
5. Diskussion

Zahlreiche Untersuchungen beim Menschen belegen, dass Mastzellen eine große Bedeutung für bestimmte immunologische und nicht immunologische Erkrankungen haben. Auch für den Hund konnte die Beteiligung von Mastzellen und Mastzellproteasen an allergischen Erkrankungen der Haut und der Atemwege nachgewiesen werden (TURNER et al., 1989; SEKIZAWA et al., 1989; RUBINSTEIN et al., 1990; SOMMERHOFF et al., 1989a). Grundlegende Kenntnisse über die physiologische Verteilung von Mastzellen insgesamt und Kenntnisse über die Existenz und Verteilung verschiedener Mastzellsubtypen sind wichtige Voraussetzungen, um pathologische Verhältnisse von physiologischen Verhältnissen unterscheiden zu können. Untersuchungen über die Verteilung der Mastzellsubtypen liegen für den Menschen vor, entsprechend detaillierte Untersuchungen für den Hund fehlen bisher. Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es daher, detaillierte Angaben über die Dichte und Verteilung von Mastzellen in verschiedenen Gewebelokalisationen von sechs verschiedenen Organen zu liefern und die vorgefundenen Mastzellen aufgrund ihres Proteasengehaltes und ihrer Formalinsensitivität zu differenzieren. Auf den in der hier vorgestellten Studie erstmals gewonnenen Ergebnissen aufbauend konnte inzwischen gezeigt werden, dass sich das Verteilungsmuster der Mastzellsubtypen bei Hunden mit atopischer Dermatitis und Hunden mit kutaner Muzinose von dem Verteilungsmuster der Mastzellsubtypen bei gesunden Hunden unterscheidet (WELLE et al., 1997b und 1997c).

Die vorliegende Studie zeigt, dass offensichtlich speziesspezifische Unterschiede zwischen Mensch und Hund bezüglich der Dichte bzw. Verteilung der Mastzellsubtypen existieren, eine Interpretation jedoch häufig durch unterschiedliche Nachweismethoden erschwert wird. Sowohl die eingesetzte Fixierungstechnik als auch die verwendete Färbung beeinflussen die Darstellbarkeit der Mastzellinhaltsstoffe, so dass es einer einheitlichen Untersuchungsmethode bedarf, wenn Ergebnisse verschiedener Gewebelokalisationen und Spezies miteinander verglichen werden sollen.

Übereinstimmend mit den bisherigen Untersuchungen zur Heterogenität von Mastzellen beim Menschen und bei der Ratte hat die vorliegende Untersuchung über canine Mastzellen in Magen, Duodenum, Lunge, Uterus, Lymphknoten und Haut gezeigt, dass die Mastzellen des Hundes in Bezug auf ihre Empfindlichkeit gegenüber formaldehydhaltigen Fixationsmitteln und in Bezug auf ihre Proteasenzusammensetzung heterogen sind. Zudem ist ihre Dichte in den verschiedenen Organen, aber auch innerhalb eines Organs, je nach Gewebelokalisation, unterschiedlich.

5.1 Durchschnittliche Mastzellendichte im gesamten Organ

Bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Hunden ist die durchschnittliche Mastzellendichte im Duodenum am höchsten, gefolgt von Magen, Lunge, Uterus, Haut und Lymphknoten (Tabelle 21 (Seite 43)). Vergleichbar mit diesen Ergebnissen ist nach den Untersuchungen von CRAIG et al. (1986) die Mastzellendichte beim Menschen im Dünndarm und in der Lunge höher als in der Haut. Nach den Untersuchungen von WEIDNER und AUSTEN (1993) nimmt die Mastzellendichte beim Menschen in der gleichen Reihenfolge wie bei den in dieser Studie untersuchten Hunden ab. Die meisten Mastzellen fanden sich unter allen von ihnen untersuchten Organen in der Mukosa und Submukosa des Darmes. Geringere Mastzellendichten fanden WEIDNER und AUSTEN (1993) in der Wand der Alveolen, in der Haut und in den Achsillarlymphknoten, am wenigsten Mastzellen wiesen sie in den Bronchien nach.

Da in der vorliegenden Untersuchung möglichst gleich große Flächen der verschiedenen Gewebelokalisationen ausgewertet worden sind, stammen zwar die größten Anteile dieser Flächen aus ein und demselben Areal, ein Teil der Flächen jedoch aus Regionen, die über das gemeinsame Areal hinausgehen. Dies trifft insbesondere für die Lokalisationen mit nur geringem Flächenanteil zu. Dementsprechend kann die in dieser Arbeit angegebene durchschnittliche Gesamtmastzellendichte eines Organes von der Gesamtdichte der Mastzellen in einem gleichgroßen Areal des gleichen Organs, in dem nicht nach verschiedenen Lokalisationen getrennt ausgewertet wurde, abweichen.

5.1.1 Durchschnittliche Mastzellendichte in den verschiedenen Gewebelokalisationen eines Organs

Eine lokalisationsabhängige Verteilung von Mastzellen im Gewebe ist bekannt. Vor allem sind Mastzellen an den Kontaktstellen zur Außenwelt lokalisiert. Sie finden sich subepithelial, um Ausführungsgänge, um Lymph- und Blutgefäße und um periphere Nerven im lockeren Bindegewebe des Gastrointestinal-, Respirations- und Urogenitalsystems sowie in der Haut verteilt (Übersicht in PEARCE, 1986 und GALLI, 1993). Die vorliegende Studie zur Verteilung der Mastzellen in einigen ausgewählten Organen hat gezeigt, dass auch beim Hund eine ungleichmäßige Verteilung der Mastzellen in Abhängigkeit von der Gewebestruktur zu beobachten ist. Um die gewonnenen Dichten mit Literaturangaben über Mastzellendichten bei Mensch und Hund vergleichen zu können, ist in einigen Fällen eine Umrechnung in Mastzellen/mm³ (Mz/mm³) notwendig. Dazu wurde die von CRAIG et al. (1985 und 1986) sowie von IRANI et al. (1987a und 1990a) verwendete Formel zur Umrechnung der in Mz/mm² gewonnenen Dichten in Mz/mm³ verwendet (WILLIAMS, 1977), die sowohl den mittleren Mastzellendurchmesser als auch die Schnittdicke berücksichtigt ($Mz/mm^3 = Mz/mm^2 \times 1000/13,5 \text{ mm}$).

Im **Magen-Darm-Trakt** der hier untersuchten Hunde fanden sich die meisten Mastzellen in der Lamina propria der Mukosa, im Magen apikal, im Duodenum subglandulär. Verglichen mit den von CRAIG et al. (1985 und 1986) und IRANI et al. (1987a) gewonnenen Dichten in der Mukosa des Dünndarms beim Menschen (21.000 bzw. 24.000 Mz/mm³ nach Fixierung in Carnoy) fanden sich in der Mukosa des Duodenums der untersuchten Hunde deutlich mehr Mastzellen (30.000 bis 100.000) als beim Menschen. Auch in der Submukosa, die bei Mensch und Hund eine geringere Mastzellendichte

