteilt. Um den Einfluss sekundärer Entzündungserscheinungen auf die Anzahl der B-Lymphozyten beurteilen zu können, werden dafür jeweils 30 Tumore ohne jegliche Ulzeration und 30 mit starker Ulzeration ausgewählt und mittels des CD79 α -Antikörpers angefärbt.

3.2.6.2.2 MIB1

Es werden jeweils 15 Schnitte aus den Regressionsstufen I-IV – insgesamt 60 Schnitte – ausgewählt und mit Hilfe des MIB1-Antikörpers die proliferationsaktiven Zellen markiert. Bei den Präparaten werden ebenfalls jeweils drei Gesichtfelder nach dem gleichen Schema wie im Falle der Lymphozytenmarker (s. S. 40) ausgewählt und pro Feld 200 Zellen gezählt. Anschließend wird der prozentuale Anteil MIB1-positiver-Zellkerne zur Gesamtzahl der gezähl-

ten Zellen errechnet. Die so ermittelte Zahl wird als Proliferationsindex bezeichnet. Nachfolgend wird untersucht, in wie weit sich die Proliferationsrate auf das Regressionsverhalten der Histiozytome und die Ausbildung von Nekrosen, Ulzeration und Größe auswirkt.

3.2.7 Statistische Methoden¹

Die statistische Auswertung und Darstellung der Untersuchungsergebnisse erfolgt mit Hilfe der Statistikprogramme Microsoft EXCEL 1997 und SPSS 10.0 für Windows.

Beschreibende Statistik:

Abgesehen von quantitativen Merkmalen (T-Zellen, B-Zellen, Proliferationsindex) werden von allen Parametern zunächst die absoluten und relativen Häufigkeiten dargestellt.

Bivariate Statistik / Kreuztabellen und Chi-Quadrat-Test:

Bei nominalen und ordinalskalierten Merkmalen mit wenigen Ausprägungen, wie Lokalisation, Nekrosen, Größe und Ulzeration, werden jeweils zwei Parameter mit Hilfe von Kreuztabellen und einem Chi-Quadrat-Test auf einen möglichen Zusammenhang hin überprüft. Dabei wird ein Chi-Quadrat-Wert (nach Pearson) bei entsprechenden Freiheitsgraden (df) mit der dazugehörigen Irrtums- bzw. Überschreitungswahrscheinlichkeit (asymptotische Signifikanz) dargestellt. Bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $<0,05$ kann die Nullhypothese, der zufolge kein Zusammenhang zwischen den Variablen besteht, zurückgewiesen werden. In den Kreuztabellen werden zusätzlich die Häufigkeit, erwartete Häufigkeit und standardisiertes Residuum angegeben. Die erwartete Häufigkeit stellt dabei diejenige Häufigkeit dar, welche aufgrund der Randhäufigkeiten zu erwarten wäre, wenn kein Zusammenhang zwischen den Variablen bestehen würde. Die Residualhäufigkeiten errechnen sich aus den Differenzen zwischen beobachteten und erwarteten Häufigkeiten je Zelle. Durch Division der Residuen mit der Wurzel aus den erwarteten Häufigkeiten berechnen sich die standardisierten Residuen.

¹Die Grundlagen der hier angewandten statistischen Tests können unter anderem den folgenden Kapiteln des Statistikbuchs „Professionelle Datenanalyse mit SPSS für Windows“, 8. Auflage von Achim Bühl und Peter Zöfel (1996) aus dem Verlag Addison-Wesley entnommen werden.

Kapitel 11: Chi-Quadrat-Test nach Pearson, S. 241

Kapitel 14: Der H-Test von Kruskal und Wallis, S. 299-301; Der Friedman-Test, S. 302-307

Kapitel 15: Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, S. 320

Kapitel 16: Regressionsanalyse, S. 329-393

Dabei wird angenommen, dass ein standardisiertes Residuum (std. Res.) von ± 2 oder größer (in den Tabellen jeweils fett gedruckt dargestellt) eine signifikante Abweichung der beobachteten von der erwarteten Häufigkeit in der jeweiligen Zelle anzeigt. In Tabelle 13 sind die jeweiligen Signifikanzniveaus zu den Residuen-Werten aufgeführt.

