

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Material

Bei den 194 untersuchten formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Präparaten kann in drei Fällen nicht die eindeutige Diagnose „Histiozytom“ gestellt werden. Deshalb werden in dieser Arbeit nur die verbleibenden 191 Tumore berücksichtigt. Aus den Vorberichtsbögen werden zunächst die Angaben über Geschlecht, Rasse, Alter und Lokalisation ausgewertet und die Häufigkeiten der jeweiligen Merkmale dargestellt. Detaillierte Angaben zu jedem Tumor können dem Anhang entnommen werden (S. 103-107).

### 4.2 Geschlechts-, Rassen-, Altersverteilung und Lokalisation

#### 4.2.1 Geschlechtsverteilung

111 (58,1%) der 191 untersuchten Tumore stammen von männlichen Tieren, 77 (40,3%) von weiblichen und bei drei (1,6%) der Fälle fehlen Angaben über das Geschlecht. Jeweils ein männliches und ein weibliches Tier werden in den Vorberichtsbögen als kastriert aufgeführt. Die beiden Fälle werden im Weiteren nicht gesondert betrachtet.

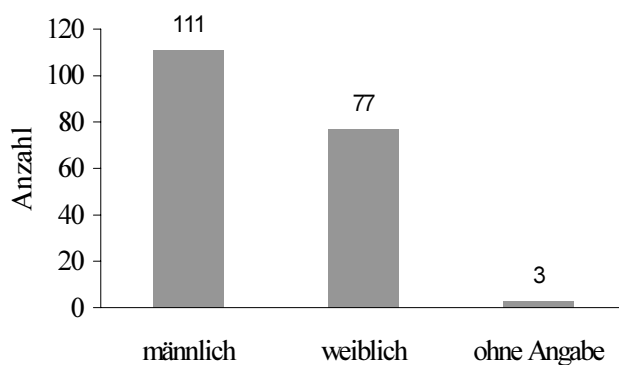


Abb. 1: Geschlechtsverteilung

## 4.2.2 Rassenverteilung

Tabelle 14: Rassenverteilung

Rasse	n	Davon	%
Mix (Mischling)	39	18 ohne nähere Angabe 4 DSH-Mix 2 Bullterrier-Mix 2 Labrador-Mix 2 Terrier-Mix 2 Pitbull-Mix 2 Rottweiler-Mix 2 Boxer-Mix 1 Münsterländer-Mix 1 Beagle-Mix 1 Kuvazs-Mix 1 Staff-Mix 1 Bullmastiff-Mix	<b>20,4</b>
Terrier	38	8 West-Highland-White-Terrier 7 American Stafford 6 Pitbull 4 Staff. Terrier 3 Bullterrier 2 Scotch Terrier 1 Airdale Terrier 1 Border Terrier 1 Cairn Terrier 1 Fox Terrier 1 Jack Russel Terrier 1 Russisch Terrier 1 Tibet Terrier 1 Welsh Terrier	<b>19,9</b>
Boxer	15		<b>7,9</b>
Cocker	11		<b>5,8</b>
Rottweiler	10		<b>5,2</b>
Retriever	8	6 Golden Retriever 2 Flat Coated Retriever	<b>4,2</b>
Dobermann	7		<b>3,7</b>
Berner Sennenhund	6		<b>3,1</b>
Dogge	5		<b>2,6</b>
Labrador	5		<b>2,6</b>
Schnauzer	5	3 Riesenschnauzer 2 Zwergschnauzer	<b>2,6</b>
Teckel	4		<b>2,1</b>
Dalmatiner	3		<b>1,6</b>
DSH	3		<b>1,6</b>
Hovawart	3		<b>1,6</b>
Bulldogge	2		<b>1</b>
Husky	2		<b>1</b>
Sheltie	2		<b>1</b>
Weimaraner	2		<b>1</b>
Borboel, Border Collie, Briard, English Spaniel, Eurasier, Irish Setter, Irish Wolfshund, Kl. Münsterländer, Kromforländer, Liberiaaner, Malinois, Mastino Neapolitano, Molosser, Saluki, Schotte, Whippet	je 1	(16 Rassen)	<b>je 0,5 (8)</b>
Ohne Angabe	5		<b>2,6</b>
	$\sum_n = 191$		<b>99,5</b>

Die Prozentangaben werden auf die erste Stelle hinter dem Komma gerundet angegeben.

Von den 191 untersuchten Histiocyten aus dem Sektionsgut der Jahre 1997-1999 stammen 39 (20,4%) Proben von Mischlingen, von denen bei 18 Tieren keine Angaben über einen Elternteil gemacht werden. Die zweit häufigste Gruppe bilden mit 38 Fällen (19,9%) die Terrier, die sich aus 14 verschiedenen Rassen (Tabelle 14, S. 46) zusammensetzen. Die dritthäufigste Rasse bilden die Boxer mit 15 (7,9%) Einsendungen, gefolgt vom Cocker mit elf (5,8%) und Rottweiler mit zehn (5,2%). Der Retriever ist mit acht (4,2%), der Dobermann mit sieben (3,7%) und der Berner Sennenhund mit sechs (3,1%) Fällen vertreten. Weitere 25 Rassen kommen zwischen fünf (2,6%) bis einmal (0,5%) innerhalb des untersuchten Sektionsgutes vor. In fünf (2,6%) Fällen gibt es keine Angaben über die Rassenzugehörigkeit

### 4.2.3 Altersverteilung

In die Untersuchungen werden nur Histiocyten von Hunden einbezogen, die zum Zeitpunkt der Tumorentnahme nicht älter als zwei Jahre alt waren. Innerhalb dieser Gruppe sind 16% (30 Hunde) unter 0,5 Jahren und 41% (80 Hunde) über 0,5 und bis zu einem Jahr alt. In weiteren 16% (30 Hunde) der Fälle sind die Hunde zwischen einem und 1,5 Jahren und bei 27% (51 Hunde) im Alter zwischen 1,5 und 2 Jahren.

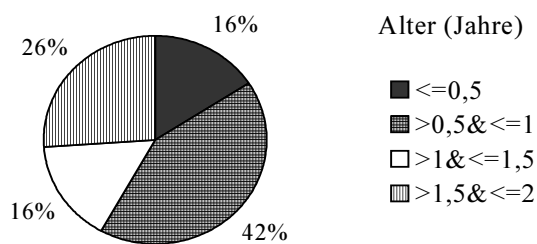


Abb. 2: Altersverteilung

### 4.2.4 Lokalisation der Tumore

Soweit aus den Vorberichten ersichtlich, wird die Lokalisation der Tumore zur besseren Übersichtlichkeit und Auswertbarkeit bestimmten Tumorregionen zugeordnet (Tabelle 10, S. 28). Dabei stammen 65 (34,0%) der untersuchten 191 Proben von Kopf und Hals (56 am

Kopf; neun am Hals), 63 (33,0%) finden sich an den Gliedmaßen, gefolgt von 24 am Rumpf (davon 18 am Rücken und sechs am Bauch) und 23 (12,0%) an den Pfoten. Von der Rute stammen mit drei (1,6%) dagegen die wenigsten Proben. In 13 (7%) Fällen sind keine Angaben über die Lokalisation des Tumors vorhanden (s. Abb. 3).

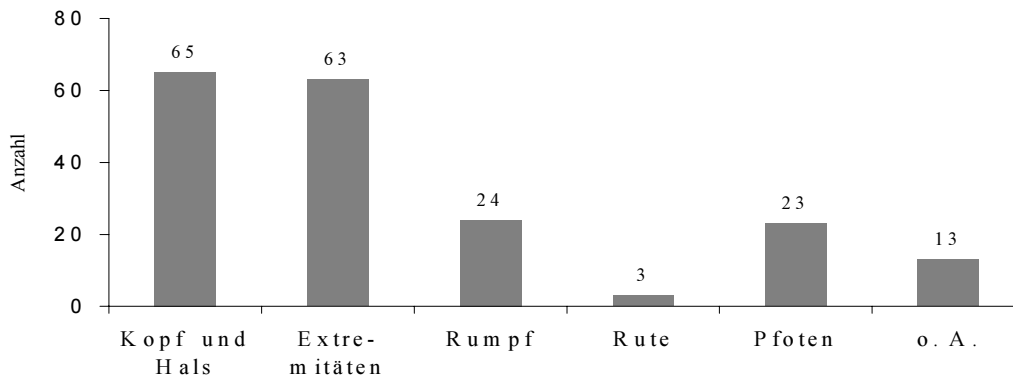


Abb. 3: Lokalisation

### 4.3 Größe der Tumore

Die Größe der Tumore werden anhand des Erscheinungsbildes in den Paraffinblöcken (Tabelle 11, S 29) eingeteilt. Tumore der Größe 2 (1-2 cm<sup>2</sup>) kommen am häufigsten im Untersuchungsgut vor, gefolgt von bis zu 1 cm<sup>2</sup> großen Präparaten (Größe 1). Tumore, die größer als 2 cm<sup>2</sup> (Größe 3) sind, finden sich dagegen im Untersuchungsgut seltener.