aufweist als die Mukosa, finden sich bei den untersuchten Hunden mehr Mastzellen als beim Menschen. Im Vergleich zu den Ergebnissen von CRAIG et al. (1985 und 1986) (rund 6300 bzw. 8600 Mz/mm³) und IRANI et al. (1987a) (rund 8700 Mz/mm³) fanden sich in der Submukosa des Duodenums der untersuchten Hunde etwa doppelt so viele Mastzellen (rund 15600 Mz/mm³). In der **Lunge** der untersuchten Hunde fanden sich, wie beim Menschen (HARVIMA et al., 1989b), Mastzellen hauptsächlich peribronchial und perivaskulär. Quantitative Angaben zur Mastzellidichte in der Lunge finden sich bei CRAIG et al. (1985 und 1986). Nach ihren Ergebnissen gibt es unter gleichen Fixationsbedingungen in der Alveolarwand 20000 bzw. 26500 Mz/mm³ und damit mehr Mastzellen als bei den hier untersuchten Hunden, bei denen in dieser Lokalisation durchschnittlich 6000 Mz/mm³ gezählt wurden. Subepithelial dagegen konnten bei den Hunden im Vergleich zum Menschen höhere Mastzellidichten nachgewiesen werden (29000 im Vergleich zu 18000 Mz/mm³). Die von BRADDING et al. (1995) in der Submukosa der Bronchien des Menschen gefundenen Mastzellidichten sind mit den in dergleichen Lokalisation nach Formalinfixierung bei den Hunden gefundenen Mastzellidichten vergleichbar. BRADDING et al. (1995) fanden rund 46 Tryptase-haltige und 12 Chymase-haltige Mz/mm². Bei den untersuchten Hunden fanden sich rund 43 Tryptase-haltige (Summe der T- und TC-Mastzellen) und 22 Chymase-haltige Mz/mm² (Summe der TC- und C-Mastzellen). Nach Carnoy-Fixierung ist die Mastzellidichte sowohl der Tryptase- als auch der Chymase-haltigen Mastzellen bei den untersuchten Hunden höher (56,4 Tryptase-haltige und 46,9 Chymase-haltige Mz/mm²). Innerhalb der Bronchialknorpel, intraepithelial und intraluminal wurden bei den untersuchten Hunden nur äußerst selten bzw. keine Mastzellen nachgewiesen. BRADDING et al. (1995) wiesen ebenfalls nur sehr vereinzelt Mastzellen im Bronchialepithel nach.

MORI et al. (1997) untersuchten in Carnoy fixiertes Gewebe aus dem **Uterus** des Menschen und wiesen immunhistochemisch die höchsten Mastzellidichten in der luminalen Hälfte des Myometriums nach, weniger in der äußeren Hälfte und wenig Mastzellen im Endometrium. Entsprechend fanden sich bei den untersuchten Hündinnen ebenfalls mehr Mastzellen im Myometrium als im Endometrium (Tabelle 27.1 Seite 143). Im Unterschied zu den Befunden von MORI et al. (1997) fanden sich bei den Hündinnen jedoch unabhängig von Fixierung und Färbung mehr Mastzellen im Stratum vasculosum und longitudinale als im Stratum circulare des Myometriums. MORI et al. (1997) kamen bei dem Vergleich der von ihnen ermittelten Mastzellidichten im Uterus des Menschen mit den in der Muskularis des Intestinums ermittelten Mastzellidichten (BEFUS et al., 1985) zu dem Schluß, dass die Mastzellidichte im Myometrium deutlich höher als in der Muskularis des Intestinum ist. Unterschiede in der Mastzellidichte zwischen diesen beiden Lokalisationen können bei den untersuchten Hunden nur im in Formalin fixierten Gewebe festgestellt werden. Nur hier finden sich in der Muskularis des Duodenums vergleichsweise weniger Mastzellen als im Myometrium des Uterus.

In der **Haut** fand sich bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hunden die durchschnittlich höchste Mastzellidichte perikapillär und periadnexal. In der Haut des Menschen fanden MIKHAIL und MILLER-MILINSKA (1964), EADY et al. (1979), IRANI et al. (1986) und HARVIMA et al. (1988a und 1989b) die höchste Mastzellidichte ebenfalls in der oberen Dermis, sowie um Blutgefäße und Hautanhangsstrukturen. Wie bei den hier untersuchten Hunden fanden die Untersucher der Haut des Menschen nur selten bzw. keine Mastzellen in der Epidermis.

Um die in der Literatur angegebenen Dichtewerte für die gesamte Dermis mit den bei den hier untersuchten Hunden bestimmten Werten vergleichen zu können, wurde die Mastzellidichte für jeden Hund in einer Fläche der Dermis bestimmt, die allen Einzellokalisationen gemeinsam war. Alle über

diese gemeinsame Fläche hinausgehenden Flächen wurden nicht berücksichtigt. Der Tabelle 29.4. (Seite 152) sind die berechneten Durchschnitts- und Mittelwerte zu entnehmen. Während in der Dermis des Menschen im Mittel 7200, 8000 bzw. 7300 Mz/mm³ nachgewiesen werden konnten (MIKHAIL und MILLER-MILINSKA, 1964, CRAIG et al., 1985 und IRANI et al., 1990a), fanden sich in der Dermis der hier untersuchten Hunde nur etwa 2300 Mz/mm³. Dieses Ergebnis entspricht dem Ergebnis, das BECKER et al. (1985) für die Haut des Hundes erzielt haben (2100 Mz/mm³). Im Detail fanden BECKER et al. (1985) die höchsten Mastzellichten ebenfalls vor allem perivaskulär und periadnexal. Die in der vorgestellten Untersuchung ermittelten periadnexalen Mastzellichten entsprechen auch in etwa den Mastzellichten, die TURNER et al. (1989) in der Thoraxhaut von Mischlingen, fixiert mit Carnoy'scher Lösung, gefärbt mit Giemsa und ausgewertet in Regionen mit der höchsten Mastzellichte, feststellen konnten.

Die z.T. mehr oder weniger voneinander abweichenden Mastzellichten zwischen Geweben des Menschen und des Hundes können auf artspezifische Unterschiede schließen lassen. Zu berücksichtigen sind aber auch individuelle oder technisch bedingte Unterschiede bei der Fixierung, sowie bei der Anfertigung, Färbung und Auswertung der Schnitte.

5.2. Mastzellproteasen

Mit Hilfe der enzym-immunhistochemischen Reaktion für den Nachweis der beiden Mastzellproteasen konnten wie beim Menschen (WEIDNER und AUSTEN, 1993) auch bei den untersuchten Hunden drei Mastzelltypen identifiziert werden. Mastzellen, die entweder Tryptase oder Chymase enthalten und Mastzellen, die beide Proteasen enthalten, kurz T-, C- und TC- Mastzellen. Inzwischen konnten mit der hier vorgestellten Methode alle drei Mastzellsubtypen auch bei anderen Hunden und beim Rind nachgewiesen werden (WELLE et al., 1997b und 1997c; KÜTHER et al., 1998).

Mit Ausnahme einzelner Lokalisationen in der Haut, im Uterus und im Magen-Darmtrakt, konnten bei den hier untersuchten Hunden alle drei Mastzellsubtypen in jedem der untersuchten Organe unabhängig von der verwendeten Fixationsmethode nachgewiesen werden. Die prozentuale Verteilung der drei Mastzelltypen variierte jedoch in den verschiedenen Organen und Organlokalisationen und in Abhängigkeit von der gewählten Fixation.

Bei der Identifizierung des Mastzelltyps war eine farbliche Trennung der Mastzellgranula nicht immer möglich. Genauso wie es Granula gab, die eindeutig rot oder blau gefärbt waren, gab es in anderen Schnitten Granula, die sich mischfarben (rotviolett) darstellten. Diese Befunde könnten darauf hindeuten, dass die beiden Proteasen, wenn sie innerhalb ein und derselben Mastzelle vorkommen, sowohl in verschiedenen, als auch in ein und denselben Granula gespeichert sein können.

Vergleichbare Beobachtungen hat CAUGHEY et al. (1988c) gemacht. Die Annahme, dass Tryptase und Chymase in verschiedenen Granula ein und derselben Zelle gespeichert sind, kann jedoch auf lichtmikroskopischem Niveau nicht bewiesen werden.

5.2.1 Dominierender Mastzelltyp

Während es beim Menschen schon zahlreiche Untersuchungen über die nach ihrem Proteasengehalt zu unterscheidenden Mastzellsubtypen und ihre Verteilung in verschiedenen Organen gibt (Tabelle 7 Seite 22), fehlen bisher entsprechende Untersuchungen beim Hund.

