

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es, die Entwicklung unterschiedlicher Tumorparameter des kaninen kutanen Histiocytems mit fortschreitender Regression zu beurteilen und auf mögliche Beziehungen untereinander zu untersuchen. Zu diesem Zweck werden zunächst alle 191 untersuchten Histiocytoome anhand der Anzahl infiltrierender T-Lymphozyten vier Regressionsstufen zugeordnet. Zusätzlich werden weitere Tumordaten wie Größe, Lokalisation, Ulzeration, Nekrosen und die Anzahl der B-Lymphozyten bestimmt. Erstmals wird auch das Proliferationsverhalten der Histiocytoome im Verlauf der Regression dokumentiert. Da dieser Tumor überwiegend bei jungen Hunden auftritt (Howard und Nielsen, 1969; Taylor et al., 1969; Kelm, 1982; Weber, 1985), umfasst das einbezogene Material nur Histiocytoome von bis zu zwei Jahre alten Hunden. Diese Auswahl soll mögliche altersbedingte Unterschiede im biologischen Verhalten der Tumore ausschließen und gewährleistet somit eine größtmögliche Vergleichbarkeit der einzelnen Tumore untereinander. Die Histiocytoome stammen aus dem Einsendungsmaterial des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin und liegen formalinfixiert und in Paraffin eingebettet vor.

Die von Schulden et al. (1998) favorisierte Färbemethode zum immunhistologischen Nachweis der B-Lymphozyten mit Hilfe des CD79 $\alpha$ -Antikörpers, erweist sich als untauglich zur sicheren Markierung und Anfärbung der Zielzellen an dem verwendeten Archivmaterial. Trotz der Austestung unterschiedlicher Einwirkzeiten misslingen die Färbungen häufig gänzlich oder führen nur zu vereinzelteten Erfolgen bei gleichzeitig starker Hintergrundfärbung und erheblicher Gewebszerstörung. Eine quantitative Auswertung der verschiedenen Zellpopulationen ist so nicht möglich. Erst durch eine im Rahmen dieser Arbeit modifizierte Methode kann der CD79 $\alpha$ -Antikörper am Paraffinschnitt zuverlässig und erfolgreich eingesetzt werden. In gezielten Vorversuchen zeigt die hier modifizierte B-SA-Färbeanleitung eine verbesserte Anfärbung der Zielzellen sowie einen besseren Erhalt der Gewebestruktur als die etablierten B-SA- und ABC-Färbemethoden. Die Vorbehandlung der Antigene im Wasserbad ermöglicht dabei eine gleichmäßigere und schonende Erwärmung der Schnitte und wird daher der Mikrowellenbehandlung vorgezogen. Zusätzlich zeigt die verwendete Target-Lösung zur Demaskierung der Antigene deutlich verbesserte Ergebnisse gegenüber der Vorbehandlung in Zitrat- oder EDTA-Lösung. Frühere Ergebnisse (Pileri et al., 1997), nach denen EDTA-Lösungen eine deutlich verbesserte Antigendemaskierung ermöglichen, können in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Auch die Darstellung proliferationsaktiver Zellen mit Hilfe des

MIB1-Antikörpers brachte unerwartete Probleme mit sich. Jösten et al. (1993) etablierten diesen Marker an paraffineingebettetem Gewebe des Hundes mit Hilfe der APAAP-Methode. Unter Verwendung der von Jösten et al. (1993) ausgetesteten Vorbehandlung in Verbindung mit der moderneren B-SA-Färbung, die sich gegenüber der älteren APAAP-Methode durch verbesserte Sensitivität (Verringerung der Antikörpermenge) bei gleichzeitig geringerer unspezifischer Reaktion auszeichnet, können jedoch keine zuverlässigen Ergebnisse erzielt werden. Guvenc et al. (2002) favorisierten zum Nachweis der MIB1+ Zellen in einer Untersuchung an 10 Histiocyten eine Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Technik – eine Form der ABC-Methode. Die in der vorliegenden Arbeit zur Darstellung des CD79 $\alpha$ -Antikörpers eingeführte und modifizierte B-SA-Färbung erweist sich jedoch auch als erfolgreiche Methodik zur Verwendung des MIB1-Antikörpers an den zu untersuchenden Paraffinschnitten. Daher wird das von Guvenc et al. (2002) verwendete Verfahren nicht zusätzlich getestet.

Williamson et al. (1998) konnten mit Hilfe selbst entwickelter, neuer Antikörper das CD4- und CD8-Antigen auch am Paraffinschnitt nachweisen. Mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten - kommerziell erhältlichen - Antikörpern ist dies jedoch trotz der neuen Vorbehandlung weiterhin nicht möglich. Der seit langem zur Darstellung der T-Lymphozyten am Paraffinschnitt etablierte CD3-Antikörper lässt sich dagegen auch bei den vorliegenden Untersuchungen zuverlässig nachweisen. Die Verwendung von 3-5  $\mu$ m dicken Serienschnitten zur Herstellung der Paraffinschnitte ermöglicht eine nahezu identische Schnittebene der unterschiedlichen Färbungen und damit eine angemessene Vergleichbarkeit der Anzahl CD3-, CD79 $\alpha$ - und MIB1-positiver Zellen innerhalb eines Tumors.