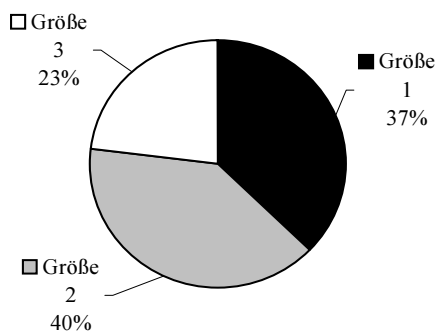


Abb. 4: Relative Häufigkeiten der Größen 1-3 (n=191)

Tabelle 15: Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Tumorgößen zu Abb. 4

Größe	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
bis 1cm <sup>2</sup>	71	37,2	37,2
1-2cm <sup>2</sup>	76	39,8	77,0
> 2cm <sup>2</sup>	44	23,0	100,0
Gesamt	191	100,0	

### 4.3.1 Größe der Tumore im Verhältnis zur Lokalisation

Über die Hälfte (53,5% / 38) der Tumore der Größe 1 finden sich am Kopf. Der überwiegende Teil (46,1% / 35) der mittelgroßen Einsendungen (Größe 2) sowie ein Großteil (43,2% / 19) der über 2 cm<sup>2</sup> messenden Präparate (Größe 3) ist an den Extremitäten entfernt worden.

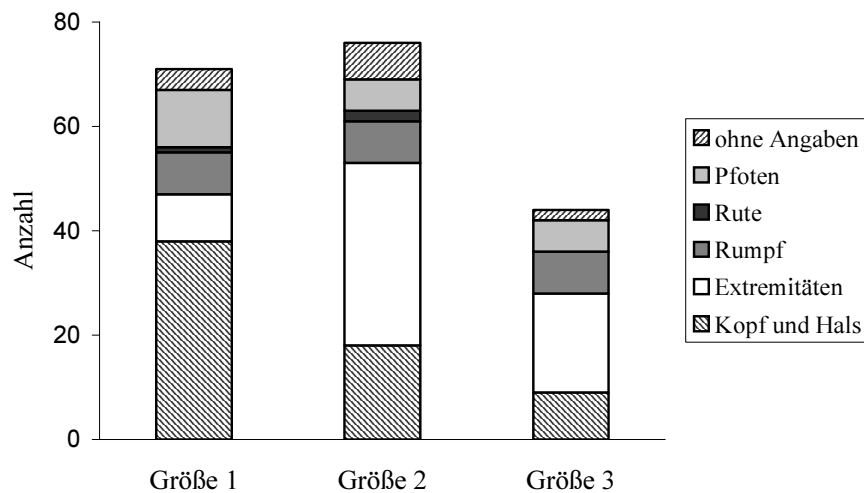


Abb. 5: Anzahl der Tumore aufgeteilt nach Lokalisationen innerhalb der drei Größen

Die statistische Überprüfung zeigt, dass eine Unabhängigkeit der beiden Merkmale - Größe und Lokalisation - sehr unwahrscheinlich ist ( $\chi^2_{10} = 32,6$ ;  $p < 0,001$ ). In Tabelle 16 (S. 50) wird deutlich, dass sich von den bis zu 1cm<sup>2</sup> großen Tumoren auffällig mehr als erwartet an Kopf und Hals finden (std. Res.: **2,8**;  $p < 0,01$ ) und auffällig weniger als erwartet (std. Res.: **-3,0**;  $p < 0,01$ ) im Bereich der Extremitäten. Die unerwartet hohe Anzahl mittelgroßer Tumore an den Extremitäten deutet ebenfalls (std. Res.: **2,0**;  $p < 0,05$ ) auf eine signifikante Beziehung zwischen den beiden Variablen in diesem Bereich hin.

Tabelle 16: Kreuztabelle Lokalisation / Größe

			Größe			Gesamt
			bis 1cm <sup>2</sup>	1-2cm <sup>2</sup>	>2cm <sup>2</sup>	
Lokalisation	Kopf und Hals	Anzahl	38	18	9	65
		Erwartete Anzahl	24,2	25,9	15,0	65,0
		% von Größe	53,5%	23,7%	20,5%	34%
		Std. Residuen	<b>2,8</b>	-1,5	-1,5	
Rumpf	Rumpf	Anzahl	8	8	8	24
		Erwartete Anzahl	8,9	9,5	5,5	24,0
		% von Größe	11,3%	10,5%	18,2%	12,6%
		Std. Residuen	-,3	-,5	1,1	
Extremitäten	Extremitäten	Anzahl	9	35	19	63
		Erwartete Anzahl	23,4	25,1	14,5	63,0
		% von Größe	12,7%	46,1%	43,2%	33,0%
		Std. Residuen	<b>-3,0</b>	<b>2,0</b>	1,2	
Rute	Rute	Anzahl	1	2	0	3
		Erwartete Anzahl	1,1	1,2	,7	3,0
		% von Größe	1,4%	2,6%	0,0%	1,6%
		Std. Residuen	-,1	,7	-,8	
Ohne Angaben	Ohne Angaben	Anzahl	4	7	2	13
		Erwartete Anzahl	4,8	5,2	3,0	13,0
		% von Größe	5,6%	9,2%	4,5%	6,8%
		Std. Residuen	-,4	,8	-,6	
Pfoten	Pfoten	Anzahl	11	6	6	23
		Erwartete Anzahl	8,5	9,2	5,3	23,0
		% von Größe	15,5%	7,9%	13,6%	12,0%
		Std. Residuen	,8	-1,0	,3	
Gesamt	Anzahl	71	76	44	191	

Fett gedruckt: Einen signifikanten Zusammenhang anzeigende Residuenwerte; Signifikanzniveaus s. Tabelle 13, S. 43

## 4.4 HE-Routinefärbung

### 4.4.1 Diagnosestellung

In 191 der 194 untersuchten Fälle können die Tumore - aufgrund ihres histologischen Bildes in den HE-gefärbten-Schnitten - eindeutig als Histiocytom diagnostiziert werden. In den übrigen drei Fällen ist diese eindeutige Diagnose entweder aufgrund mangelhaften Probenmaterials nicht möglich oder es herrscht eine so erhebliche Entzündungsreaktion vor, dass keine eindeutige Unterscheidung zwischen einer massiven Entzündung und einer proliferativen Gewebeeränderung getroffen werden kann. Neben der Feststellung der Diagnose werden anhand der HE-Schnitte auch der Grad der Ulzeration und die Menge von Nekrosen im Gewebe beurteilt. Die Diagnosen und Daten der untersuchten Parameter können dem Anhang entnommen werden (S. 107-111). In den dort angegebenen Tabellen sind die 191 untersuchten Histiocyto- tome sortiert nach ihren Einsendungsnummern aufgeführt. Sie enthalten Daten aus den Ein-

sendungsbögen (Alter, Geschlecht und Lokalisation), gegebenenfalls Angaben über die Größe der untersuchten Tumore und die Auswertung der HE-Färbung (Nekrosen, Ulzeration).

#### 4.4.2 Beurteilung der Ulzeration

Die Beurteilung der ulzerativen Veränderungen der einzelnen Tumore erfolgt nach dem auf S. 39 beschriebenen Schema. Im Untersuchungsgut weist eine überwiegende Anzahl der Histiocytozome eine starke Ulzeration auf, gefolgt von weniger als halb so vielen Fällen ohne ulzerative Veränderungen.

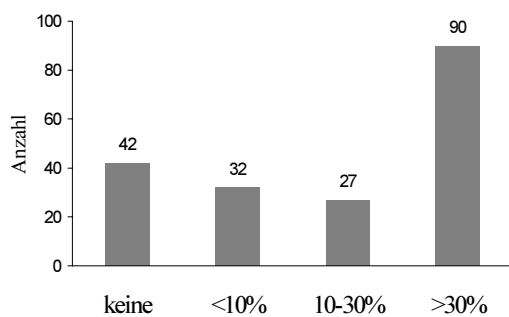


Abb. 6: Anzahl der Tumore innerhalb der einzelnen Ulzerationsstufen (n=191)

Tabelle 17: Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Ulzerationsstufen zu Abb. 6

Ulzeration	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozenze
keine	42	22,0	22,0
<10% (gering)	32	16,8	38,7
10-30% (mittel)	27	14,1	52,9
>30% (stark)	90	47,1	100,0
Gesamt	191	100,0	

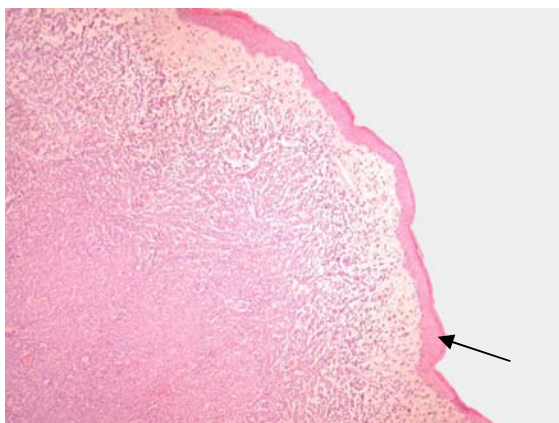


Bild 1: Epithel (s. Pfeil) eines Histiocytozoms ohne ulzerative Veränderungen (E-Nr.: 463/99); Hämatoxylin-Eosin; 100fache Vergrößerung

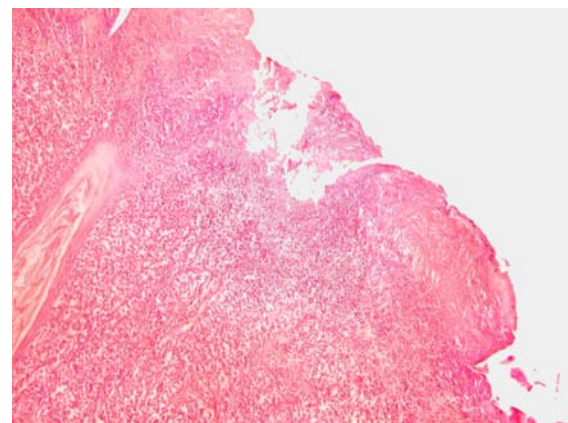


Bild 2: Histiocytozom mit stark ulzeriertem Epithel (E-Nr.: 40/99); Hämatoxylin-Eosin; 100fache Vergrößerung

#### 4.4.2.1 Beurteilung der Ulzeration im Verhältnis zur Größe der Tumore

Von den insgesamt 42 Proben ohne Ulzeration stammen 31 (43,7%) von bis zu 1cm<sup>2</sup> großen Einsendungen. Weitere 18 (25,4%) Tumore dieser Größe besitzen eine geringe, sechs (8,5%) eine mittlere und 16 (22,5%) eine starke oberflächliche Ulzeration. Bei den 1-2cm<sup>2</sup> großen Histiocyten überwiegt mit 43 Fällen (56,6%) eine starke Ulzeration, gefolgt von einer mittleren bei 15 Tumoren (19,7%), einer geringen in zehn Fällen (13,2%) und bei acht (10,5%) konnte keine Ulzeration festgestellt werden. Neoplasien der Größe 3 (> 2cm<sup>2</sup>) sind ebenfalls mit 31 Fällen (70,5%) zum überwiegenden Teil stark ulzeriert. Bei sechs Tumoren (13,6%) findet sich eine mittlere, bei vier (9,1%) eine geringe und in drei Fällen (6,8%) keine Ulzeration.