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hunden dominiert die nur Tryptase enthaltende

Mastzelle (T- Mastzelle) nach der Formalinfixierung und in den meisten Lokalisationen auch nach der Carnoy-Fixierung in Magen, Duodenum und Lunge. IRANI et al. (1986 und 1989a) und WEIDNER und AUSTEN (1991 und 1993) fanden in den in Carnoy fixierten Gewebeproben der entsprechenden Organe des Menschen (Magen, Duodenum und Lunge) ebenfalls vor allem T-Mastzellen. In der Haut dominieren bei den untersuchten Hunden wie beim Menschen (IRANI et al. (1986 und 1989a; HARVIMA et al., 1990; WEIDNER und AUSTEN 1993) die Chymase-haltigen Mastzellen. Im Uterus des Menschen dominieren T-Mastzellen im Endometrium, TC-Mastzellen im äußeren Myometrium (MORI et al., 1997), während bei den hier untersuchten Hündinnen im mit Carnoy fixierten Gewebe die TC-Mastzelle in allen Lokalisationen des Uterus dominieren.

Die in der vorgestellten Studie erstmals beim Hund nachgewiesene Tryptase-negative, Chymase-positive C-Mastzelle wurde bisher nur von WEIDNER und AUSTEN (1991 und 1993) histochemisch nachgewiesen.

5.2.2 Verteilung der T-, TC- und C-Mastzellen bei Mensch und Hund im Vergleich

Der Anteil der Chymase-haltigen Mastzellen ist bei den untersuchten Hunden in der **Mukosa des Magens** höher, in der **Submukosa** dagegen niedriger als beim Menschen (WEIDNER und AUSTEN, 1993).

Die Literaturangaben über die prozentualen Anteile der Mastzellsubtypen in der **Mukosa des Dünndarms** des Menschen sind sehr unterschiedlich. Nach Angaben von IRANI et al. (1986, 1987a und 1989a), CRAIG et al. (1993) und WEIDNER und AUSTEN (1993) ist der dominierende Mastzelltyp in dieser Lokalisation die T-Mastzelle, nach Angaben von ALDENBORG und ENERBÄCK (1994) ist es die TC-Mastzelle. Bei den untersuchten Hunden dominieren hier ebenfalls die T-Mastzellen. Der Anteil aller drei Mastzelltypen entspricht der Verteilung der Mastzelltypen, wie sie WEIDNER und AUSTEN (1993) für den Menschen beschrieben haben. Im Vergleich zu den Ergebnissen von IRANI et al. (1986 und 1989a) wurde dagegen bei den Hunden ein vergleichsweise höherer Anteil, im Vergleich zu den Ergebnissen von ALDENBORG und ENERBÄCK (1994) ein vergleichsweise geringerer Anteil Chymase-haltiger Mastzellen in der Dünndarmmukosa nachgewiesen. Eine mit den Ergebnissen von ALDENBORG und ENERBÄCK (1994) übereinstimmende Dominanz der TC-Mastzellen fand sich bei den untersuchten Hunden in der apikalen Mukosa des Duodenums.

Wie in der Submukosa des Magens ist auch in der **Submukosa des Dünndarms** der Anteil der Chymase-haltigen Mastzellen bei den Hunden durchschnittlich niedriger als beim Menschen (WEIDNER und AUSTEN, 1993; IRANI et al., 1989a und ALDENBORG und ENERBÄCK, 1994). Insgesamt ist die Submukosa aber auch bei den untersuchten Hunden die Lokalisation im Duodenum, in der die TC-Mastzellen dominieren und in der, wie beim Menschen (WEIDNER und AUSTEN, 1993), der prozentuale Anteil der C-Mastzellen am höchsten ist.

Die enzymhistochemischen Untersuchungen von OSMAN et al. (1989) sind mit den immunhistochemischen Untersuchungsergebnissen von IRANI et al. (1989a) vergleichbar. Sie haben gezeigt, dass es im Darm des Menschen nur eine limitierte Anzahl von Chymase-positiven Mastzellen gibt und diese vornehmlich in der Submukosa lokalisiert sind. HUNTLEY et al. (1985) dagegen haben mit Hilfe von Naphthol AS-D Chlorazetat in allen Mastzellen der Mukosa des Gastrointestinaltraktes

Chymase (chymotrypsinähnliche Esterase), wenn auch mit unterschiedlicher Aktivität, nachgewiesen. Während beim Menschen in den Alveolarwänden der **Lunge** hauptsächlich T-Mastzellen zu finden sind (IRANI et al., 1989a; CRAIG et al., 1993; WEIDNER und AUSTEN, 1993) und TC-Mastzellen perivaskulär gesehen werden können (IRANI et al., 1989a), kommen beim Hund nach der Carnoy-Fixierung in den Alveolarwänden etwa gleich viele T-, TC- und C-Mastzellen vor. TC-Mastzellen finden sich - wie beim Menschen - vor allem perivaskulär in den Alveolarwänden (zu über 50%). Bei den untersuchten Hunden dominiert die T-Mastzelle in den in Carnoy fixierten Lungenschnitten wie beim Menschen in der Lamina propria der Bronchien (IRANI et al., 1986; Matin et al., 1992) aber auch in der Pleura visceralis. MATIN et al. (1992) zeigten, dass der Anteil Chymase-haltiger Mastzellen in den Bronchien in Abhängigkeit von der genauen Lokalisation in der Bronchialwand variiert. Mit einem Anteil von 73% fanden sie diese vor allem in der Nähe der submukösen Drüsen. Während beim Menschen in der gesamten Submukosa trotzdem die T-Mastzellen dominieren (MATIN et al., 1992; BRADDING et al., 1995), sind bei den untersuchten Hunden in der gesamten Submukosa die Chymase-haltigen Mastzellen mit 65 % (44% TC + 21% C-Mastzellen) dominierend.

Wie in der **Haut** des Menschen (IRANI et al., 1989a; CRAIG et al., 1993; WEIDNER und AUSTEN, 1991 und 1993) dominieren auch in der Haut des Hundes die Chymase-haltigen Mastzellen. IRANI et al. (1986 und 1989a), WEIDNER und AUSTEN (1991 und 1993) sowie ALDENBORG und ENERBÄCK (1994) fanden in der in Carnoy fixierten Haut des Menschen fast ausschließlich, CRAIG et al. (1993) ausschließlich TC-Mastzellen. SCHMOLKE et al. (1994) untersuchten isolierte Hautmastzellen des Menschen und stellten fest, dass es unabhängig von der von ihnen gewählten Nachweismethode (Toluidinblau, Chlorazetatesterase, Tryptase (enzymhistochemisch), Chymase (enzymhistochemisch), IgE) keine signifikanten Unterschiede in dem Anteil der nachgewiesenen Mastzellen gab, was ebenfalls für eine Dominanz der Tryptase- und Chymase-haltigen TC-Mastzellen in der Haut spricht.

BECKER et al. (1985) konnten in der Haut des Hundes mit Hilfe der Naphtol AS-D-Chlorazetatesterase Reaktion zum enzymhistochemischen Nachweis der Chymase ebenfalls genauso viele Mastzellen nachweisen, wie mit der metachromatischen Färbung von in Mota's Bleiazetat fixiertem Gewebe.

Bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Hunden fanden sich in den formalinfixierten Gewebeproben durchschnittlich 93 %, in den in Carnoy fixierten Gewebeproben durchschnittlich 95 % Chymase-haltige Mastzellen. Der Anteil der Chymase-positiven und Tryptase-negativen Mastzellen (C-Mastzellen) war bei den Hunden jedoch höher als beim Menschen. In der mit Carnoy fixierten Haut konnten ca. 50% C-Mastzellen nachgewiesen werden, während WEIDNER und AUSTEN, (1991 und 1993) in der in Carnoy fixierten Haut des Menschen nur rund 0,5 % Tryptase-negative C-Mastzellen nachwiesen.

Im Gegensatz zu den Hautmastzellen von Mensch und Hund enthalten die des Rindes offensichtlich keine enzymhistochemisch mit Naphthol AS-D Chlorazetat nachweisbare Chymase-Enzymaktivität (WELLE et al., 1995; KÜTHER et al., 1998).