Anhand der Daten der Vorberichtsbögen werden - soweit vorhanden - Alter, Lokalisation, Geschlecht und Rasse der betroffenen Tiere ausgewertet. Ebenso wie in anderen Untersuchungen (Taylor et al., 1969; Weber, 1985) finden sich die in dieser Arbeit untersuchten Histiocyten häufiger bei männlichen Tieren (111 zu 77). Eine signifikante Geschlechtsdisposition lässt sich daraus weiterhin nicht ableiten. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten, bei denen vorwiegend Boxer (Er und Sutton, 1989; Kipar, 1994; Taylor et al., 1969; Weber, 1985), Labradore (Weinstein et al., 1989) oder Spaniel (Frese et al., 1982) betroffen waren, sind im vorliegenden Untersuchungsgut Mischlinge (20,4 %) und Terrier (19,9 %) am häufigsten vertreten und Boxer (7,9 %) stehen erst an dritter Stelle. Da das Vorkommen bestimmter Rassen aufgrund von Modetrends und zahlreichen anderen Faktoren regional erheblich schwanken kann und Aussagen über die Gesamthundepopulation in Berlin nicht vorliegen, lassen sich

aus diesen Häufungen jedoch keine sinnvollen Rückschlüsse auf eine mögliche Rassendisposition ziehen. So waren in einer japanischen Studie an 143 Histiocytyomen Dackel (16,8%) und Shih Tzu (10,5%) am häufigsten vertreten (Ando et al., 2003). Dieses abweichende Ergebnis bestätigt den großen Einfluss von regionalen Unterschieden und Modetrends. Die Untersuchungen beschränken sich auf Tumore von bis zu zwei Jahre alten Tieren, von denen der überwiegende Teil zwischen einem halben und einem Jahr alt ist (42%). Die Histiocytyome im vorliegenden Untersuchungsgut stammen entsprechend anderen Literaturangaben (Frese et al., 1982; Weber, 1985; Ando et al., 2003) vor allem von Kopf (34%) und Extremitäten (33%).

Zeitangaben zum erstmaligen Auftreten der Histiocytyome liegen leider nicht vor. Da auch Größenangaben nur lückenhaft vorhanden sind und eine Vergleichbarkeit damit nicht gegeben wäre, werden die Tumore anhand ihres Erscheinungsbildes in den Paraffinblöcken drei Größen zugeordnet (bis 1 cm<sup>2</sup>, 1-2 cm<sup>2</sup> und >2 cm<sup>2</sup>). Über zwei Drittel (77%) der Tumore sind kleiner als 2 cm<sup>2</sup>. Dabei finden sich die bis zu 1 cm<sup>2</sup> großen Histiocytyome signifikant häufiger an Kopf und Hals und seltener an den Extremitäten, von denen vor allem 1-2 cm<sup>2</sup> große Tumore stammen. Von der Annahme ausgehend, dass der Zeitpunkt der Entstehung kleinerer Tumore kürzer zurückliegt als der Größerer, lassen sich diese Zahlen sicherlich damit erklären, dass Zubildungen im Bereich von Kopf und Nacken dem Besitzer bereits im Anfangsstadium unangenehm auffallen.

Der Grad der Ulzeration und die Anzahl nekrotischer Veränderungen werden für jeden Tumor an HE-gefärbten Tumorschnitten semiquantitativ bestimmt. Bislang waren diese Parameter nicht Gegenstand intensiver Untersuchungen und ihr Auftreten wird hier erstmals anhand des umfangreichen Probenmaterials statistisch ausgewertet und auf Zusammenhänge zu den immunhistologischen Ergebnissen hin beurteilt. Fast die Hälfte (47,1%) der untersuchten Tumore weisen starke ulzerative Veränderungen auf. Dieses häufige Auftreten oberflächlicher Entzündungen wurde auch in früheren Studien beobachtet und als charakteristische Sekundärerrscheinung des CCH angesehen (Taylor et al., 1969; Kelly, 1970; Weber, 1985). Immerhin finden sich jedoch bei fast einem Viertel der hier untersuchten Proben keine solchen Veränderungen. Vor allem die über 2 cm<sup>2</sup> großen Tumore zeigen im vorliegenden Untersuchungsgut signifikant häufiger eine starke und seltener keine Ulzeration, wohingegen kleine Tumore (bis 1 cm<sup>2</sup>) signifikant häufiger keine und seltener eine deutliche Ulzeration ausbilden. Die Tumore entwickeln also vermutlich erst mit zunehmendem Wachstum und damit längerem Beste-

