

6 Zusammenfassung

Das kanine kutane Histiocytom ist ein häufiger, gutartiger Hauttumor, der vor allem bei jungen Hunden auftritt. Histiocytoome erscheinen als schnell wachsende, kuppelförmige Zubildungen, die häufig oberflächlich ulzerieren und vor allem an Kopf und Extremitäten auftreten. Ein wichtiges Charakteristikum dieser Neoplasie ist ihre Fähigkeit zur Spontanregression, die von einer massiven Entzündungszellinfiltration begleitet wird. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Erkenntnisse über das Regressionsverhalten der Histiocytoome in Hinblick auf weitere Tumordaten wie Lymphozytendifferenzierung, Größe, Ulzeration und Wachstumsaktivität zu gewinnen.

Grundlage dieser Untersuchung sind 191 in Paraffin eingebettete Histiocytoome von bis zu zwei Jahre alten Hunden aus dem Archivmaterial des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin. Anhand ihres Erscheinungsbildes in den Paraffinblöcken werden die Histiocytoome drei Größen zugeordnet ($< 1 \text{ cm}^2$; $1-2 \text{ cm}^2$; $> 2 \text{ cm}^2$). Des Weiteren wird der Grad der Ulzeration und nekrotischer Veränderungen für jeden Tumor an Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten 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. Die Subpopulationen der infiltrierenden Lymphozyten werden mit spezifischen Antikörpern gegen das CD3- und CD79 α -Antigen immunhistologisch identifiziert. Da allgemein angenommen wird, dass die T-Lymphozyten in direktem Zusammenhang mit Entwicklung und Fortschreiten der Selbstheilung stehen, werden zunächst alle 191 Histiocytoome aufgrund der quantitativ ermittelten Anzahl CD3 $^+$ T-Zellen vier Regressionsstufen zugeordnet. Zur Beurteilung der infiltrierenden CD79 α^+ B-Lymphozyten werden wiederum 60 Fälle (jeweils 30 Tumore ohne und 30 mit starker Ulzeration) ausgewählt und ihre Anzahl, Verteilung und mögliche Beziehungen zu Nekrosen, Ulzeration und T-Lymphozyten untersucht. Zusätzlich wird erstmals auch das Proliferationsverhalten der Histiocytoome im Verlauf der Regression dokumentiert. Dazu werden mit Hilfe des MIB1-Antikörpers anhand von jeweils 15 Schnitten aus den Regressionsstufen I bis IV die proliferationsaktiven Zellen immunhistologisch markiert, um den Proliferationsindex zu bestimmen.

Der immunhistologische Nachweis der CD79 α - und MIB1-Antigene erfolgt unter Verwendung einer in dieser Arbeit modifizierten B-SA-Färbung. Erst durch diese Methode kann der CD79 α -Antikörper am Paraffinschnitt zuverlässig und erfolgreich eingesetzt werden. In gezielten Vorversuchen zeigt sich eine verbesserte Anfärbung der Zielzellen sowie ein besserer Erhalt der Gewebestruktur als nach den etablierten B-SA- und ABC-Färbemethoden. Auch der MIB1-Antikörper lässt sich mit Hilfe dieser Methode besser darstellen. Bei der modifizierten B-SA-Methode werden die Schnitte zur Antigen Demaskierung zunächst 35 Minuten bei 95°C in einer Target-Retrieval-Lösung im Wasserbad behandelt. Die Vorbehandlung der Antigene im Wasserbad ermöglicht dabei eine gleichmäßige und schonende Erwärmung der Schnitte und wird daher der Mikrowellenbehandlung vorgezogen. Die verwendete Target-Lösung zeigt gegenüber der Vorbehandlung in Zitrat- oder EDTA-Lösung deutlich verbesserte Ergebnisse. Anschließend werden die Schnitte mit den jeweiligen Primärantikörpern 40 Minuten bei Raumtemperatur und nachfolgend über Nacht bei 4°C inkubiert. Dabei wird der CD79 α in einer Antikörper-Konzentration von 1:50 und der MIB1 in einer Konzentration von 1:80 verwendet.

Die Untersuchungen zeigen, dass kleine Tumore ($\leq 1 \text{ cm}^2$) signifikant häufiger von Kopf und Hals und nur selten von den Extremitäten stammen. Darüber hinaus zeigen sie signifikant seltener ulzerative Veränderungen und Nekrosen als größere Tumore. Große Histiocytoome ($>2 \text{ cm}^2$) weisen zudem signifikant häufiger eine starke ($> 30 \%$ des Epithels) Ulzeration auf, mit zunehmender Größe der Tumore steigt auch die Anzahl der Nekrosen leicht an. Darüber hinaus ergeben die immunhistologischen Untersuchungen einen signifikanten Anstieg der T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und der Proliferationsrate im Verlauf der Regression. Die den Tumor infiltrierenden Lymphozyten werden auch in dieser Untersuchung von den CD3+ T-Zellen dominiert. Dabei sinkt ihre Anzahl innerhalb der Tumore signifikant von der Peripherie zum Epithel hin ab. Insgesamt zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Nekrosenzahl mit zunehmender Regression. Im Gegensatz zu früheren Darstellungen finden sich allerdings auch zahlreiche CD79+ B-Lymphozyten im Gewebe. Ihre Anzahl korreliert positiv mit der CD3+ T-Zellen, wobei sie jedoch signifikant häufiger im Tumorzentrum auftreten. Da auch bei kleinen Tumoren bereits Anzeichen einer fortgeschrittenen Regression auftreten, beginnt diese offensichtlich schon zu Beginn des Tumorzustands. Beziehungen zwischen dem Auftreten sekundärer Entzündungserscheinungen und dem Fortschreiten der Regression lassen sich dagegen nicht feststellen. Trotz der Gutartigkeit der Histiocytoome lässt sich eine überraschend hohe Teilungsrate gleichmäßig im gesamten Tumorgewebe beobachten: Der Proliferationsin-

dex schwankt innerhalb der Regressionsstufen im Median zwischen 10 bis 23%. Dabei steigt die Proliferation der Tumorzellen zunächst mit zunehmender Regression signifikant an, um dann erst im Stadium weit fortgeschrittener Selbstheilung langsam abzusinken. Tumorgroße sowie Grad der Ulzeration und Anzahl der Nekrosen stehen dagegen in keiner auffälligen Beziehung zur Proliferation der Histiocytomzellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl das Tumorwachstum als auch der Tumorzelluntergang im Zusammenhang mit der Regression stehen. Dabei zeigt sich, dass die Selbstheilung schon zu Beginn der Tumor-Zell-Proliferation einsetzt und neben der zytolytischen Aktivität der T-Zellen möglicherweise mehr als angenommen auch von einer B-Zell-vermittelten Immunität begleitet wird. Die hohe Proliferationsrate könnte sowohl durch eine Erhöhung der Antigenität der Tumore als auch durch die erhöhte Mitoserate selbst für die Induktion der Immunantwort verantwortlich sein. Möglicherweise trägt das „aggressive“ Tumorwachstum somit indirekt zur eigenen Zerstörung bei.