Tabelle 18: Kreuztabelle Ulzeration / Größe

			bis 1cm <sup>2</sup>	Größe 1-2cm <sup>2</sup>	>2cm <sup>2</sup>	Gesamt
Ulzeration	keine	Anzahl	31	8	3	42
		Erwartete Anzahl	15,6	16,7	9,7	
		% von Größe	43,7%	10,5%	6,8%	22,0%
		Std. Residuen	<b>3,9</b>	<b>-2,1</b>	<b>-2,1</b>	
	<10%	Anzahl	18	10	4	32
		Erwartete Anzahl	11,9	12,7	7,4	
		% von Größe	25,4%	13,2%	9,1%	16,8%
		Std. Residuen	1,8	-,8	-1,2	
	10-30%	Anzahl	6	15	6	27
		Erwartete Anzahl	10,0	10,7	6,2	
		% von Größe	8,5%	19,7%	13,6%	14,1%
		Std. Residuen	-1,3	1,3	-,1	
	>30%	Anzahl	16	43	31	90
		Erwartete Anzahl	33,5	35,8	20,7	
		% von Größe	22,5%	56,6%	70,5%	47,1%
		Std. Residuen	<b>-3,0</b>	1,2	<b>2,3</b>	
Gesamt		Anzahl	71	76	44	191

Fett gedruckt: Einen signifikanten Zusammenhang anzeigende Residuenwerte; Signifikanzniveaus s. Tabelle 13, S. 43

Die Nullhypothese, der zufolge kein Zusammenhang zwischen der Größe der Tumore und dem Grad der Ulzeration besteht, kann zurückgewiesen werden ( $\chi^2 = 48,5$ ;  $p < 0,001$ ). Die in der Tabelle 18 ausgewiesenen Daten zeigen, dass insbesondere kleine Tumore (bis 1cm<sup>2</sup>) signifikant häufiger als erwartet (31 zu 15,6) keine Ulzeration aufweisen und signifikant seltener als erwartet (16 zu 33,5) eine über 30%ige Ulzeration des Epithels zeigen. Bei den mittleren (1-2cm<sup>2</sup>) und großen (> 2cm<sup>2</sup>) Tumoren ist dagegen seltener als erwartet (8 zu 16,7 und 3 zu



9,7) keine Ulzeration zu finden und bei den  $> 2\text{cm}^2$  großen tritt zusätzlich häufiger als erwartet (31 zu 20,7) eine sehr starke Ulzeration auf.

Mit zunehmender Größe steigt der Grad der Ulzeration (Rangkorrelation nach Spearman:  $r = 0,457$ ;  $p < 0,001$ ).

#### 4.4.2.2 Ulzeration und Lokalisation

Bei der statistischen Überprüfung des Verhältnisses zwischen der Lokalisation der Tumore und ulzerativen Veränderungen des Epithels deutet sich kein direkter Zusammenhang zwischen diesen Variablen an ( $\chi^2_{15} = 7,41$ ;  $p = 0,592$ ).

#### 4.4.3 Nekrosen im untersuchten Gewebe

Anhand des auf S. 39 beschriebenen Schemas werden die nekrotischen Veränderungen im Gewebe der einzelnen Tumore vier verschiedenen Nekrosegraden zugeordnet. Mit 33,0% weisen die meisten Tumore nur eine geringe und mit 25,7% am zweithäufigsten eine mittlere Nekroseanzahl auf. 23% der untersuchten Fälle zeigen keine und 18,3% viele Nekrosen.

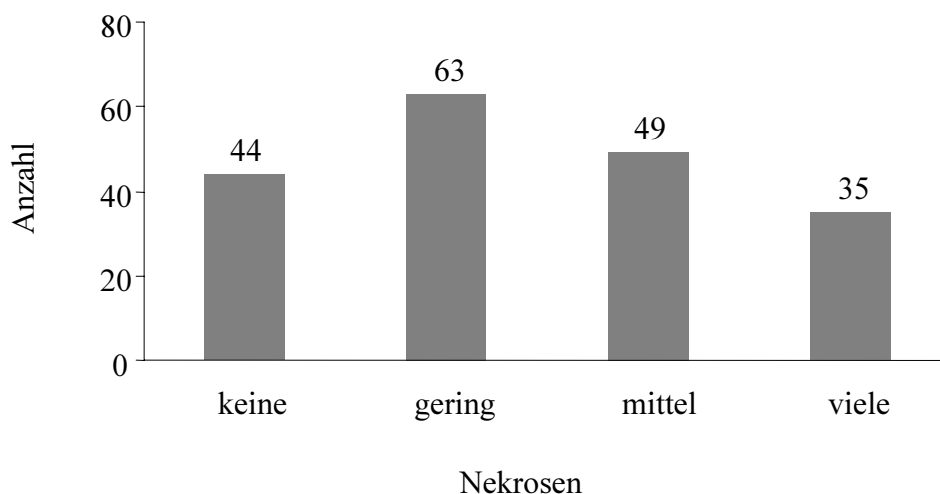


Abb. 7: Anzahl der Tumore innerhalb der einzelnen Nekrosegrade (n=191)

#### 4.4.3.1 Verhältnis von Anzahl der Nekrosen und Größe der Tumore

Bei der Untersuchung des Nekrosegrades im Verhältnis zur Größe der Tumore zeigt sich ein Zusammenhang zwischen diesen Merkmalen ( $\chi^2_6=17,6$ ;  $p < 0,007$ ). Auffällig ist vor allem eine unerwartet hohe Anzahl von bis zu  $1\text{cm}^2$  großen Einsendungen *ohne* Nekrosen. Das standardisierte Residuum von **2,6** in diesem Bereich ist mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$  hoch signifikant (Tabelle 19). Mit zunehmender Größe steigt auch die Anzahl der Nekrosen leicht an (Rangkorrelation nach Spearman:  $r = 0,25$ ;  $p < 0,001$ ).

Tabelle 19: Kreuztabelle Nekrosen / Größe

			Größe			Gesamt
			bis $1\text{cm}^2$	$1-2\text{cm}^2$	$> 2\text{cm}^2$	
Nekrosen	keine	Anzahl	27	11	6	44
		Erwartete Anzahl	16,4	17,5	10,1	
		Std. Residuen	<b>2,6</b>	-1,6	-1,3	
	gering	Anzahl	23	27	13	63
		Erwartete Anzahl	23,4	25,1	14,5	
		Std. Residuen	-,1	,4	-,4	
	mittel	Anzahl	12	21	16	49
		Erwartete Anzahl	18,2	19,5	11,3	
		Std. Residuen	-1,5	,3	1,4	
	viele	Anzahl	9	17	9	35
		Erwartete Anzahl	13,0	13,9	8,1	
		Std. Residuen	-1,1	,8	,3	
Gesamt		Anzahl	71	76	44	191

Fett gedruckt: Einen signifikanten Zusammenhang anzeigende Residuenwerte; Signifikanzniveaus s. Tabelle 13, S.43

#### 4.4.3.2 Nekrosen und Ulzeration

Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Nekrosen und dem Grad der Ulzeration ( $\chi^2_6 = 20,13$ ;  $p > 0,05$ ).

## 4.5 Immunhistochemie

### 4.5.1 Vorversuche

#### 4.5.1.1 Modifikation der B-SA-Färbeanleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wird auf Grundlage der Vorversuche (s. Tabelle 12, S. 35) und unter Berücksichtigung der beobachteten Fehlerquellen (S. 58) eine modifizierte B-SA-Färbeanleitung entwickelt. In Tabelle 20 werden die wesentlichen Färbeschritte aufgelistet.