Die immunhistochemisch gezeigte Dominanz der Tryptase-haltigen Mastzellen in der Lunge des Menschen konnte durch enzymhistochemische Untersuchungsergebnisse an isolierten Mastzellen bestätigt werden. SCHWARTZ et al. (1987a) und HARVIMA et al. (1989b) haben gezeigt, dass die Enzymaktivität von Tryptase in der Lunge des Menschen hoch ist, während eine Chymaseaktivität in

der Lunge nicht bzw. kaum nachweisbar ist. Gleichzeitig haben ihre Untersuchungen gezeigt, dass in der Haut des Menschen die Enzymaktivität beider Proteasen hoch ist. Abweichend davon fanden SCHECHTER et al. (1986) auch unter den von ihnen immunzytochemisch untersuchten, isolierten Lungenmastzellen keine Mastzellen, die Chymase-negativ waren. Eine Selektion Chymase-haltiger Mastzellen zugunsten der T-Mastzellen infolge der unterschiedlichen Fixationsbedingungen konnte von ihnen nicht ausgeschlossen werden.

Im **Lymphknoten** ist der Anteil der T- und C-Mastzellen beim Hund höher als beim Menschen, bei dem 96,7% TC-Mastzellen gefunden wurden (WEIDNER und AUSTEN, 1993). Bei den untersuchten Hunden schwanken jedoch die prozentualen Anteile in Abhängigkeit von der Gewebelokalisation. In der Kapsel, im Randsinus und im Cortex sind über 50% der Mastzellen T-Mastzellen, in den übrigen Regionen dominieren, wie beim Menschen, die TC-Mastzellen. Der Anteil der C-Mastzellen ist jedoch mit 23% im Lymphknoten wesentlich höher als beim Menschen.

Im **Uterus** des Menschen dominieren im Endometrium die T-Mastzellen und in der äußeren Hälfte des Myometriums die TC-Mastzellen (MORI et al., 1997). In der luminalen Hälfte des Myometriums kommen T- und TC-Mastzellen in gleichen Anteilen vor (MORI et al., 1997). Bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Hündinnen dagegen dominieren im mit Carnoy fixierten Gewebe die TC-Mastzellen in allen Lokalisationen des Uterus.

Während bei den hier untersuchten Hunden im Uterus T- und TC- Mastzellen, in den in Carnoy fixierten Gewebeproben auch C-Mastzellen, in jeder Lokalisation des Uterus vorkommen, fanden WELLE et al. (1997a) im Endometrium des Pferdes und KÜTHER et al. (1998) im Uterus des Rindes unabhängig von der gewählten Fixierung (Formalin, Carnoy) gar keine Chymase-haltigen Mastzellen. Im Uterus der untersuchten Hunde nimmt der Anteil der Chymase-haltigen Mastzellen wie in den übrigen untersuchten Organen nach der Carnoy-Fixierung noch zu.

IRANI et al. (1986 und 1989a) und ALDENBORG und ENERBÄCK (1994) haben in keinem der von ihnen untersuchten Gewebe C-Mastzellen identifiziert, während WEIDNER und AUSTEN (1991 und 1993) unter Verwendung der gleichen primären, aber anderer sekundärer Antikörper in fast allen untersuchten Geweben C-Mastzellen fanden. Die Existenz dieses "neuen", nur Chymase enthaltenden Mastzellsubtyps ist inzwischen durch in vitro Kultivierung von C-Mastzellen aus normalen Mastzell-Progenitoren des Menschen bestätigt worden (LI et al., 1996).

Die im Vergleich Mensch : Hund zum Teil deutlich voneinander abweichenden Anteile der jeweiligen Mastzellsubtypen an der Gesamtmastzellpopulation können auf verschiedene Weise interpretiert werden.

1) Methodische **Unterschiede in der Nachweisttechnik**

In der hier vorgestellten Untersuchung der Mastzellsubtypen des Hundes wurde zum Nachweis der Tryptase ein **polyklonaler**, aus dem **Kaninchen** gewonnener und gegen die Tryptase aus Hautmastzellen des Menschen gerichteter **Antikörper** (HARVIMA et al., 1988a) verwendet und nicht, wie bei IRANI et al. (1986 und 1989a), WEIDNER und AUSTEN (1991 und 1993) und ALDENBORG und ENERBÄCK (1994), ein **monoklonaler** Antikörper gegen Tryptase des Menschen, der aus der **Maus** gewonnen wurde.

ALDENBORG und ENERBÄCK (1994) haben jedoch herausgefunden, dass die von ihnen

untersuchten Hunde-Mastzellen mit diesem monoklonalen Anti-Tryptase-Antikörper nicht reagieren. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass IRANI et al. (1989a) gezeigt haben, dass sich bei Verwendung eines monoklonalen Antikörpers im Vergleich zur Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen Chymase keine quantitativen Unterschiede in der Darstellbarkeit reifer Chymase-haltiger Mastzellen ergeben. Nur in Geweben mit vornehmlich unreifen Mastzellen konnten sie mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen Chymase mehr Chymase-positive Mastzellen nachweisen als mit dem polyklonalen Anti-Chymase-Antikörper.

Ein weiterer methodischer Unterschied zu den Untersuchungen beim Menschen ist die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit der **Nachweis der Chymase enzymhistochemisch** und nicht wie bei IRANI et al. (1986 und 1989a), WEIDNER und AUSTEN (1991 und 1993) und ALDENBORG und ENERBÄCK (1994) immunhistochemisch erfolgt ist.

Als Erklärung für die festgestellten artspezifischen Unterschiede könnte demnach eine geringere Sensitivität des Tryptase Antikörpers für Mastzellen des Hundes und/oder eine höhere Sensitivität des Nachweises der Enzymaktivität der Chymase mit Naphthol AS-D Chlorazetat in Betracht kommen.

Die Naphthol AS-D Chlorazetatesterase ist ein spezifisches Enzym, das eine hohe Aktivität in Mastzellen, aber auch in Promyelozyten und neutrophilen Granulozyten zeigt, jedoch keine oder nur eine geringe Aktivität in Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten und basophilen Granulozyten aufweist (YAM et al., 1971; LI et al., 1973; LEDER, 1979). Ihr Nachweis wurde zur Darstellung von Mastzellen verschiedener Spezies, inklusive Mensch und Hund u.a. von BECKER et al. (1985), HUNTLEY et al. (1985), CAUGHEY et al. (1988c), COLBATZKY et al. (1991) und MATIN et al. (1992) herangezogen.

Unter dem Aspekt, dass nach Anwendung der Naphthol AS-D Chlorazetatesterase Reaktion im Intestinum des Menschen offensichtlich alle Mastzellen Chymase enthalten (HUNTLEY et al., 1985), haben die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hunde sogar weniger Chymase-haltige Mastzellen als der Mensch.

Weitere Untersuchungen über die Chlorazetatesterase Reaktion in anderen Organen des Menschen wären von großer Bedeutung für eine bessere Vergleichbarkeit der in der vorliegenden Studie vorgestellten Ergebnisse beim Hund mit denen vom Menschen.

2) **Speziesspezifische Unterschiede**

Der Anteil Chymase-haltigen Mastzellen ist beim Hund in den in Carnoy fixierten Geweben höher als beim Menschen.

Dafür wiederum gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten.

1. *Unterschiedliche Stadien innerhalb einer Entwicklungs- und Reifephase und Einfluß des microenvironment mit unterschiedlicher Zusammensetzung der Zytokine*

Eine Erklärung für speziesspezifische Unterschiede liefern die Untersuchungsergebnisse von KITAMURA et al. (1986 und 1987) und LI et al. (1996).

Bei der in vitro Kultivierung von Mastzellen aus normalen Mastzell-Progenitoren des Menschen fanden LI et al. (1996) eine Verschiebung des Anteils der C-Mastzellen im Vergleich zu den TC-

Mastzellen im Verlauf der Kultivierung. Während die C-Mastzellen in der frühen Kultur der dominierende Mastzellsubtyp war, nahm ihr Anteil mit der Zeit ab, während der der TC-Mastzellen zunahm. Ob dieser Befund dafür spricht, dass sich TC-Mastzellen aus C-Mastzellen entwickeln, ist noch unklar. Die Tatsache, dass die Expressierung von C- und T-Mastzellen in Abhängigkeit vom verwendeten Medium ("recombinant human c-kit ligand" (rhKL) oder "conditioned medium from a human mastocytosis cell-line" (HBM-M-CM)) reversibel variieren kann, weist darauf hin, dass der Phänotyp der Mastzellen des Menschen in Bezug auf seine Proteasenzusammensetzung nicht fixiert ist, sondern ein dynamisches System darstellt, das durch Zytokine des microenvironments reguliert wird (LI et al., 1996). Unterschiede in der Verteilung der verschiedenen Mastzellsubtypen bei Mensch und Hund könnten demnach schließlich auch dafür sprechen, dass sich die Dauer der Entwicklungs- und Reifephasen der Mastzellsubtypen bei Mensch und Hund unterscheiden oder dass sich die jeweilige Population in einer unterschiedlichen Entwicklungs- und Reifephase befindet oder dass die Zusammensetzung der Zytokine in den untersuchten Geweben bei Mensch und Hund unterschiedlich ist.