hen oberflächliche Entzündungen des Gewebes. Die Entstehung der Ulzerationen lässt sich möglicherweise damit erklären, dass im Verlauf der Regression zahlreiche Stoffe freigesetzt werden, die zum Teil direkt als Entzündungsmediatoren fungieren oder indirekt die Freisetzung solcher Mediatoren fördern. Diese könnten unter anderem zur Störung der Mikrozirkulation und zu lokaler Vasodilatation und damit zur Rötung des betroffenen Gewebes führen. Tatsächlich ist ein rötliches Erscheinungsbild der Histiozytome häufig zu beobachten, und in der Literatur werden sie daher auch als „strawberry tumor“ (Taylor et al., 1969) bezeichnet. So wies unter anderem Kaim (2003) bei einer Untersuchung an 30 Histiozytomen eine Zunahme der induzierbaren NO-Synthetase mit zunehmender Regression nach. Dieses Enzym katalysiert die Verstoffwechselung der Aminosäure L-Arginin zu Citrullin und NO. Letzteres bildet in Verbindung mit reaktiven Sauerstoffverbindungen toxische Radikale, die tumorizide Wirkung haben (Jenkins et al., 1995), aber auch direkt als Entzündungsmediatoren zu einem erhöhten Blutfluss führen können (Bingle et al., 2002). Diese zahlreichen Entzündungsfaktoren führen möglicherweise im weiteren Verlauf zur Stimulation von Schmerzrezeptoren bzw. zur Auslösung von Juckreiz, in deren Folge es zu mechanischen Irritationen durch die Tiere mit Verletzungen der Epidermis kommt. Diese können dann in die Ausbildung von Oberflächenulzerationen münden. Die Lokalisation spielt dagegen keine Rolle für das Auftreten dieser oberflächlichen Entzündungserscheinungen.

Die nekrotischen Veränderungen im Gewebe der einzelnen Tumore werden vier verschiedenen Nekrosegraden zugeordnet: Dabei treten bei bis zu 1 cm<sup>2</sup> großen Tumoren signifikant häufiger keine Nekrosen auf als in den übrigen Tumoren. Mit zunehmender Größe steigt die Anzahl der Nekrosen leicht an, ohne dass große (>2 cm<sup>2</sup>) oder mittlere (1-2 cm<sup>2</sup>) Tumore verstärkt zahlreiche Nekrosen aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass die Ausbildung von Nekrosen neben anderen Faktoren eine gewisse Anlaufzeit benötigt. Zwischen der Anzahl der Nekrosen und dem Grad der Ulzeration kann wiederum kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

Bei der quantitativen Auswertung der verschiedenen Antikörper (CD3, CD79 und MIB1) werden jeweils drei Tumorareale (epithelial, zentral und peripher) betrachtet. Diese Aufteilung ermöglicht es, neben dem Grad der Regression bzw. der Höhe des Proliferationsindexes auch das Verteilungsmuster der untersuchten Zellgruppen zu beurteilen.

Der polyklonale CD3-Antikörper ist gegen eine Proteinkette des CD3-Antigens gerichtet. Dieses Antigen findet sich auf allen T-Zellen und konnte erstmals von Ferrer et al. (1992) auch im formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebe des Hundes nachgewiesen werden. Die immunhistologische Darstellung gelingt mit Hilfe etablierter Färbeprotokolle zuverlässig an unterschiedlichen Geweben. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die den Tumor infiltrierenden Lymphozyten hauptsächlich aus CD3+ T-Zellen bestehen und direkt mit dem Fortschreiten der Regression in Zusammenhang gebracht werden können (Kipar et al., 1998; Moore und Schrenzel, 1991; Moore et al., 1996). Moore et al. (1996) vertraten darüber hinaus die Ansicht, dass es sich fast ausschließlich um T-Zellen - genauer um CD8+ zytotoxische T-Zellen - handelt und kaum B-Zellen oder CD4+ T-Helfer-Zellen in Erscheinung treten. Kaim (2003) konnte allerdings zeigen, dass sich zumindest zu Beginn der Regression etwa gleich viele T-Helfer-Zellen wie zytotoxische T-Zellen finden und Gonzales et al. (2000) wiesen nach, dass die Regression des TVT ebenfalls mit einem Anstieg beider Zelltypen assoziiert ist. Da paraffingängige CD4- und CD8-Antikörper kommerziell nicht erhältlich waren, kann in der vorliegenden Untersuchung keine Unterscheidung dieser Subpopulationen vorgenommen werden. Eine hohe T-Zell-Anzahl wird auch in anderen Tumoren wie dem TVT (Hsiao et al., 2002; Mizuno et al., 1994; Pérez et al., 1998), dem regressiven Melanom des Menschen (Murphy et al., 1993) und dem Squamösen-Zell-Karzinom (SCC) bei Katze und Mensch (Hald et al., 1995; Pérez et al., 1999; Sadanaga et al., 1994) mit einer effizienten körpereigenen Tumorabwehr in Verbindung gebracht. Die Tumore werden daher in der vorliegenden Arbeit - im Gegensatz zur Einteilung von Cockerell und Slauson (1979) – allein auf der Basis der quantitativ ermittelten T-Zell-Anzahl vier Regressionsstufen zugeordnet. Diese Einteilung soll eine gezielte Untersuchung der Beziehung dieser vorherrschenden Zellpopulation zu anderen Tumorparametern ermöglichen und zudem die Einordnung der Tumore mit ausgeprägter lymphozytärer Infiltration in die Regressionsstufen III und IV vereinfachen. Zwar überwiegen Tumore mit deutlich regressiven Veränderungen, aber aufgrund der hohen Fallzahl können auch zahlreiche Tumore ohne bzw. mit geringer Regression in die Studie einbezogen werden. So befinden sich von den 191 untersuchten Histiocytyomen etwa zwei Drittel (63,3%) in fortgeschrittener Rückbildung (Regressionsstufe III und IV) aber immerhin noch ca. ein Drittel (36,7%) im Anfangsstadium (Regressionsstufe I-II). Die CD3+ T-Lymphozyten zeigen dabei generell einen signifikanten Abfall der T-Zellen von der Peripherie zum Epithel hin. So finden sich im Median peripher mehr als dreimal so viele T-Zellen als epithelnah. Daher zeigen sich bei Tumoren der Regressionsstufe I zentral und peripher nur vereinzelte bis keine T-Lymphozyten; diese treten dort erst mit fortschreitender Selbstheilung in zunehmender An-