Tabelle 20: Modifikation der B-SA-Färbeanleitung

Die Schnitte vor der Färbung 30 min im Brutschrank bei 60°C inkubieren, um einem Abschwimmen der Präparate vorzubeugen	
1. Entparaffinieren	15 min Xylol 10 min Aceton 10 min Aceton / TBS-Gemisch
2. Spülen	5 min TBS
3. Vorbehandlung	30-40 min in Target-Lösung im Wasserbad bei 95°C 20 min Abkühlen in der Target-Lösung
4. Spülen	3 x 5 min TBS (in jeweils neuen Küvetten)
Einlegen der Schnitte in die Coverplates® und einsetzen in die Sequenza™	
5. Spülen	5 min TBS
6. Primärantikörper	30-60 min bei Raumtemperatur inkubieren anschließend über Nacht bei 4°C im Kühlschrank
7. Spülen	2 x 5 min TBS
8. Multi-Link	20 min bei Raumtemperatur
9. Spülen	2 x 5 min TBS
10. Label	20 min
11. Spülen	5 min TBS
Entfernung der Schnitte aus den Coverplates® und 5 Minuten spülen in TBS. Die weiteren Schritte für die Färbelösungen „Fast-RED TR Salz“ und „Neufuchsin“ erfolgen entsprechend den Angaben der B-SA-Färbeanleitung (s. 3.2.5.2.5, S. 36-37).	

#### **4.5.1.2 CD4 und CD8**

Die Antikörper CD4 und CD8 zeigen am Paraffinschnitt bei allen angewandten Verdünnungen und Vorbehandlungen negative Färbeergebnisse. Es ergibt sich weder eine spezifische Anfärbung der fraglichen Lymphozytensubpopulationen noch eine unspezifische Hintergrundfärbung. Beide waren bislang nicht am Paraffinschnitt einsetzbar und werden im Rahmen dieser Arbeit nochmals mit der neueren B-SA-Färbemethode in Verbindung mit neuen Vorbehandlungen (EDTA, Target-Lösung) getestet. Der Antigennachweis mittels dieser Antikörper führt jedoch auch mit diesen neueren Methoden nicht zu auswertbaren Ergebnissen. Bei den Kontrollen am Gefrierschnitt können dagegen nach Vorbehandlung - in Zitratlösung bei einer Antikörper-Konzentration von 1:10 und in EDTA bei einer Antikörper-Konzentration von 1:50 - sowie einer jeweiligen Einwirkzeit von 60 Minuten optimale Färbeergebnisse erzielt werden. Da im Rahmen dieser Arbeit nur in Paraffin eingebettetes Material verwendet wird, kann eine Darstellung dieser Antikörper nicht erfolgen.

#### **4.5.1.3 CD3**

Der Antikörper zeigt bei einer Verdünnung von 1:500 bei allen angewandten Vorbehandlungen eine deutlich positive Markierung der T-Lymphozyten. Da sich die Pronase-Vorverdauung als gewebeschonendste Methode erweist, wird diese zur Darstellung des CD3-Antigens in den Hauptversuchen eingesetzt.

#### **4.5.1.4 CD79 $\alpha$**

Der in dieser Arbeit zur Darstellung der B-Lymphozyten eingesetzte Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD79 $\alpha$  erweist sich bei der in der Vergangenheit etablierten Färbemethode von Schulden et al. (1998) in allen untersuchten Verdünnungsstufen als äußerst unzuverlässig und damit untauglich. Neben Histiocyten werden dabei auch Gewebeproben anderer Tumorarten getestet. Aber auch bei diesen Versuchen können keine zuverlässig reproduzierbaren Ergebnisse am Paraffinschnitt erbracht werden.

Im Weiteren wird daher zunächst die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (s. Punkt 3.2.5.2.6, S.37) ausgetestet. Diese kann jedoch auch nur bei einem Teil der Färbungen eine positive Markierung der B-Zellen erzielen.

Erst die neu getestete Demaskierung der Oberflächenantigene mittels Target-Retrieval-Lösung im Wasserbad bei 95°C in der entsprechend modifizierten B-SA-Färbung (s. Tabelle 20, S. 55) macht eine regelmäßige, spezifisch positive Zellmarkierung und somit vergleichbare und quantitativ auswertbare Ergebnisse möglich. Neben der besseren Antigenerkennung ist die Vorbehandlung im Wasserbad gegenüber der Mikrowellenvorbehandlung zusätzlich wesentlich schonender – die Schnitte schwimmen seltener ab und das Gewebe bleibt besser erhalten. Eine Antikörper-Einwirkzeit von 40 Minuten bei Raumtemperatur mit anschließender Inkubation über Nacht bei 4°C und einer Antikörper-Konzentration von 1:50 erweist sich als ideal zur deutlichen Anfärbung der B-Lymphozyten. Durch die auf diese Weise erlangte hohe Sensitivität ist jedoch auch häufiger eine unspezifische Färbung zu beobachten. Diese betrifft allerdings das Drüsengewebe, Haarbälge und das *stratum korneum* der Haut und ist somit gut von den zu untersuchenden B-Lymphozyten abzugrenzen.

#### **4.5.1.5 MIB1**

Auch der MIB1 erweist sich am Paraffinschnitt als sehr unzuverlässiger Marker. Die Andauung in Pronase erbringt in den Vorversuchen bei keiner Verdünnungsstufe positive Ergebnisse. Bei der Vorbehandlung in der Mikrowelle reagiert der Antikörper sensitiver in der EDTA- als in der Zitrat-Lösung, d.h. die proliferationsaktiven Zellen lassen sich bei gleicher Antikörper-Verdünnung (1:50) besser darstellen. In beiden Fällen kommt es jedoch zum Teil zu erheblicher Hintergrundfärbung oder die Färbungen misslingen gänzlich. Nachfolgend wird auch hier die Vorbehandlung in der Target-Lösung im Wasserbad ausgetestet. Bei einer Antikörper-Konzentration von 1:80, 40minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit anschließender Aufbewahrung bei 4°C über Nacht können deutlich positive Ergebnisse ohne starke Hintergrundfärbung verzeichnet werden. Auch in diesem Fall ist das Gewebe wesentlich besser erhalten und zu beurteilen als nach der von Jösten (1995) favorisierten Vorbehandlung in der Mikrowelle.

#### 4.5.1.6 Färbelösungen

Die beiden verwendeten Färbelösungen Neufuchsin und Fast-Red TR Salz sind grundsätzlich beide in der Lage, die Antikörper-markierten-Zellen sichtbar zu machen. Der Vorteil von Neufuchsin liegt vor allem in der anschließenden Eindeckung in Xylol. Im Gegensatz zur beim Fast-Red verwendeten Glyceringelatine, lässt sich Xylol gleichmäßiger ohne Bildung von Luftblasen auftragen und zur dauerhaften Eindeckung der Präparate verwenden. Die Glyceringelatine eignet sich dagegen wenig für Material, das über einen langen Zeitraum gelagert werden soll, und die leichte Bildung von Luftblasen erschwert das Eindecken zusätzlich. Neben den Schwierigkeiten des Eindeckens erweist sich Fast-Red jedoch als wesentlich leuchtenderer Farbstoff, was vor allem bei einer quantitativen Auswertung erhebliche Vorteile bringt. Daher wird für die Hauptversuche Fast-Red TR Salz als Färbelösung trotz der erwähnten Schwächen dem Neufuchsin vorgezogen.

#### 4.5.1.7 Fehlerquellen

Anhand der zahlreichen Vorversuche wurden einige Problembereiche deutlich, ohne deren Beachtung die Färbungen misslangen:

1. Die Schnitte sollten vor der Färbung 30 Minuten bei 60°C im Wärmeschrank inkubieren, um eine stärkere Anheftung zu erzielen und die Gefahr des Abschwimmens der Präparate während der Färbung zu minimieren.
2. Das Verdünnungsmedium RPMI (s. S. 32) muss vor der Anwendung auf Raumtemperatur erwärmt werden. Erst im Anschluss wird der pH-Wert auf 7,4-7,6 eingestellt und der Antikörper hinzugegeben, da sich der pH-Wert beim Erwärmen wieder verändert. Ebenso müssen die Substrate der B-SA-Methode (Super Sensitive Multi Link / Super Sensitive Label) vor ihrer Verarbeitung erst Raumtemperatur erlangen.
3. Nach der Antikörper-Inkubation bei 4°C über Nacht im Kühlschrank ist unbedingt auf die Bildung von Luftblasen zu achten. In den meisten Fällen müssen die Schnitte neu in die Sequenzer eingesetzt werden.
4. Nach Vorbehandlung im Wasserbad in Target-Lösung müssen die Schnitte wenigstens dreimal mit frischer TBS gespült werden, da die Target-Lösung eine seifige Beschaffenheit besitzt und ohne mehrmaliges Spülen nachfolgende Substanzen von den Präparaten abperlen.

## 4.5.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Hauptversuche

### 4.5.2.1 Auswertung CD3

#### 4.5.2.1.1 Verteilung der T-Lymphozyten im Gewebe

Die Anzahl der T-Zellen nimmt kontinuierlich von der Peripherie der Tumore zum Epithel hin ab. Wie in Tabelle 21 (S. 60) beschrieben, finden sich peripher im Median 201 T-Lymphozyten, gefolgt von 131 zentral und mit 59 deutlich weniger epithelnah. Die Nullhypothese, dass sich die T-Zellen gleichmäßig im Gewebe verteilen, erscheint somit fragwürdig. Die statistische Überprüfung (Friedman-Test:  $\chi_2^2 = 272,3$ ;  $p < 0,001$ ) bestätigt, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Zusammenhang zwischen der T-Zell-Anzahl und der Tumorregion besteht.

Die graphische Darstellung mittels Boxplots in Abb. 8 verdeutlicht das Verteilungsmuster der T-Zellen von der Peripherie zum Epithel.