ALDENBORG und ENERBÄCK (1994) vertreten die These, dass auch die fehlende Nachweisbarkeit von Chymase in T-Mastzellen eher auf eine funktionelle Aktivität oder ein Stadium der Mastzellreifung zurückzuführen ist und weniger als ein Kriterium für Heterogenität zu interpretieren ist. Zu dieser Ansicht gelangten sie, nachdem sie in der Mukosa des Kolons eine auffällige Variabilität in der Anzahl der T-Mastzellen nachweisen konnten.

Eine strenge Differenzierung in reife Mastzellen = Chymase-haltige Mastzellen und unreife Mastzellen = Mastzellen, die keine Chymase enthalten, scheint es offensichtlich jedoch nicht zu geben. Wie die Untersuchungen von CRAIG et al. (1989) gezeigt haben, können auch unreif erscheinende Mastzellen beide Proteasen enthalten.

2. *Unterschiedliche Enzymaktivität der Mastzellchymase*

Schließlich gäbe es für die interspeziespezifischen Unterschiede im Chymasegehalt der Mastzellen auch noch eine Erklärung, die auch für intraspezifische Unterschiede herangezogen wird: Offensichtlich existieren verschiedene Formen von Chymase, die sich in ihrer Enzymaktivität unterscheiden.

Folgende Untersuchungsergebnisse unterstützen diese Hypothese.

HUNTLEY et al. (1985) haben mit Hilfe von Naphthol AS-D Chlorazetat als Substrat für chymotrypsinähnliche Esterase, Chymase in allen intestinalen Mastzellen des Menschen nachgewiesen. Mastzellen der Mukosa wiesen jedoch eine schwächere Enzymaktivität auf als Mastzellen der Submukosa. IRANI et al. (1987a) vermuteten aufgrund dieser Ergebnisse, dass sich diese beiden enzymhistochemisch zu unterscheidenden Chymasetypen beim Menschen auch immunhistochemisch unterscheiden. Die geringere Enzymaktivität der Chymase in Mastzellen der Darmmukosa könnte mit der geringen Nachweisbarkeit dieser Protease mit Hilfe immunhistochemischer Nachweismethoden im Zusammenhang stehen.

OSMAN et al. (1989), dessen enzymhistochemisch im Darm des Menschen gewonnenen

Ergebnisse mit den immunhistochemisch von IRANI et al. (1986) gewonnenen übereinstimmten, wiesen eine Varianz in der Intensität der Enzymreaktion der Mastzellchymase in den Mastzellen der Submukosa nach.

Die Ergebnisse von HARVIMA et al. (1993) schließlich sprechen dafür, dass Chymase in einer aktiven und in einer inaktiven Form vorliegen kann. Beide Formen sind nach den Untersuchungsergebnissen dieser Untersucherguppe jedoch immunhistochemisch identifizierbar. In Gewebeproben aus unversehrter Haut von Patienten mit Psoriasis konnten HARVIMA et al. (1993) 10% der immunhistochemisch Chymase-positiven Mastzellen enzymhistochemisch nicht erfassen.

Eine Erklärung für diesen Unterschied zwischen immunhistochemisch und enzymhisto-chemisch möglichem Nachweis Chymase-haltiger Mastzellen könnte sein, dass ein Teil der Chymase in den Mastzellen als Proenzyme vorliegen, die wohl mit Chymaseantikörpern, nicht aber mit Substraten für Chymase reagieren (HARVIMA et al., 1990).

Die nur bei der Chymase beobachtete Variabilität könnte auch dafür sprechen, dass die Synthese und der Umsatz von Chymase in den Mastzellgranula variabler ist als bei Tryptase (OSMAN et al., 1989). CAUGHEY (1995) hat zeigen können, dass Chymase im Gegensatz zu Tryptase eine viel weitere Variabilität bezüglich ihrer elektrischen Ladung, Löslichkeit, Proteoglykanbindung, Glykosylierung und katalytischen Effizienz und der Menge, in welcher sie in den Granula exprimiert wird, aufweist.

Diese Variabilität der Chymase erklärt möglicherweise auch die Unterschiede, die sich bei der Verwendung unterschiedlicher Substrate für den Enzymnachweis ergeben. Während HUNTLEY et al. (1985) enzymhistochemisch mit Hilfe von Naphthol AS-D Chlorazetat weit mehr Chymase-positiv Mastzellen nachweisen konnte, als andere Untersucher mit Hilfe immunhistochemischer Methoden, wurden bei Verwendung anderer Substrate für den Nachweis von Chymase in Mastzellen des Darmes (OSMAN et al., 1989) und in isolierten Haut- und Lungenmastzellen (SCHWARTZ et al., 1987a; HARVIMA et al., 1989b) Ergebnisse erzielt, die mit denen von IRANI et al. (1986) immunhistochemisch gewonnenen vergleichbar waren.

Die in der vorliegenden Studie mit Hilfe von Naphthol AS-D Chlorazetat ermittelten Ergebnisse sind auch deshalb nur bedingt mit den Ergebnissen immunhistochemischer Untersuchungen vergleichbar.

Wie auch immer können diese intraspeziesspezifisch angenommenen Unterschiede der Mastzellchymase auch als Erklärung für interspeziesspezifische Unterschiede zwischen der Chymase des Hundes und des Menschen in Betracht gezogen werden. Unbenommen davon bliebe die von CAUGHEY et al. (1988b, 1990 und 1991) gezeigte Ähnlichkeit zwischen der Chymase des Hundes und der des Menschen bezüglich ihrer strukturellen und katalytischen Eigenschaften.

Eine genaue Abgrenzung interspeziesspezifischer von intraspeziesspezifischen Variationen in der Existenz und Nachweisbarkeit von Chymase in Mastzellen ist, wie diese Überlegungen zeigen, nur möglich, wenn gleiche Untersuchungsbedingungen gewährleistet werden können.

5.3 Formalinsensitivität

Wie bei der Ratte (ENERBÄCK, 1966a und b), beim Menschen (STROBEL et al., 1981; BEFUS et al., 1985; RUITENBERG et al., 1982; FLINT et al. 1985; MARSHALL et al., 1987) und wie von anderen Untersuchern auch für den Hund beschrieben (BECKER et al., 1985; SOMMERHOFF et al., 1989b; OSBORNE et al., 1989; TURNER et al., 1989; COLBATZKI et al., 1991), können bei den untersuchten Hunden ein Teil der Mastzellen als formalinsensitiv angesprochen werden.

5.3.1 Ursache der Formalinsensitivität

Als Ursache für die Formalinsensitivität gilt die durch Formaldehyd bedingte Blockierung der anionischen Gruppen der Proteoglykane, wodurch eine Anlagerung kationischer Farbstoffe, wie Alzianblau, Toluidinblau und Methylenblau verhindert wird (ENERBÄCK, 1966a; WINGREN und ENERBÄCK, 1983; ENERBÄCK, 1986).

Histochemische Untersuchungen von WINGREN und ENERBÄCK (1983) weisen darauf hin, dass die Blockierung durch Formaldehyd durch eine Diffusionsbarriere bedingt ist. Dies wiederum spricht dafür, dass die beiden Mastzelltypen in der räumlichen Anordnung zwischen Glykosaminoglykan und Protein innerhalb der Proteoglykane differieren. WINGREN und ENERBÄCK (1983) haben gezeigt, dass die Behandlung von formalinfixierten Gewebeschnitten mit Trypsin oder die verlängerte Färbung dieser Schnitte mit Toluidinblau die Proteoglykane wieder demaskieren kann und so der Sichtbarmachung mit Hilfe metachromatischer Farbstoffe zugänglich macht.