zahl auf. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Annahmen (Cockerell und Slauson, 1979, Moore et al., 1996), nach denen zu Beginn der Regression Lymphozyten von den Rändern der Tumore einwandern und sich mit zunehmender Zahl weiter ins Zentrum und nachfolgend zum Epithel hin ausbreiten.

Auch in der vorliegenden Untersuchung stellt die hohe Anzahl der T-Zellen die dominierende Zellpopulation der infiltrierenden Lymphozyten dar und bestätigt die Annahme, dass diese Zellen maßgebliche Effektoren der spezifischen Immunantwort gegen Tumore darstellen (Foss, 2002). Dabei bewirken zytotoxische T-Zellen nach Bindung an die jeweiligen Zielzellen - möglicherweise über die Freisetzung spezieller Substanzen (Perforin/Granzym) - die Lyse bzw. Apoptose der Tumorzellen und damit eine Reduktion der Tumormasse (Kägi et al., 1994). Aufgrund dieser Mechanismen wäre eine vermehrte Apoptose der Tumorzellen mit Fortschreiten der Regression zu erwarten (Tizard und Schubot, 2000b). Allerdings konnte Kaim (2003) in einer Untersuchung von 30 Histiozytomen keine signifikante Erhöhung der Apoptosenanzahl im Verhältnis zum Grad der Regression beobachten, und De las Mulas et al. (1999) stellten generell einen niedrigen apoptotischen Index der Histiozytome fest, ohne jedoch das Regressionsverhalten der Tumore zu berücksichtigen. Nur Baines et al. (2000) fanden, dass in fortgeschrittener Regression befindliche Tumore eine erhöhte Apoptoserate gegenüber solchen im Anfangsstadium aufwiesen. Allerdings wiesen auch Soini et al. (1998) darauf hin, dass zur Bewertung von Zelluntergängen in Tumoren nicht nur der apoptotische Index berücksichtigt werden muss, sondern auch die Proliferationsrate und das Ausmaß der Nekrosen. Mögliche Zelluntergänge werden in dieser Arbeit daher anhand der semiquantitativ bestimmten Anzahl von Nekrosen in den unterschiedlichen Regressionsstufen beurteilt. Dabei lässt sich mit zunehmender Anzahl der T-Zellen ein vermehrtes Auftreten von Nekrosen feststellen. Es werden signifikant seltener viele und häufiger keine Nekrosen bei Tumoren der Regressionsstufe I beobachtet und im Gegensatz dazu signifikant häufiger zahlreiche Nekrosen bei Tumoren der Regressionsstufe IV. Anhand der Median-Werte der T-Zell-Anzahl im Verhältnis zur Zahl der Nekrosen lässt sich ein kontinuierlicher Anstieg mit Fortschreiten der Regression deutlich belegen; die beiden Parameter korrelieren positiv.

Zwischen dem Fortschreiten der Regression und dem Auftreten von Ulzerationen ist hingegen im Gegensatz zu den Angaben von Cockerell und Slauson (1979), die mit zunehmender Regression auch vermehrt Ulzerationen feststellten, kein signifikanter Zusammenhang zu erkennen. Auch die Größe der Tumore steht nicht in Beziehung zum Grad der Rückbildung. Dies

unterstützt frühere Annahmen, nach denen die Regression schon zu Beginn der Tumorbildung einsetzt (Moore et al., 1996). Eine fortschreitende Regression ist - unabhängig von der Größe der Tumore - mit einer Zunahme der Nekrosen verbunden. Da die Nekrosen wiederum selten bei kleinen Tumoren auftreten, entwickeln sie sich möglicherweise erst nach einer gewissen Wachstumszeit bei gleichzeitig zunehmender T-Zell-Anzahl.