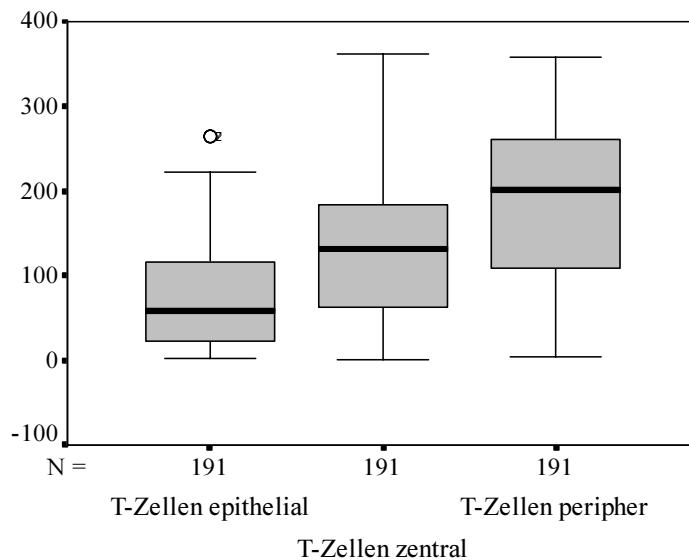


Abb. 8: Verteilung der T-Zellen im Gewebe

Tabelle 21: Verteilung der T-Zellen im Gewebe; angegeben als 25. und 75. Perzentil und Median

	Anzahl	Perzentile		
		25th	50th (Median)	75th
T-Lymphozyten epithelnah	191	23,00	59,00	117,00
T-Lymphozyten zentral	191	63,00	131,00	184,00
T-Lymphozyten peripher	191	108,00	201,00	261,00

#### 4.5.2.1.2 Verteilung der Regressionsstufen

Die Häufigkeiten der einzelnen Regressionsstufen werden in Tabelle 22 dargestellt. Die untersuchten Histiocytoeme zeigen am seltensten eine minimale bis abwesende Regression (Stufe I), gefolgt von Einsendungen mit mäßiger (Stufe II) Regression. Am zweithäufigsten stellen die T-Lymphozyten die überwiegende Zellpopulation dar (Stufe IV) und am häufigsten treten Tumore mit einer deutlichen Regression (Stufe III) auf.

Tabelle 22: Häufigkeiten der einzelnen Regressionsstufen

Regression	Häufigkeit	Prozent
I	29	15,2
II	41	21,5
III	65	34,0
IV	56	29,3
Gesamt	191	100,0

#### 4.5.2.1.3 Regressionsstufen und Nekrosen

Es läßt sich ein genereller Zusammenhang zwischen dem Grad der Regression und dem Auftreten von Nekrosen feststellen ( $\chi^2 = 63,8$ ;  $p < 0,001$ ) und die Tabelle 23 (S. 61) verdeutlicht, in welchen Bereichen diese Beziehungen vor allem zu beobachten sind.



Tabelle 23: Kreuztabelle Regressionsstufe / Nekrosen

			keine	Nekrosen gering	mittel	viele	Gesamt
Regressionsstufe	I	Anzahl	20	6	3	0	29
		Erwartete Anzahl	6,7	9,6	7,4	5,3	29,0
		Std. Residuen	<b>5,2</b>	-1,2	-1,6	<b>-2,3</b>	
	II	Anzahl	8	20	12	1	41
		Erwartete Anzahl	9,4	13,5	10,5	7,5	41,0
		Std. Residuen	-,5	1,8	,5	<b>-2,4</b>	
	III	Anzahl	10	25	16	14	65
		Erwartete Anzahl	15,0	21,4	16,7	11,9	65,0
		Std. Residuen	-1,3	,8	-,2	,6	
	IV	Anzahl	6	12	18	20	56
		Erwartete Anzahl	12,9	18,5	14,4	10,3	56,0
		Std. Residuen	-1,9	-1,5	1,0	<b>3,0</b>	
Gesamt	Anzahl	44	63	49	35	191	
	Erwartete Anzahl	44,0	63,0	49,0	35,0	191,0	

Fett gedruckt: Einen signifikanten Zusammenhang anzeigende Residuenwerte; Signifikanzniveaus s. Tabelle 13, S. 43

Bei Tumoren der Regressionsstufe I finden sich signifikant häufiger (std. Res. von 5,2 =  $p < 0,001$ ) keine Nekrosen und signifikant seltener viele Nekrosen (std. Res. von -2,3 =  $p < 0,01$ ) als zu erwarten sind, wenn kein Zusammenhang zwischen diesen beiden Merkmalen bestehen würde. Innerhalb der Regressionsstufe II fällt vor allem auf, dass nur ein Tumor von den insgesamt 41 dieser Gruppe viele Nekrosen aufweist (std. Res. von -2,4 =  $p < 0,01$ ). Die Regressionsstufe III zeigt keine signifikanten Abweichungen der absoluten von den erwarteten Häufigkeiten. Mit zunehmender Regression steigt die Anzahl der Nekrosen im Gewebe (Rangkorrelation nach Spearman  $r = 0,618$ ;  $p < 0,001$ ).

#### 4.5.2.1.4 Verhältnis Nekrosen und Anzahl der T-Zellen

Zur genaueren Überprüfung des Zusammenhangs zwischen der Regression und der Anzahl der Nekrosen wird anhand des quantitativen Merkmals der T-Lymphozyten-Anzahl (die wie beschrieben auch das Maß für die Einteilung in die Regressionsstufen darstellt) zusätzlich der Kruskal-Wallis-Test berechnet. Dieser Test zeigt einen hoch signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl der T-Lymphozyten und dem Grad der Nekrosen ( $\chi^2_3 = 40,3$ ;  $p < 0,001$ ). In Tabelle 24 (S. 62) lässt sich anhand der Mediane ein kontinuierlicher Anstieg der T-Lymphozyten bei gleichzeitig steigender Nekrose-Anzahl erkennen.

Tabelle 24: Verhältnis der Nekrosegrade zur Anzahl der T-Zellen; angegeben als Median

	Nekrosen	Anzahl	Median
T-Lymphozyten	keine	44	173,00
	gering	63	364,00
	mittel	49	489,00
	viele	35	567,00
	Gesamt	191	394,00

Dieser Zusammenhang wird auch in der graphischen Darstellung in Abb. 9 deutlich.

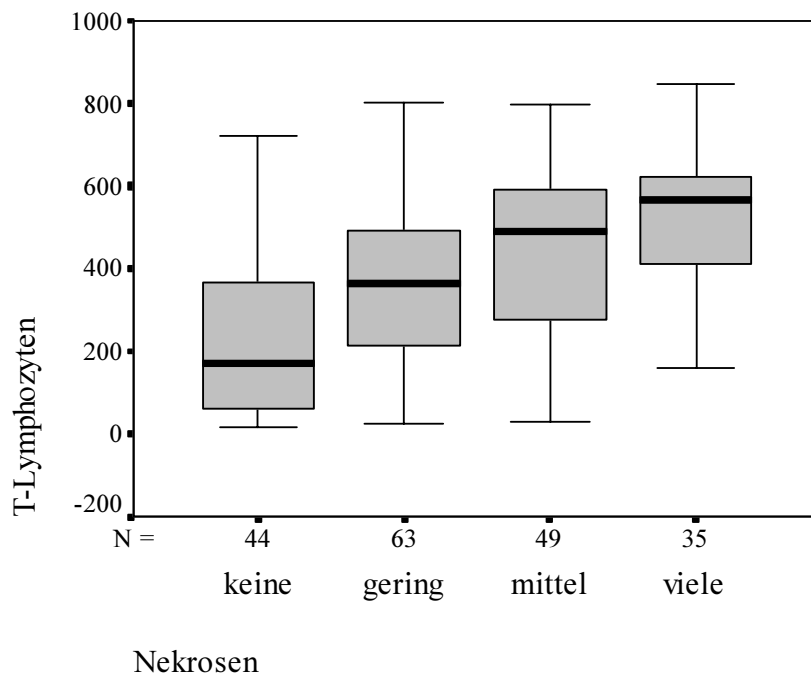


Abb. 9: Anzahl der T-Lymphozyten innerhalb der vier Nekrosetufen

#### 4.5.2.1.5 T-Zellen, Ulzeration und Größe

Zwischen der Anzahl der T-Zellen und der Ulzeration der Tumore lässt sich statistisch kein Zusammenhang erkennen (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi^2 = 3,9$ ;  $p = 0,270$ ). Auch im Verhältnis zwischen dem Auftreten der T-Lymphozyten und der Größe der Histiozytome findet sich kein signifikanter Zusammenhang (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi^2 = 0,64$ ;  $p = 0,727$ ).

#### 4.5.2.2 Auswertung CD79 $\alpha$

##### 4.4.2.2.1 Verteilung der B-Zellen im Gewebe

Die Anzahl der B-Zellen steigt im Median deutlich von epithelial (3,5) nach zentral (15,5), nimmt jedoch zur Peripherie hin wieder leicht ab (14,5). Die statistische Untersuchung zeigt, dass mit einer sehr geringen Irrtumswahrscheinlichkeit (Friedman-Test:  $\chi_2^2 = 30,8$ ;  $p < 0,001$ ) ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der B-Lymphozyten und der Tumorregion besteht.

Tabelle 25: Verteilung der B-Zellen im Gewebe; angegeben als 25. und 75. Perzentil und Median

	Anzahl	Perzentile		
		25th	50th (Median)	75th
B-Lymphozyten epithelnah	60	1,00	3,50	10,25
B-Lymphozyten zentral	60	5,25	15,50	45,50
B-Lymphozyten peripher	60	2,25	14,50	38,00

Zur besseren Darstellung wird dieser Zusammenhang mittels Boxplots in Abb. 10 auch graphisch dargestellt. Da die B-Lymphozyten einer schiefen Verteilung folgen, wird die Anzahl der B-Zellen wurzeltransformiert und dadurch die einzelnen Boxplots entzerrt.