Im Vergleich zu Formalin durchdringen Carnoy´sche Fixationslösung und Bleiazetat das Gewebe schnell und präzipitieren sowohl die Glykosaminoglykane (GAG) als auch die Proteine; der saure pH der Carnoy´schen Lösung erleichtert zudem möglicherweise die ionische Bindung zwischen GAG und basischen, kationischen Farbstoffen (UVNÄS et al., 1970).

5.3.2 Formalinsensitivität und Lokalisation im Gewebe

Im Gegensatz zur Ratte, ist es beim Hund wie beim Menschen nicht möglich, formalinsensitive Mastzellen ausschließlich in mukosalem Gewebe und formalinresistente Mastzellen ausschließlich im Bindegewebe zu lokalisieren.

Im **Dünndarm** des Menschen und der hier untersuchten Hunde können sowohl in der Mukosa als auch in der Submukosa und Muskularis formalinsensitive und formalinresistente Mastzellen nebeneinander vorkommen (RUITENBERG et al., 1982; BEFUS et al., 1985). CRAIG et al. (1986) wiesen in der Mukosa neben den dominierenden formalinsensitiven Mastzellen 25% formalinresistente Mastzellen nach. Bei den hier untersuchten Hunden konnten - mit den Ergebnissen von CRAIG übereinstimmend - in der apikalen Mukosa durchschnittlich 23% formalinresistente Mastzellen nachgewiesen werden. In der Submukosa fanden sich in den entsprechenden Untersuchungen neben den dominierenden formalinresistenten Mastzellen beim Menschen 20%, beim Hund 6% formalinsensitive Mastzellen.

STROBEL et al. (1981) fanden in der jejunalen Mukosa des Menschen etwa 15% formalinresistente Mastzellen. Aufgrund der Astrablau/Safraninfärbung waren alle als "Mukosamastzellen" identifiziert worden (STROBEL et al., 1981).

Zu den Anteilen formalinsensitiver und -resistenter Mastzellen in der **Lunge** des Menschen und des Hundes liegen Ergebnisse, gewonnen aus der Untersuchung von Mastzellen, die per Lungenspülung gewonnen wurden, vor. Neben den zumeist dominierenden formalinsensitiven Mastzellen fanden FLINT et al. (1985) und TAINSH et al. (1991) beim Menschen 7 bzw. 11% formalinresistente Mastzellen. Beim Hund variieren die angegebenen Werte zwischen 0 bzw. 3 % (BECKER et al., 1987 und SOMMERHOFF et al., 1989b) und 50 % (HIRSHMAN et al., 1986). Mit dem Ergebnis von HIRSHMAN et al. (1986) übereinstimmend, fanden sich in der Mukosa der Bronchien der in der vorliegenden Studie untersuchten Lungengewebeproben vom Hund ebenfalls rund 50 % formalinresistente Mastzellen.

Einen wesentlich höheren Anteil formalinresistenter Mastzellen scheint der Hund, verglichen mit dem Menschen, auch im **Uterus** zu haben. Während TAINSH et al. (1991) im gesamten Uterus des Menschen einen prozentualen Anteil von 16 % nachgewiesen hat, waren bei den in der hier vorgelegten Studie untersuchten Hündinnen in fast allen Lokalisationen des Uterus mehr als 50 % der Mastzellen formalinresistent.

Ein wichtiges Beispiel dafür, dass unter den klassischen "Bindegewebsmastzellen" bei Mensch und Hund auch formalinsensitive Mastzellen vorkommen, ist die **Haut**. MARSHALL et al. (1987) wiesen in der Haut des Menschen sogar einen Anteil von 50% nach, MARKEY et al. (1989) - in Abhängigkeit von der verwendeten Färbung - einen Anteil von bis zu 30%. In der Haut des Hundes sind nach den Untersuchungen von BECKER et al. (1985) etwa ein Drittel der Mastzellen formalinsensitiv. Angaben über geringere Anteile formalinsensitiver Mastzellen in der Haut finden sich bei TAINSH et al. (1991) (16 %). Der in der vorliegenden Untersuchung gewonnene durchschnittliche Anteil von maximal 24 % liegt nahezu genau zwischen den beiden letztgenannten Werten.

Die bei den verschiedenen Untersuchern gewonnenen und zum Teil voneinander abweichenden Ergebnisse können auf artspezifische Unterschiede, aber auch auf die unterschiedlichen Fixations- und Färbemethoden, die in diesen Untersuchungen verwendet wurden, zurückgeführt werden. Die Auswirkungen unterschiedlich konzentrierter Formalinlösungen auf die Zahl der darstellbaren Mastzellen haben STROBEL et al. (1981) verdeutlicht.

Verschiedene Untersucher, wie z.B. MARSHALL et al. (1987) und OSBORN et al. (1989) haben zudem festgestellt, dass auch unterschiedliche Färbemethoden trotz gleicher Fixationstechnik, zu sehr verschiedenen Ergebnissen führen können. Weiterhin ist zu bedenken, dass der Anteil der formalinsensitiven Mastzellen nicht innerhalb ein und desselben Schnittes, sondern nur durch den Vergleich zweier unterschiedlich fixierter Gewebeproben bestimmt werden kann, die dementsprechend weit voneinander entfernt lokalisiert sind.

Die vorliegenden Ergebnisse von Untersuchungen beim Menschen und die in der hier vorgestellten Untersuchung gewonnenen Ergebnisse beim Hund zeigen, dass wohl eine Dominanz formalinsensitiver Mastzellen in mukosalem Gewebe und eine Dominanz formalinresistenter Mastzellen im Bindegewebe vorliegt, eine klare Typisierung der Mastzellen bei Mensch und Hund alleine aufgrund der Gewebelokalisation jedoch nicht möglich ist. Eine klare Differenzierung der Mastzellen bei Mensch und Hund mit Hilfe histochemischer Färbungen basierend auf dem Proteoglykangehalt ist vermutlich allein deshalb nicht möglich, weil sich Mensch und Hund in der

Verteilung der in ihren Mastzellgranula vorhandenen Proteoglykane von der Ratte unterscheiden. CRAIG et al. (1993) konnten in allen von ihnen untersuchten Mastzellen aus der Haut, den Alveolarwänden und der Darmmukosa des Menschen Heparin nachweisen. Untersuchungen von FORSBERG et al. (1988) an isolierten Tumormastzellen des Hundes sprechen für ein simultanes Vorkommen von Heparin und mehrfach sulfatiertem Chondroitinsulphat in Mastzellen des Hundes.

Ob Unterschiede in der Reaktion auf verschiedene Fixierungen und Färbungen wirklich unterschiedliche Mastzellsubpopulationen repräsentieren oder eher Mastzellen in verschiedenen Phasen ihrer Entwicklung widerspiegeln oder durch eine Verbindung dieser beiden Aspekte zu erklären sind, ist noch immer ungeklärt. Faktoren des Microenvironments (KITAMURA et al., 1986 und 1987; LEVI-SCHAFFER et al., 1986), möglicherweise auch Veränderungen im Immunsystem (MARSHALL et al., 1987) haben Einfluß auf die Differenzierung der Mastzellen, so dass heterogene Mastzellpopulationen auch Mastzellen in verschiedenen Stadien ihrer Differenzierung reflektieren können (MARSHALL et al., 1987).

5.3.3 Formalinsensitivität der Mastzellsubtypen

Bezüglich der Formalinsensitivität der Mastzellsubtypen gibt es drei verschiedene Sichtweisen und Aspekte zu betrachten:

1. Die Abnahme der Nachweisbarkeit der Proteasen nach Formalinfixierung selbst,
2. die Übereinstimmung des Anteiles formalinsensitiver Mastzellen (in den mit Methylenblau gefärbten Schnitten) mit dem Anteil der T- oder/und TC- oder/und C-Mastzellen und
3. die Möglichkeit der Zuordnung von T-, TC- und C-Mastzellen zu bestimmten Gewebelokalisationen bzw. ihre Zuordnung zu Mukosa- oder Bindegewebsmastzellen.