Zur Beurteilung der infiltrierenden B-Lymphozyten werden von den 191 Histiocyten 60 Fälle ausgewählt, bei denen die Anzahl und Verteilung sowie mögliche Beziehungen zu Nekrosen, Ulzeration und T-Lymphozyten untersucht wird. 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 HM57 (CD79 $\alpha$ ) Antikörpers angefärbt. Dieser identifiziert das CD79 $\alpha$ -Antigen, einen Bestandteil des BCR. Es werden daher sowohl B-Lymphozyten als auch Plasmazellen markiert, allerdings lassen sich die beiden aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologie gut voneinander differenzieren; der CD79 $\alpha$ -Antikörper ermöglicht somit eine sichere Darstellung der B-Lymphozyten. Bei der quantitativen Auswertung der B-Zell-Population zeigt sich ein etwas anderes Verteilungsmuster als bei den T-Zellen: Im Median finden sich zentral mehr B-Lymphozyten als peripher mit einem deutlichen Abfall zum Epithel. Die vorherrschende Zellpopulation im Zuge der Regression bildet entsprechend früherer Beobachtungen (Kipar et al., 1998; Moore und Schrenzel, 1991; Moore et al., 1996) auch bei den hier untersuchten Tumoren die T-Lymphozyten. Aber im Gegensatz zu den vorangegangenen Studien wird im vorliegenden Probenmaterial deutlich, dass sich mehr als nur vereinzelte B-Lymphozyten finden und ihre Anzahl mit fortschreitender Selbstheilung deutlich ansteigt. Die Untersuchung der beiden Lymphozytenpopulationen ergibt eine starke, positive Korrelation ( $r = 0,609$ ;  $p < 0,001$ ) dieser Entzündungszellen. Der Anstieg der B-Lymphozyten-Zahl von der Peripherie zum Tumorzentrum könnte dabei darauf hindeuten, dass sich diese Zellen nach Einwanderung ins Tumorgewebe lokal weiter vermehren. Zwischen ihrem Auftreten und den oberflächlichen Entzündungserscheinungen lässt sich dagegen keine Beziehung herstellen.

Die Feststellung, dass sich der Anstieg der B-Lymphozyten vermehrt zentral ausbildet und sich auch bei Tumoren der Regressionsstufe III-IV diese Zellen nur vereinzelt epithelnah finden, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die B-Lymphozyten tatsächlich direkt an Mechanismen der Rückbildung, aber nur in geringem Maße an der Entstehung sekundärer Entzündungserscheinungen beteiligt sind. Dies vermittelt den Eindruck, dass diese Zellart aktiver als

angenommen an der Regression beteiligt ist. Bereits bei anderen Tumorarten konnte festgestellt werden, dass offenbar verschiedene Zelltypen und damit mehrere Mechanismen aktiv bei der Tumorabwehr mitwirken. So wurden beim TVT, einem Tumor der ebenso wie das Histiocytom durch rasches Wachstum mit häufig nachfolgender Regression gekennzeichnet ist, neben den dominanten T-Lymphozyten auch zahlreiche B-Zellen, Makrophagen und Plasmazellen gefunden (Mizuno et al., 1994; Pérez et al., 1998). Kaim (2003) entdeckte ein vermehrtes Vorkommen von Makrophagen auch beim Histiocytom. Makrophagen regulieren einerseits die lokale Immunantwort durch Zytokinsekretion und besitzen andererseits auch eine direkte Antitumor-Aktivität. Neben den B-Lymphozyten und Plasmazellen gehören auch die Makrophagen zu einer Zellgruppe, die spezielle Fc-Rezeptoren (Fc $\gamma$ RI oder Fc $\gamma$ RII) besitzen, mit deren Hilfe sie sich im Beisein spezifischer Antikörper an fremde Zielzellen binden können. In der Folge entwickeln diese Zellen eine eigene zytotoxische Aktivität. Dieser Vorgang wird als Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC, „antibody dependant cellular cytotoxicity“) bezeichnet. Allgemein geht man davon aus, dass drei Hauptwege der effektiven Zellzerstörung existieren: Die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität, die ADCC und die von Natürlichen Killerzellen (NK) vermittelte Zytotoxizität (Tizard und Schubot, 2000b). Die genauen Mechanismen des ADCC sind jedoch unbekannt und gegenüber der direkten T-Zell-vermittelten Zytotoxizität langsamer und ineffizienter. Tumore mit zahlreichen Nekrosen weisen im Median fast die 15fache B-Lymphozyten-Zahl im Verhältnis zu Tumoren ohne Nekrosen auf. Dennoch zeigt die Darstellung der Differenzen zwischen T- und B-Zellen im Verhältnis zur Anzahl der Nekrosen (s. Abb. 12, S.65), dass die Entstehung dieser Zelluntergänge in erster Linie mit der T-Zell-Anzahl positiv korreliert.