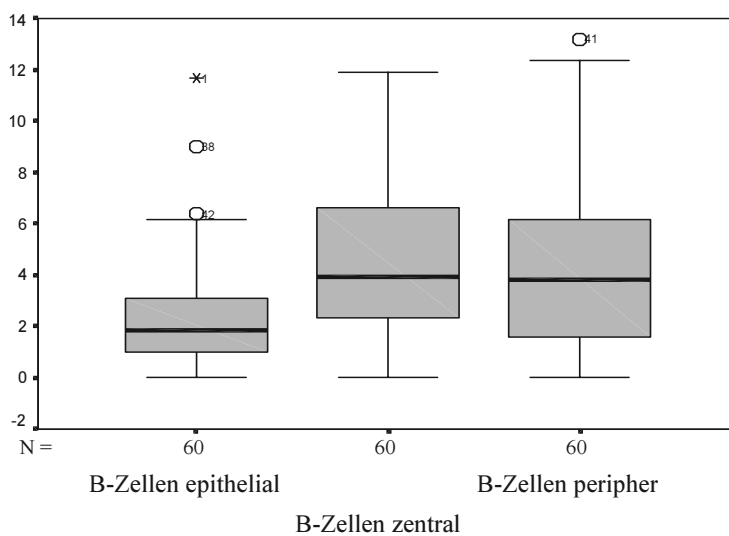


Abb. 10: Verteilung der B-Zellen im Gewebe (Daten nach Wurzel-Transformation)

Die Abb. 10 (S. 63) verdeutlicht nochmals den leichten Anstieg der B-Zellen-Anzahl von der Peripherie zum Zentrum der Tumore und ihren steilen Abfall zum Epithel hin.

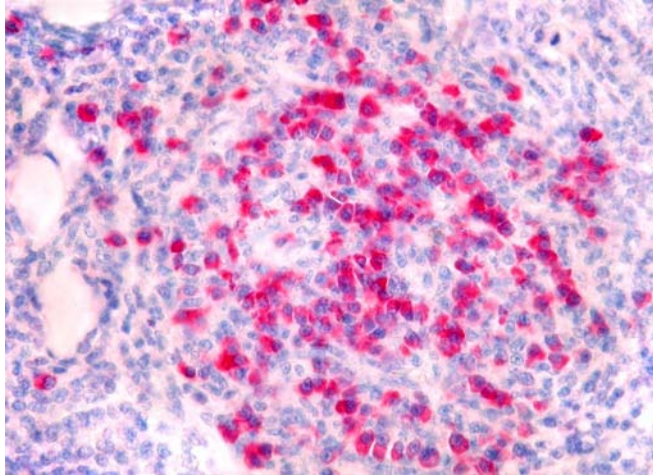


Bild 3: Ansammlung von B-Lymphozyten im Zentrum des Tumorgewebes (E-Nr.: 969/99); CD79 $\alpha$  positive B-Zellen erscheinen rot markiert; Immunfärbung; 400fache Vergrößerung

#### 4.5.2.2 Verhältnis Nekrosen und Anzahl der B-Zellen

Die Median-Werte in Tabelle 26 zeigen einen Anstieg der B-Lymphozyten-Zahl mit fortschreitender Nekrose-Anzahl. So finden sich in Tumoren ohne Nekrosen 11 B-Lymphozyten im Median, in Tumoren mit wenig Nekrosen bereits 45, gefolgt von 50,5 bei solchen mit einer mittleren Nekrose-Anzahl. In Histiocytyomen mit vielen Nekrosen steigt die B-Lymphozyten-Zahl im Median sogar auf 180,5. Dieser Zusammenhang ist nach dem Kruskal-Wallis-Test ( $\chi^2_3 = 15,4$ ;  $p < 0,002$ ) hoch signifikant.

Tabelle 26: Verhältnis der Nekrosegrade zur Anzahl der B-Zellen; angegeben als Median

	Nekrosen	Anzahl	B-Lymphozyten Median
B-Lymphozyten	keine	14	11,00
	gering	22	45,00
	mittel	14	50,50
	viele	10	180,50
	Gesamt	60	43,50

Die Abb. 11 verdeutlicht nochmals sowohl die geringen Unterschiede zwischen den mittleren Nekrosegraden als auch die starken Abweichungen zu den Tumoren ohne und mit vielen Nekrosen.

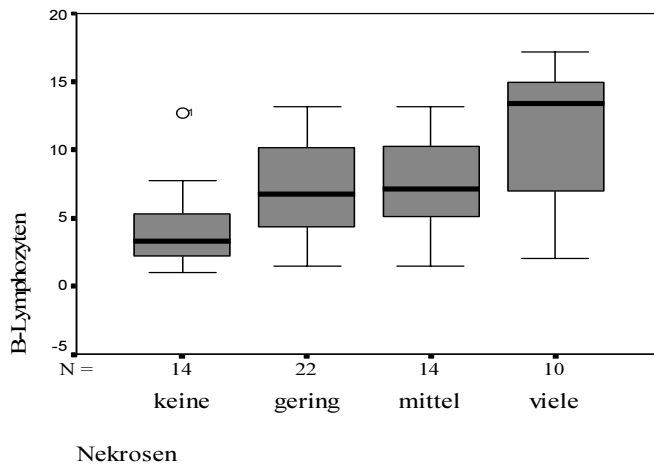


Abb. 11: Anzahl der B-Lymphozyten innerhalb der vier Nekrotestufen

Die Anzahl der Nekrosen wächst grundsätzlich sowohl mit steigender B- als auch T-Lymphozytenzahl (Tabelle 24, S. 62 und Tabelle 26, S. 64). Allerdings verdeutlicht Abb. 12, dass mit Zunahme der T-Zellen die Anzahl der Nekrosen kontinuierlicher und stärker ansteigt.

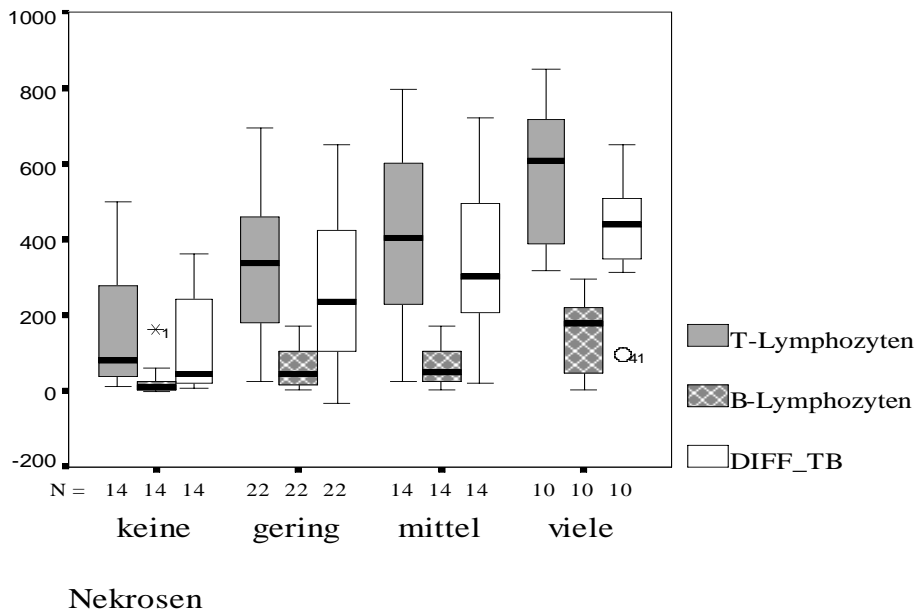


Abb. 12: Anzahl der T- und B-Lymphozyten und ihrer Differenzen innerhalb der unterschiedlichen Nekrotestufen; DIFF\_TB: Differenz zwischen Anzahl der T- und B-Lymphozyten

Tabelle 27: Medianwerte der T- und B-Lymphozyten

		Anzahl	T-Lymphozyten (Median)	B-Lymphozyten (Median)	DIFF_TB (Median)
Nekrosen	keine	14	82,50	11,0	47,50
	gering	22	340,00	45,00	237,50
	mittel	14	403,50	50,50	301,00
	viele	10	610,00	180,5	442,00
	Gesamt	60			

DIFF\_TB: Differenz zwischen Anzahl der T- und B-Lymphozyten

#### 4.5.2.2.3 Anzahl der B-Lymphozyten im Verhältnis zur Ulzeration

Die statistische Überprüfung deutet auf keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Grad der Ulzeration und der Anzahl der B-Lymphozyten hin (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,336$ ). Es finden sich im Median 33,5 B-Lymphozyten in Tumoren ohne Ulzeration und 56,0 in solchen mit starken ulzerativen Veränderungen.

In Abb. 13 lassen sich die Ähnlichkeiten der beiden Ulzerationsgruppen im Bezug auf die Anzahl der B-Zellen gut nachvollziehen. Der Interquartilbereich der beiden Boxplots ist trotz leicht unterschiedlicher Median-Werte nahezu identisch.