5.3.4 Formalinsensitivität der Mastzellproteasen

Bei den hier untersuchten Hunden gibt es in fast allen Lokalisationen des Magens und Duodenums unter allen **drei Mastzellsubtypen formalinsensitive** Mastzellen. In der Lunge, im Lymphknoten und im Uterus finden sie sich vor allem bzw. ausschließlich unter den Chymase-haltigen Mastzellen und in der Haut nur unter den T- und C-Mastzellen.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung von Mastzellen fanden IRANI et al. (1986) in mit Carnoy fixierten Geweben der Haut, des Dünndarms und der Lunge sowohl T- als auch TC-Mastzellen in größerer Dichte als in den in Formalin fixierten Geweben. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei den T-Mastzellen. Auch die Untersuchungen von CRAIG et al. (1986) zeigten, dass in der Lunge und im Dünndarm des Menschen mehr Tryptase-positive Mastzellen nachgewiesen werden können, wenn die Gewebe in Carnoy fixiert sind. Ob es sich dabei vornehmlich um T- oder TC-Mastzellen handelte, ist aufgrund der verwendeten Nachweismethode nicht zu entscheiden. Bei den in der vorgestellten Studie untersuchten Hunden dagegen nimmt im Duodenum und in der Lunge die Dichte der Chymase-positiven Mastzellen (TC- und C-Mastzellen) auffallend zu. Dieses Ergebnis entspricht den Erkenntnissen von ALDENBORG und ENERBÄCK (1994), die von einer hohen Empfindlichkeit der Mastzell-Chymase gegenüber einer Maskierung durch hochkonzentrierte Aldehydlösungen berichten.

Auch SOMMERHOFF et al. (1989b) und OSBORNE et al. (1989) konnten beim Nachweis der Chlorazetatesterase-Aktivität in aus Lungenspülproben von Hunden gewonnenen Mastzellen mehr Chymase-positive nachweisen, wenn sie zur Fixation Mota's Bleiazetat anstelle von Formalin verwendeten.

In der Haut des Menschen fanden CRAIG et al. (1986) keinen signifikanten Unterschied in der Konzentration der Tryptase-haltigen Mastzellen in Abhängigkeit von der gewählten Fixierung. Dieses Ergebnis stimmt mit den beim Hund gewonnenen Ergebnissen überein. In der Haut des Hundes scheint das Fixierungsmittel zudem auch auf die Dichte der Chymase-haltigen Mastzellen keinen signifikanten Einfluß zu haben. BECKER et al. (1985) wiesen enzymhistochemisch unabhängig von der Fixierung in der Haut des Hundes etwa gleich viele Chymase-haltige Mastzellen nach (etwa 2100 Chymase-haltige Mz/mm³). Entsprechend ist bei den Hunden der hier vorgestellten Studie die Anzahl der nachgewiesenen Chymase-positiven Mastzellen in der Dermis unabhängig von der gewählten Fixierung. Nach Formalinfixierung konnten rund 2100 Chymase-haltige Mz/mm³ (~ 29 Chymase-haltige Mz/mm²), nach Carnoy-Fixierung rund 2200 Chymase-haltige Mz/mm³ (~ 30 Chymase-haltige Mz/mm²) nachgewiesen werden. Nur in zwei Hautlokalisationen (periadnexal und perikapillär in der Dermis) fanden sich auffallend mehr T- und C-Mastzellen, wenn zur Fixierung Carnoy verwendet wurde (Tabelle 29.3 (Seite 151)).

Insgesamt sprechen die bisherigen Untersuchungen dafür, dass die Immunreaktivität von Chymase und Tryptase geringer ist, wenn das Gewebe in Formalin fixiert ist (IRANI et al., 1987a; CAUGHEY et al., 1988c; CRAIG et al., 1986; SCHECHTER et al., 1986).

Da sich aldehydhaltige Fixationslösungen v.a. auf die räumliche Struktur der Proteine auswirken, ist eine durch sie bedingte erschwerte Zugänglichkeit für Antikörper und Substratmoleküle als Ursache für die geringere Darstellbarkeit der Proteasen in formalinfixiertem Gewebe wahrscheinlich. Schon von HED und ENESTRÖM (1981) und BATTIFORA und KOPINSKI (1986) wurde gezeigt, dass es bei der Verwendung von Formalin als Fixationsmittel zu Quervernetzungen zwischen dem Aldehydanteil und der spezifischen Antigenstruktur kommen kann, wodurch die immunhistochemische Darstellung der Mastzellen verhindert werden kann. Die vorliegende Untersuchung an den 13 Hunden hat gezeigt, dass bei diesem Phänomen - der sogenannten Antigenmaskierung - offenbar auch die Struktur des Gewebes von Bedeutung ist. In bindegewebsfaserreichen Organen und Geweben, wie z.B. in der Haut, der Lymphknotenkapsel und -trabekel, sowie in der Submukosa des Duodenums ist der Anteil formalinsensitiver Mastzellen geringer, als z.B. im lockeren Gewebe des Gastrointestinaltraktes. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür wäre, dass Organe und Gewebelokalisationen mit einer lockeren Struktur schneller und intensiver mit Formalin getränkt werden, als Organe und Gewebelokalisationen mit strafferer Gewebestruktur und damit eventuell weniger schonend fixiert werden. Bedingt entspricht diese Verteilung der Verteilung formalinsensitiver Mukosamastzellen und formalinresistenter Bindegewebsmastzellen der Ratte. Bei der Betrachtung des Aspektes der Antigenmaskierung durch die Vernetzung der Aldehydgruppe mit den Proteinen ist zu beachten, dass in der vorgestellten Studie zur Demaskierung der Proteine eine Verdauung mit proteolytischer Pronase eingesetzt worden ist (BATTIFORA und KOPINSKI, 1986; HED und ENESTRÖM, 1981). Die Demaskierung ist in der Abfolge des enzym-immunhistochemischen Proteasennachweises wohl vor der Immunreaktion, aber erst nach der Enzymfärbung erfolgt. Damit könnte die - im Vergleich zu der seltener beobachteten Abnahme des Tryptasennachweises - deutliche Abnahme des Chymasennachweises nach Formalinfixierung auf die

nicht erfolgte Demaskierung zurückgeführt werden. Um Hautanhänge und Gefäße in der Dermis sowie in der basalen Mukosa, im Stratum subglandulare und in der zirkulären Muskelschicht des Magens ist bei den hier untersuchten Hunden jedoch auch die Dichte der T-Mastzellen auffallend höher, wenn Carnoy als Fixans verwendet wird. Möglicherweise spricht dies für eine nur unvollständig erfolgte Demaskierung.

Andererseits spricht die Tatsache, dass überhaupt ein - wenn auch verringerter - Nachweis beider Proteasen in den mit Formalin fixierten Geweben möglich ist, für eine nicht alle Mastzellen und Mastzellproteasen gleichermaßen treffende Maskierung durch Formaldehyd. Möglicherweise bestehen zwischen den Proteasen in verschiedenen Mastzellen Unterschiede (struktureller oder funktioneller Art), die zu einer unterschiedlichen Formalinsensitivität führen. Ebenso ist es denkbar, dass Unterschiede in der Proteoglykankomposition innerhalb verschiedener Mastzellen einer Gewebelokalisation bestehen und durch ihre Beziehung zu den Mastzellproteasen die unterschiedliche Formalinsensitivität bedingen. Untersuchungen von FORSBERG et al. (1988) an Mastzelltumor-Zelllinien vom Hund, haben gezeigt, dass in Mastzellen des Hundes Heparin und mehrfach sulfatiertes Chondroitinsulphat in unterschiedlichen Anteilen nebeneinander vorkommen können.

5.4. Betrachtung verschiedener Heterogenitätskriterien

5.4.1 Mastzellsubtyp und Formalinsensitivität

Für die Klärung der Frage, ob die Proteasenzusammensetzung in den Mastzellgranula einen Einfluß auf die Formalinsensitivität bei der Anwendung metachromatischer Farbstoffe hat, liefern die folgenden Untersuchungsergebnisse wichtige und interessante Hinweise.