Des Weiteren werden jeweils 15 Schnitte aus den Regressionsstufen I-IV ausgewählt und mit Hilfe des MIB1-Antikörpers markiert. Der monoklonale Antikörper kann zur Darstellung des proliferationsassoziierten Ki-67-Antigens am Paraffinschnitt bei Mensch und Hund eingesetzt werden (Cattoretti et al., 1992; Jösten et al., 1993; Sarli et al., 1994; Sawhney und Hall, 1992). Dieses Antigen ist in allen Phasen des aktiven Zellzyklus nachweisbar, d.h. in der G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und Mitose-Phase; nur in der G<sub>0</sub>-Phase ruhender Zellen wird es nicht exprimiert (Gerdes et al., 1984). Die Auswahl der Schnitte gewährleistet die Vergleichbarkeit der verschiedenen Regressionsstufen und eine statistisch sinnvolle Darstellung möglicher Unterschiede. Dabei werden pro Gesichtsfeld 200 Tumorzellen gezählt und entsprechend dem prozentualen Anteil MIB1-positiver Zellen zur Gesamtzahl der ausgewählten Zellen der Proliferationsindex ermittelt. In der Literatur schwanken die Angaben über die Mitoseraten der



Histiozytomzellen von nur vereinzelt (Drommer und Schulz, 1969; Kipar, 1994) bis zu acht und mehr Mitosen pro Gesichtsfeld (Glick et al., 1976; Guvenc et al., 2002; Martin de las Mulas et al., 1999; Taylor et al., 1969). Der Proliferationsindex der hier untersuchten Histiozytome schwankt im Median zwischen 10 und 23,8 % innerhalb der verschiedenen Regressionsstufen. Guvenc et al. (2002) bestimmten anhand von 10 Histiozytomen ebenfalls die MIB1 positiven Zellen und ermittelten einen etwas geringeren Anteil von 9-17% proliferationsaktiver Zellen. Allerdings machten sie keine Angaben über den Grad der Regression der einzelnen Tumore. Die Abweichungen zwischen der Beurteilung von Mitosen anhand von HE-Färbungen und dem immunhistologischen Nachweis proliferationsaktiver Zellen lassen sich sicherlich damit erklären, dass letztere Methode auch die Anfangsstadien der Zellteilung erkennt. Der immunhistologische Nachweis der MIB1-positiven Zellen innerhalb verschiedener Tumorareale ergibt im Gegensatz zu dem Verteilungsmuster der Lymphozytensubpopulationen keine Unterschiede der Proliferationsaktivität peripher, zentral oder epithelnah. Die Tumorzellen scheinen sich somit in der gesamten Neoplasie gleichmäßig zu teilen.

Des Weiteren lässt sich weder ein signifikanter Einfluss der Tumorgroße noch der sekundären Entzündungserscheinungen auf das Wachstumsverhalten oder umgekehrt feststellen. Beinahe ebenso unauffällig erscheint das Verhältnis der Nekrosezahl zur Höhe der Proliferationsrate: In Tumoren mit vielen Nekrosen finden sich im Median zwar beinahe doppelt so viele MIB1-positive Zellen wie in solchen ohne Nekrosen, es ergibt sich daraus jedoch keine signifikante Beziehung. Guvenc et al. (2002) untersuchten den Zelluntergang anhand der Apoptoserate. Sie konnten für diesen Parameter ebenfalls keine Korrelation zur Proliferationsrate beobachten, d. h. hohe Mitoseraten führten nicht zu einem signifikant vermehrten oder verringerten apoptotischen Zelltod. De las Mulas et al. (1999) stellten dagegen einen generell niedrigen apoptotischen Index bei gleichzeitig hoher Proliferationsrate der Histiozytome fest, wohingegen andere gutartige Tumore entgegengesetzte Verhältnisse aufwiesen. Das Reaktionsmuster des CCH entspricht somit eher dem maligner Tumore.

Bei der Untersuchung des Proliferationsindex in Abhängigkeit zu den vier Regressionsstufen lässt sich in dieser Arbeit eine positive Korrelation dieser beiden Parameter von Stufe I bis III beobachten - mit zunehmender Anzahl der T-Lymphozyten steigt auch die Proliferationsrate kontinuierlich an. So verdoppelt sich der Proliferationsindex im Median von Regressionsstufe I zu III. Erst zwischen den Regressionsstufen III und IV, sinkt die Proliferationsrate leicht ab. Die quadratische Regression dieser Parameter ist hochsignifikant. Diese Ergebnisse

dokumentieren ein überraschend aggressives Wachstumsverhalten der ansonsten gutartigen Histiozytome. Der Umstand, dass sich die Proliferationsrate anfangs mit zunehmender lymphozytärer Infiltration noch steigert, könnte möglicherweise mit dem vermehrten Auftreten von TNF $\alpha$  assoziiert sein. Dieses Zytokin fördert in hoher Konzentration die Proliferation und Aktivierung zytotoxischer Effektorzellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK) und bewirkt darüber hinaus durch die selektive Zerstörung der Gefäßversorgung die Nekrotisierung des Tumorgewebes (Foss, 2002). In geringerer Konzentration kann TNF $\alpha$  dagegen auch als endogener Tumorpromotor fungieren, indem es unter anderem die Ausbildung des Tumorstromas begünstigt (Balkwill, 2002). So konnte Kaim (2003) eine gesteigerte TNF $\alpha$ -Synthese mit fortschreitender Regression feststellen. Dies könnte bedeuten, dass im Anfangsstadium der Regression die noch geringe TNF $\alpha$ -Synthese die Tumorentwicklung zunächst fördert. Erst mit fortschreitender Rückbildung findet eine ausreichende Synthese statt und damit einhergehend ein langsamer Abfall der Proliferationsrate. Kaim (2003) stellte darüber hinaus eine vermehrte iNOS Aktivität mit zunehmender Regression fest und führte diese auf eine erhöhte Anzahl aktivierter Makrophagen zurück. Das Reaktionsprodukt dieses Enzyms (NO) wirkt jedoch nicht nur inhibitorisch auf Tumore sondern kann auch durch Oxidation mutagene DNA-Schäden auslösen und dadurch die Proliferation begünstigen (Balkwill, 2002; Jenkins et al., 1995). Diese Faktoren könnten erklären, warum sich erst bei weit fortgeschrittener Regression eine verringerte Tumorzellproliferation bei gleichzeitig gesteigertem Tumorzelluntergang (Nekrosen) entwickelt.