Tabelle 13: Standardisierte Residuen und ihre Signifikanzniveaus (Bühl und Zöfel, 1996)

standardisiertes Residuum	Signifikanzniveau
$\geq \pm 2,0$	$p < 0,05$ (signifikant)
$\geq \pm 2,6$	$p < 0,01$ (hoch signifikant)
$\geq \pm 3,3$	$p < 0,001$ (höchst signifikant)

p: Irrtumswahrscheinlichkeit

Nichtparametrische Tests:

Grundsätzlich werden nichtparametrische Tests (verteilungsfreie Tests) eingesetzt, um ordinalskalierte Daten und Ausreißer berücksichtigen zu können, da bei diesen Parametern nicht von normalverteilten Daten ausgegangen werden kann:

1. Der H-Test von Kruskal und Wallis zum Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben; angegeben wird der Median. Der Mann-Whitney-U-Test wenn nur zwei unabhängige Stichproben verglichen werden.
2. Der Friedman-Test zum Vergleich von mehr als zwei abhängigen Stichproben (angegeben werden das 25. und 75. Perzentil und der Median).

Ergebnisse mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ werden bei allen Tests als signifikant eingestuft.

Korrelationen:

Korrelationstests sollen über die Erkenntnis einer signifikanten Beziehung hinaus sowohl die Stärke als auch die Richtung der Beziehung (positiv = gleichläufig; negativ = gegenläufig) beurteilen. Die Stärke des Zusammenhangs zweier Variablen wird mit dem Korrelationskoeffizienten („ r “) angegeben, der Werte zwischen -1 und 1 annehmen kann. Es werden Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Ein solcher Korrelationskoeffizient setzt monotone Zusammenhänge voraus.

Einfache lineare Regressionsanalyse:

Ziel einer Regressionsanalyse ist es, bei Kenntnis des Wertes einer Variablen den zu erwartenden Wert der anderen Variablen zu prognostizieren. Bei einer einfachen linearen Regression wird nur eine unabhängige Variable und ihr Einfluss auf die abhängige Variable betrachtet. Der Regressionskoeffizient („ b “) gibt dabei die Steigung der Regressionsgeraden wieder.

Die Annahmen der linearen Regression (Normalverteilung und Varianzhomogenität der Fehler) werden anhand graphischer Darstellungen der Residuen überprüft. Falls nötig werden die Daten der einfließenden Variablen transformiert (Symmetrisierung). Regressionsanalysen werden entsprechend nur von annähernd symmetrisch verteilten Daten dargestellt.

Graphiken:

Die graphische Darstellung erfolgt überwiegend mittels Balkendiagrammen und Boxplots. Bei den Boxplots entspricht die Boxlänge dem Interquartilbereich, der sich vom 25. bis 75. Perzentil erstreckt. Das 25. Perzentil ist der Wert, unter dem 25% der beobachteten Fälle und über dem 75% der beobachteten Fälle liegen. Das 75. Perzentil verhält sich entsprechend umgekehrt. Der Medianwert ist als Querbalken innerhalb der Box dargestellt. Ausreißer (Werte, die zwischen 1,5 und 3 Boxlängen von den Boxrändern entfernt liegen) werden als Kreis und Extremwerte (Fälle, die mehr als 3 Boxlängen entfernt liegen) als Sternchen markiert. Zur Darstellung korrelativer Zusammenhänge werden Streudiagramme verwendet. Jedes Wertepaar wird dabei durch einen Punkt dargestellt.

Signifikanzangaben sind nicht im Sinne einer schließenden Statistik zu interpretieren, sondern sollen lediglich Unterschiede im Sinne der explorativen Datenanalyse aufspüren.