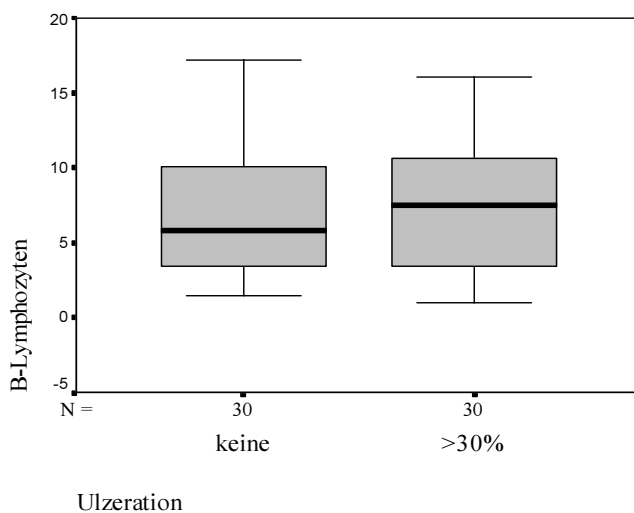


Abb. 13: Anzahl der B-Zellen (wurzeltransformiert) in Tumoren ohne Ulzeration und in Tumoren mit starker Ulzeration

### 4.5.2.3 Verhältnis T-Zellen und B-Zellen

Obwohl allgemein angenommen wird, dass vor allem die T-Lymphozyten ursächlich am Regressionsverhalten der Histiozytome beteiligt sind, wird in dieser Arbeit erstmals an einer größeren Fallzahl eine detaillierte quantitative Auswertung der Lymphozytenpopulationen vorgenommen. In 60 von 191 Fällen wird neben der Anzahl der T-Zellen auch die der B-Zellen bestimmt. In Abb. 14 wird ein positiver monotoner Zusammenhang der beiden Lymphozytenpopulationen deutlich, der durch den Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ( $r = 0,609$ ;  $p < 0,001$ ) bestätigt wird. Generell überwiegt in den Wertepaaren die Anzahl der T-Lymphozyten, aber mit steigender T-Lymphozyten-Anzahl nimmt auch die Anzahl der B-Lymphozyten zu.

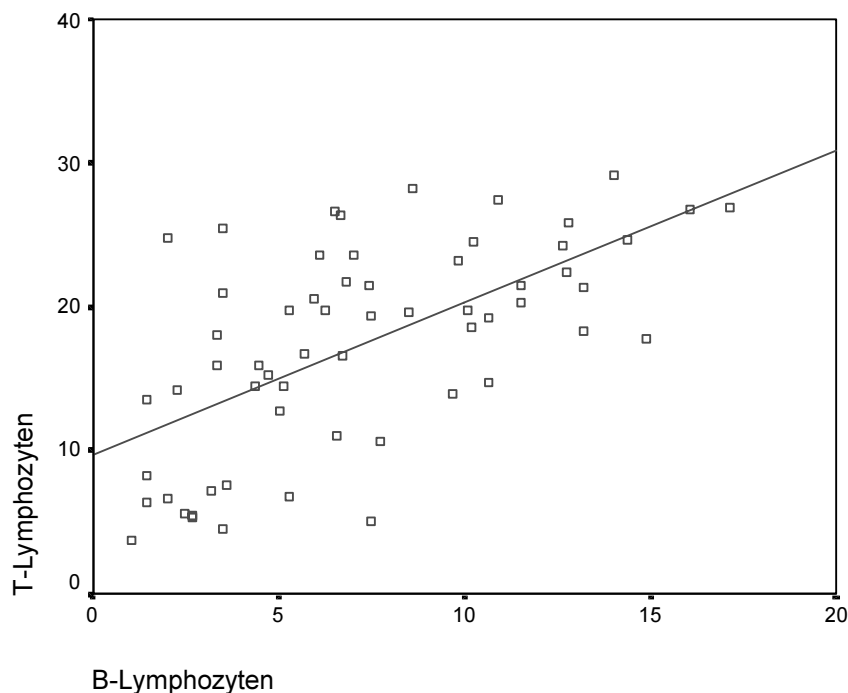


Abb. 14: Verteilung der B- und T-Zellen im Gewebe (Daten nach Wurzel-Transformation)

Die Bilder 4 und 5 zeigen die unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Lymphozytenpopulationen beispielhaft anhand eines Histiocytons, bei dem deutlich mehr T- als B-Lymphozyten nachweisbar sind.

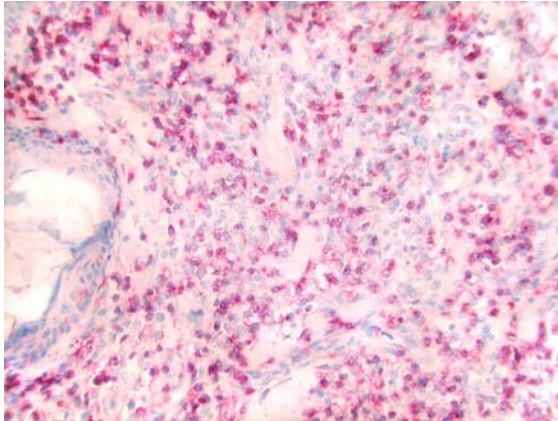


Bild 4: zahlreiche CD3 positive T-Lymphozyten epithelnah und zentral; Histiocytom der Regressionsstufe IV (E-Nr.:136/99); Immunfärbung 200fache Vergrößerung

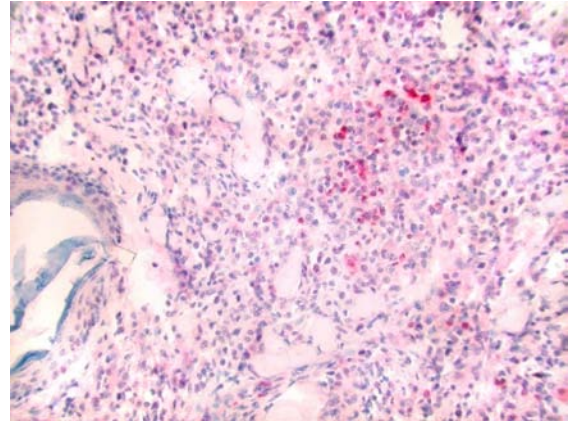


Bild 5: der gleiche Tumorausschnitt wie in Bild 4 nach Immunfärbung mit dem CD79 $\alpha$ -Antikörper; es finden sich vereinzelte B-Lymphozyten mehr zentral; 200fache Vergrößerung

#### 4.5.2.4 Auswertung MIB1

##### 4.5.2.4.1 Proliferationsindex im Verhältnis zu den einzelnen Regressionsstufen und zur Anzahl der T-Zellen

Der Proliferationsindex steigt zunächst kontinuierlich von Tumoren der Regressionsstufe I mit einem Median-Wert von 10,0 über einen Median von 17,3 innerhalb der Regressionsstufe II auf einen Median-Wert von 23,8 in der Regressionsstufe III an. Die Regressionsstufe IV zeigt dagegen im Median mit 18,8 im Verhältnis zu Stufe III eine abfallende Proliferationsrate (Abb. 15, S. 69). Zwischen der Proliferationsrate und dem Grad der Regression besteht ein hoch signifikanter Zusammenhang (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi^2_3 = 23,87$ ;  $p < 0,001$ ).



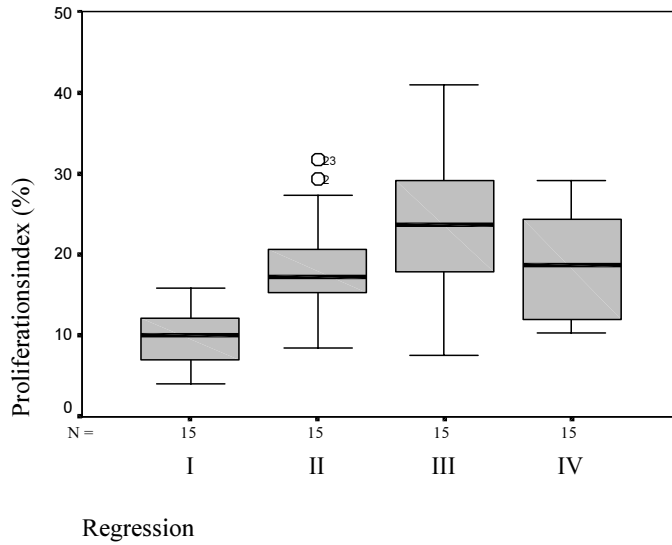


Abb. 15: Der Proliferationsindex im Verhältnis zu den einzelnen Regressionsstufen

Zur Berechnung einer Regression werden sowohl die Prozentzahlen des Proliferationsindex (arcus-sinus-Wurzel-) als auch die Werte der T-Lymphozyten (Wurzel-) transformiert. Der Proliferationsindex nimmt mit steigender Anzahl der T-Zellen zu, ab etwa 400 T-Zellen jedoch wieder leicht ab (quadratischen Regression,  $F_{2,57} = 13,5$ ;  $p < 0,001$ ; s. Abb. 16).