Der Proliferationsindex dient bei vielen Tumorarten als prognostischer Faktor und korreliert dort positiv mit der Bösartigkeit dieser Neoplasien (Roels et al., 1999; Sarli et al., 1994). Allerdings wurde auch beim TVT, einem zumeist ebenfalls zur Regression neigenden Tumor, eine hohe Mitoserate sowohl in der Regressions- als auch der Progressionsphase dokumentiert (Hsiao et al., 2002). Möglicherweise spielt die Proliferationsrate eine nicht unerhebliche Rolle für die Entwicklung der effektiven Tumorabwehr. Die Mehrzahl der spontan entstehenden Tumore ist nur schwach immunogen und löst keine oder kaum eine nachweisbare Immunreaktion aus. Es wird angenommen, dass die Expression von tumorspezifischen Antigenen mit weiteren Stimuli zusammenfallen muss, um eine ausreichende Immunantwort zu induzieren (Seiter und Marincola, 2000). Neben dem Vorhandensein spezifischer Tumorantigene könnte auch eine ungewöhnlich hohe Teilungsrate die körpereigene Immunabwehr stimulieren. Ein solch ungebremstes Wachstumsverhalten kann schon für sich genommen vom Immunsystem als fremd erkannt werden und führt darüber hinaus zu einer erhöhten Antigenexpression auf

den Tumorzellen. Zusätzlich ist die Expression von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche sich schnell teilender Zellen erhöht (Tizard und Schubot, 2000a). Diese speziellen Zelloberflächen-Rezeptoren bestimmen, welche Antigene aufbereitet und präsentiert werden. So fanden Kipar et al. (1998) im Anfangsstadium der Regression MHC-II-Moleküle vor allem in zytoplasmatischen Vesikeln im Inneren der Tumorzellen und erst mit fortschreitender lymphozytärer Infiltration vermehrt an der Oberfläche. Die Präsentation eines bislang unbekanntes Antigens in Verbindung mit MHC-II-Molekülen könnte ausschlaggebend für die Aktivierung der zellulären Immunantwort sein (Parnes, 1990). Durch das „aggressive“ Wachstumsverhalten könnten die Histiocytoome somit indirekt ihre eigene Zerstörung stimulieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Zunahme der T-Lymphozyten, die als Maß der Regression der Histiocytoome dient, positiv korreliert mit der Anzahl der Nekrosen, B-Lymphozyten und proliferationsaktiven Tumorzellen. Das Auftreten fortgeschrittener Regression auch in kleinen Tumoren lässt vermuten, dass diese schon zu Beginn des Tumorwachstums einsetzt. Die sekundären Entzündungserscheinungen lassen sich dagegen nicht ursächlich einer Zellpopulation zuordnen. Sie entstehen meist erst mit fortgeschrittenem Tumorwachstum und sind vermutlich eine Reaktion auf die Kombination der unterschiedlichen infiltrierenden Entzündungszellen und ihrer Produkte.

Das CCH stammt nach Ansicht einiger Autoren von den Langerhans-Zellen der Haut ab, die zur Gruppe der Antigen-präsentierenden-Zellen (APCs) gehören (Marchal et al., 1995b; Moore und Schrenzel, 1991; Moore et al., 1996). Levitsky (1996) stellte eine These auf, nach der Neoplasien dendritischer APCs ihre eigene Elimination in die Wege leiten, sobald sie Tumor-assoziierte Antigene exprimieren und vermutete daher, dass maligne Tumore dieser Zellpopulation nicht vorkommen können. Allerdings lässt die heterogene Lysozym-Expression der Histiocytoomzellen (Kipar et al., 1998; Moore, 1986; Sandusky et al., 1987) - einem immunhistochemischen Marker für Zellen des MMS - letztendlich immer noch Zweifel an der Abstammung des CCH aufkommen. Möglicherweise entwickeln sich Teile der Tumorzellen sowohl zu Histiocyten als auch zu dendritischen Zellen oder repräsentieren Zwischenstufen. Solange geeignete Antikörper zum Nachweis von Differenzierungsantigenen dieser Zellarten beim Hund nicht zur Verfügung stehen, bleibt die exakte Zuordnung zu einer Zelllinie fragwürdig. Zusätzlich weist das Regressionsverhalten des TVT zahlreiche Parallelen zu dem der Histiocytoome auf. Das TVT exprimiert allerdings zahlreiche Makrophagenmarker, was auf einen histiozytären Ursprung der Tumorzellen hindeutet (Marchal et al., 1997; Mozos et al.,

1996). Die Abstammung der Tumorzellen ist also möglicherweise nicht allein entscheidend für die Ausbildung der Selbstheilung. Es konnten bislang zahlreiche Faktoren, die mit einer zunehmenden Rückbildung einhergehen, beobachtet werden: Zunächst konnten T-Lymphozyten - vor allem CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen - als die dominierende Zellpopulation der infiltrierenden Entzündungszellen identifiziert werden (Kaim, 2003; Moore et al., 1996). Des Weiteren wurde eine vermehrte Expression von MHC I, MHC II und ICAM-1, die wichtige Rezeptoren für die Antigenpräsentation bilden, auf den Tumorzellen festgestellt (Baines et al., 2000a; Kipar et al., 1998). Darüber hinaus scheinen aber auch Makrophagen und B-Lymphozyten mehr als früher angenommen an der effektiven Tumorabwehr beteiligt zu sein. Neben den Tumorzellen selbst könnten auch diese entscheidend an einer MHC-II gebundenen Antigenpräsentation mitwirken. Zusätzlich konnte eine vermehrte Synthese von IL-2, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  nachgewiesen werden (Kaim, 2003). Diese so genannten Th1-Zytokine unterstützen maßgeblich die Entwicklung der zellulären Immunantwort.

Beim kaninen kutanen Histiozytom sind offensichtlich die Voraussetzungen für eine effektive T-Zell-Aktivierung gegeben. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass neben Makrophagen auch B-Lymphozyten eine bedeutendere Rolle als bislang angenommen bei der Entwicklung der Regression spielen. Neben ihrer Fähigkeit, Antigene zu präsentieren und wichtige co-stimulierende Substanzen freizusetzen, könnten sie auch direkt in Form der ADCC am Untergang der Tumorzellen beteiligt sein. Als weitere Zellgruppe könnten auch NK-Zellen an der Antitumor-Aktivität mitwirken. In wieweit sie bei der Regression des Histiozytoms für den zytotoxischen Effekt auf Tumorzellen mitverantwortlich sind, sollte in folgenden Untersuchungen geklärt werden. Dabei wäre es interessant herauszufinden, mit Hilfe welcher Effektormechanismen die infiltrierenden Zellen ihre zytotoxische Wirkung erzielen (Expression von Granzym/Perforin, FAS-Ligand oder Liganden der TNF $\alpha$ -Superfamilie). Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte hohe Proliferationsrate der Histiozytomzellen, die sich mit zunehmender lymphozytärer Infiltration noch steigert und erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium der Selbstheilung nachlässt, könnte ebenfalls mitentscheidend für die Ausbildung der Tumorabwehr sein. Diese für gutartige Tumore ungewöhnlich hohe Wachstumsrate konnte bereits bei anderen regressiven Tumoren nachgewiesen werden (Hald et al., 1995; Hsiao et al., 2002; Pérez et al., 1999; Wagner et al., 1998). Durch die hohe Teilungsrate wird möglicherweise die Antigenität des Tumors gesteigert und gleichzeitig die zur Präsentation dieser Antigene notwendigen MHC-Moleküle vermehrt exprimiert. Zusätzlich könnte diese erhöhte Proliferation an sich als Abweichung von einer gesunden

Zellteilung erkannt werden und die Immunantwort auslösen. Nach wie vor bleibt allerdings zu beweisen, wodurch die Tumorzellen als fremd erkannt werden, wie die initiale Antigenerkennung einsetzt und welche co-stimulierenden Moleküle entscheidend sind, um eine erfolgreiche körpereigene Abwehr zu entwickeln. Eine genauere Untersuchung der Antigenexpression auf den Tumorzellen wird notwendig sein, um die Induktion der Immunantwort beim Histiozytom besser zu verstehen. Die detaillierte Darstellung möglicher Korrelationen zwischen infiltrierenden Entzündungszellen und dem biologischen Verhalten von Tumoren wird zum besseren Verständnis der Regulation des Tumorwachstums und zur Entwicklung zukünftiger Immuntherapien weiterhin von Bedeutung sein. Natürlich auftretende Tumore, die sich spontan zurückbilden, bieten neben experimentellen Modellen die Möglichkeit, neue Erkenntnisse über die verschiedenen Mechanismen der Tumorabwehr zu entwickeln. Interessant bleibt vor allem, was solche Tumore von denjenigen unterscheidet, die nicht in der Lage sind, eine solch effiziente Immunantwort auszulösen.

Die Untersuchung des Regressionsverhaltens natürlich auftretender Tumore sind in ihrer Aussagekraft allerdings eingeschränkt. Da sie nicht unter Ausschluss einzelner Zellgruppen stattfinden können, ist das Ausmaß des Einflusses der unterschiedlichen Mechanismen auf die Tumorabwehr nur zu vermuten.