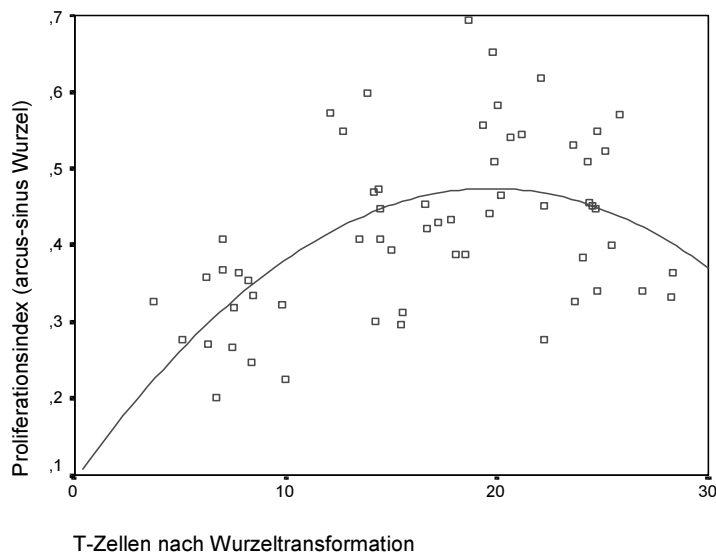


Abb. 16: Streudiagramm für das Verhältnis Proliferationsindex und Anzahl der T-Zellen mit quadratischer Regression

#### 4.5.2.4.2 Proliferationsindex und Nekrosen

Zwischen dem Proliferationsindex und der Anzahl der Nekrosen deutet sich kein Zusammenhang an (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi_3^2 = 6,73$ ;  $p = 0,081$ ). In Abb. 17 und Tabelle 28 ist deutlich zu erkennen, dass sich der Proliferationsindex innerhalb der ersten drei Nekrostufen nur geringfügig unterscheidet. Lediglich die Tumore mit vielen Nekrosen zeigen mit einem Median von 23,8 eine etwas höhere Proliferationsrate.

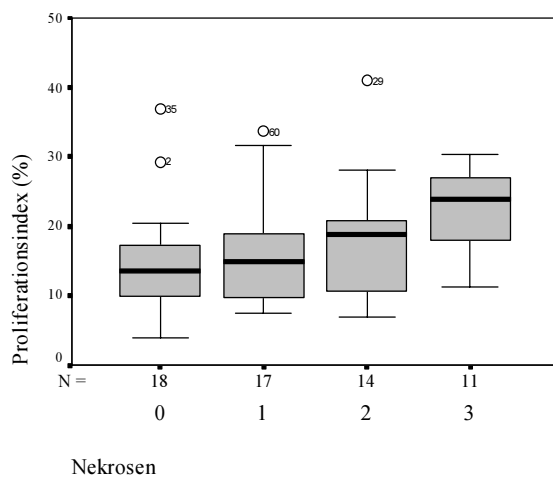


Abb. 17: Entwicklung des Proliferationsindex in den vier Nekrostufen  
0: keine; 1: gering; 2: mittel; 3: viele

Tabelle 28: Verhältnis des Proliferationsindex zum Grad der Nekrosen; angegeben als Median

	Nekrosen	N	Median
MIB (%)	0	18	13,7
	1	17	14,8
	2	14	18,9
	3	11	23,8
	Gesamt	60	

MIB (%) = Proliferationsindex; N: Anzahl der Tumore

#### 4.5.2.4.3 Proliferationsindex / Größe / Ulzeration

Das Ausmaß ulzerativer Veränderungen (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi_3^2 = 1,02$ ;  $p = 0,794$ ) und die Größenentwicklung der Tumore (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi_2^2 = 1,12$ ;  $p = 0,571$ ) weisen keinen signifikanten Zusammenhang mit der Proliferationsrate der Tumorzellen auf (Tabelle 29 und 30, S. 71).

Tabelle 29: Proliferationsindex im Verhältnis zur Ulzeration; angegeben als Median

	Ulzeration	N	Median
MIB (%)	0	12	17,9
	1	11	14,8
	2	10	19,0
	3	27	15,8
	Gesamt	60	

MIB% = Proliferationsindex;  
N: Anzahl der Tumore

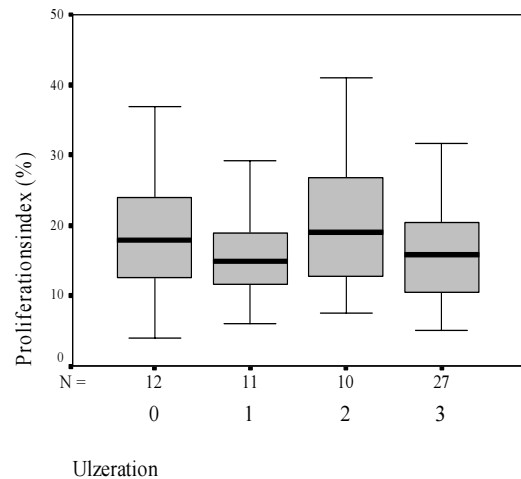


Abb. 18: Proliferationsindex innerhalb der vier Ulzerationsstufen

Tabelle 30: Proliferationsindex im Verhältnis zur Größe der Tumore; angegeben als Median

	Größe	N	Median
MIB (%)	1	23	15,8
	2	23	18,2
	3	14	13,5
	Gesamt	60	

MIB % = Proliferationsindex;  
N: Anzahl der Tumore

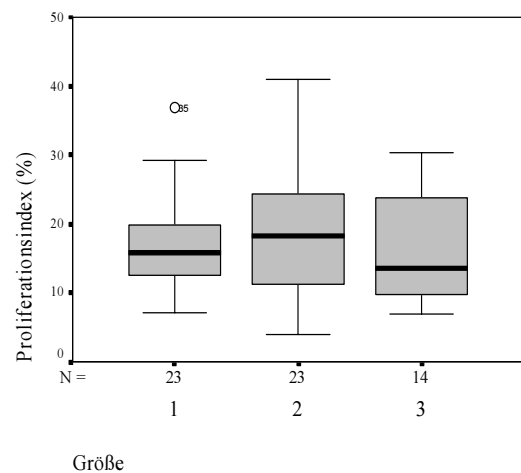


Abb. 19: Proliferationsindex im Verhältnis zur Größe der Tumore

Die graphische Darstellung mittels Boxplots in Abb. 18 und 19 veranschaulicht, dass zwischen diesen Variablen keine Beziehung festzustellen ist.

#### 4.5.2.4.4 Proliferationsrate innerhalb der verschiedenen Gesichtsfelder (epithelnah, zentral, peripher)

Bereits in Abb. 20 wird deutlich, dass sich der Proliferationsindex in den unterschiedlichen Tumorregionen nur geringfügig unterscheidet.

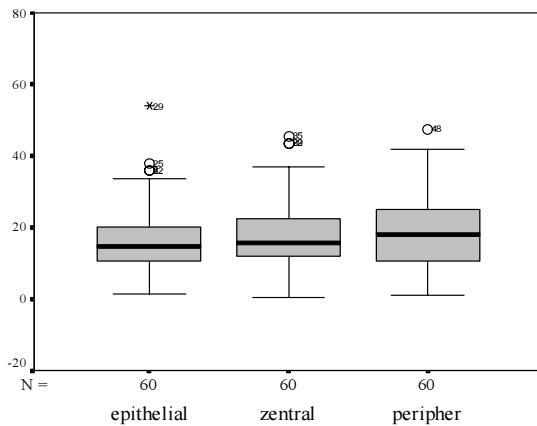


Abb. 20: Proliferationsindex in den drei Tumorregionen (epithelial, zentral, peripher), dargestellt als Boxplots zu Tabelle 31

Tabelle 31: Poliferationsindex innerhalb der verschiedenen Tumorregionen; angegeben als 25. / 75. Perzentil und Median

	N	Perzentile		
		25.	50. (Median)	75.
Prolifera- tion epi- thelnah	60	10,500	14,750	20,375
Prolifera- tion zentral	60	11,625	15,750	22,500
Prolifera- tion pe- ripher	60	10,625	18,000	25,250

N: Anzahl der untersuchten Tumore

Es besteht kein signifikanter Zusammenhang (Friedman-Test:  $\chi_2^2 = 2,433$ ;  $p = 0,296$ ) zwischen der Proliferationsaktivität und der Tumorregion.

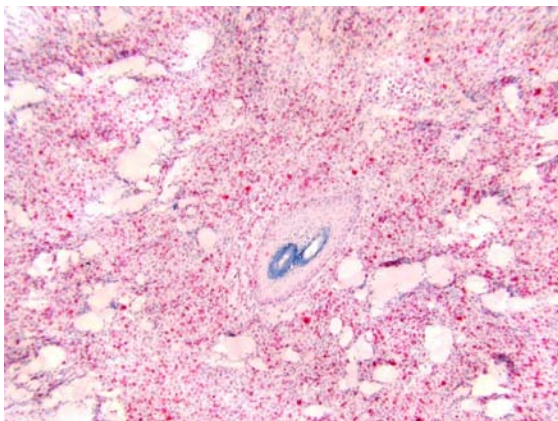


Bild 6: im gesamten Gewebe finden sich zahlreiche MIB1-positive Zellen (rot gefärbt); Histiocytom mit einem Proliferationsindex von 19,3% (E-Nr.:21/98); Immunfärbung; 100fache Vergrößerung

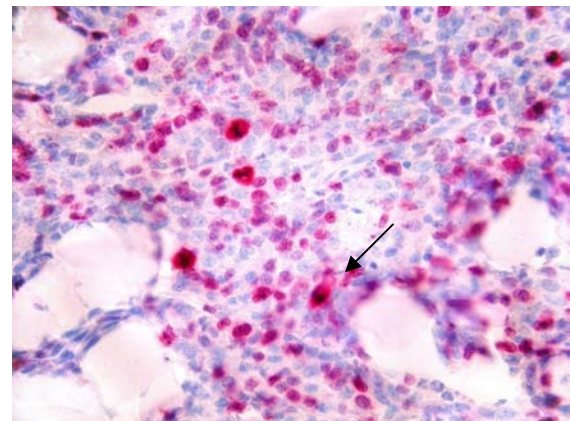


Bild 7: Histiocytom mit zahlreichen MIB1-postiven Zellen (rot gefärbt) - Proliferationsindex von 23,8% (E-Nr.: 47/97); vereinzelt sind deutliche Mitoseformen zu erkennen (s. Pfeil); Immunfärbung 400fache Vergrößerung