SCHWARTZ (1985), SCHWARTZ et al. (1985a) und CRAIG et al. (1985) haben gezeigt, dass Tryptase als spezifischer Marker für alle Mastzellen in Dünndarm, Lunge und Haut sowohl in formalinsensitiven als auch in formalinresistenten Mastzellen vorkommt. Daraus läßt sich schließen, dass der Besitz von Tryptase keinen Einfluß auf die Formalinsensitivität der Mastzellen bei metachromatischen Färbungen hat.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sowie die von BECKER et al. (1985) und COLBATZKI et al. (1991) haben gezeigt, dass auch Chymase sowohl in formalinresistenten als auch in formalinsensitiven Mastzellen nachweisbar ist. Somit gibt es auch unter den TC- und C-Mastzellen sowohl formalinresistente als auch formalinsensitive Zellen.

Eine wichtige Entdeckung gelang in diesem Zusammenhang ALDENBORG und ENERBÄCK (1994). Sie fanden heraus, dass gerade in Geweben mit einem hohen Anteil an Chymase-negativen T-Mastzellen auch der Anteil aldehyd-sensitiver Mastzellen hoch ist. Daraus schlossen sie, dass die Abwesenheit der Chymase die Proteine der Mastzellgranula gegenüber einer Bindung (cross linking) von Aldehyden, die wiederum die Bindung des metachromatischen Farbstoffes blockiert, empfindlicher macht.

Die bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Hunden gewonnenen Ergebnisse unterstützen z.T. die Beobachtungen von ALDENBORG und ENERBÄCK (1994). Ein hoher Anteil aldehyd-sensitiver Mastzellen (50 % und mehr) kommt z.B. im Magen und im Duodenum in den muskulären Schichten kombiniert mit einer Dominanz der T-Mastzellen (nach Carnoy-Fixierung) vor (Tabelle 24.2 und 25.2 (S 135 und 138)). In der Lunge der untersuchten Hunde sind allgemein nur wenig formalinsensitive Mastzellen zu finden. Die höchsten Anteile finden sich in der Mukosa, in der hauptsächlich T-Mastzellen vorkommen (Tabelle 26.2 Seite 141). In den übrigen Lokalisationen finden sich weniger formalinsensitive Mastzellen und weniger T-Mastzellen. Auch im Uterus und in der Haut, wo die Chymase-haltigen Mastzellen dominieren, gibt es weniger formalinsensitive Mastzellen als im Magen-Darm-Trakt (Tabelle 27.2 und 29.2 Seite 144 und 150).

Andererseits gibt es bei den untersuchten Hunden auch Gewebelokalisationen, in denen ein hoher Anteil aldehyd-sensitiver Mastzellen (50 % und mehr) kombiniert mit einer Dominanz der TC-Mastzellen vorkommt. So z.B. im Magen und im Duodenum in der Lamina propria mucosae (Tabelle 24.2 und 25.2 (Seite 135 und 138)). Im Lymphknoten ist keine einheitliche Beziehung zwischen dem Anteil formalinsensitiver Mastzellen und dem Anteil eines Mastzellsubtyps zu erkennen (Tabelle 28.2 (Seite 177)).

5.4.2 Mastzellsubtyp und Lokalisation der Mastzellen im Gewebe

Nach den Untersuchungen von IRANI et al. (1986) korrespondiert die T-Mastzelle des Menschen mit der Mukosamastzelle der Ratte, so wie die TC-Mastzelle mit der Bindegewebsmastzelle der Ratte

vergleichbar ist, da die jeweiligen Mastzelltypen in dergleichen Lokalisationen vorkommen: T-Mastzellen und Mukosamastzellen in der Mukosa des Dünndarms und der Lunge, TC-Mastzellen und Bindegewebsmastzellen in der Submukosa des Dünndarms und in der Haut. Enzymhistochemische Untersuchungen des Darmtraktes des Menschen haben Chymase ebenfalls nur selten in Mukosamastzellen, häufiger dagegen in submukosalen Mastzellen nachweisen können (OSMAN et al., 1989).

So wie formalinsensitive und formalinresistente Mastzellen kommen jedoch auch T- und TC-Mastzellen beim Menschen in den meisten Gewebelokalisationen nebeneinander vor, so dass eine Differenzierung der Mastzellsubtypen des Menschen allein aufgrund der Lokalisation im Gewebe nicht möglich ist (IRANI und SCHWARTZ, 1989). Auch bei den hier untersuchten Hunden kommen alle drei Mastzellsubtypen nahezu in allen untersuchten Gewebelokalisationen nebeneinander vor. Deutlich voneinander abweichende Literaturangaben finden sich zudem zu der Verteilung von Chymase-haltigen Mastzellen in der Mukosa des Darmes. Während IRANI et al. (1986 und 1989a) in der Darmmukosa vornehmlich T-Mastzellen fanden, fanden sich in den von ALDENBORG und ENERBÄCK (1994) untersuchten Proben vom Darm des Menschen und bei den hier untersuchten Hunden ein hoher Anteil an TC-Mastzellen in der normalen intestinalen Mukosa. Nach den Untersuchungen von HUNTLEY et al. (1985) enthalten sogar alle Mukosamastzellen des Gastro-Intestinal-Traktes bei Mensch, Ratte, Maus und Schaf Chymase. Wie in der vorliegenden Untersuchung der Mastzellen des Hundes verwendeten HUNTLEY et al. (1985) Naphtol AS-D Chlorazetat als Substrat zur enzymhistochemischen Darstellung der chymotrypsinähnlichen Esterase (= Chymase) und wiesen damit vergleichbar viele Mastzellen nach wie mit Toluidinblau.

Ein weiteres Kriterium, dass für eine Beziehung zwischen T-Mastzellen und Mukosamastzellen angeführt wird, ist (neben der Beziehung mit dem Anteil formalinsensitiver Mastzellen und der vergleichbaren Lokalisation) die T-Lymphozyten-Abhängigkeit. IRANI et al. (1987a) wiesen nach, dass bei Patienten, die einen T-Lymphozyten-Mangel aufweisen, gerade die Anzahl der T-Mastzellen verringert ist.

Einen Hinweis für eine auch bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Hunden bestehende T-Lymphozyten-Abhängigkeit der T-Mastzellen gibt die Verteilung der Mastzellsubtypen im Lymphknoten nach der Formalinfixierung. Während in den Sinusräumen die TC-Mastzellen dominieren, finden sich in Cortex, Paracortex und Mark vornehmlich T-Mastzellen. In den in Carnoy fixierten Gewebeproben ist diese Differenzierung jedoch aufgrund einer Verschiebung der Anteile zugunsten der Chymase-haltigen Mastzellen nicht mehr so deutlich. Lediglich im Cortex ist noch eine Dominanz formalinsensitiver und nur Tryptase-positiver Mastzellen gegeben.

Wie schon im Kapitel Heterogenität der Mastzellen des Menschen ausgeführt, ist die Verwendung der Einteilung "Mukosamastzelle" und "Bindegewebsmastzelle" beim Menschen umstritten (MARSHALL und BIENENSTOCK, 1990). Die bei den untersuchten Hunden gewonnenen Ergebnisse erlauben ebenfalls keine eindeutige Zuordnung eines Mastzellsubtyps in die Kategorie "formalinresistente Mastzelle" und "formalinsensitive Mastzelle" oder gar "Mukosamastzelle" und "Bindegewebsmastzelle". Vergleichbar mit den Ergebnissen von ALDENBORG und ENERBÄCK (1994) ist die Tendenz der besseren Nachweisbarkeit der Chymaseaktivität in den in Carnoy fixierten Geweben der untersuchten Hunde. Es gibt aber auch Lokalisationen, wo alle drei Mastzellsubtypen nach Fixierung in Carnoy häufiger nachzuweisen sind.

5.5 Vergleich der beiden Mastzellmarkierungsmethoden

ALDENBORG & ENERBÄCK (1994) konnten mit Hilfe der immunhistochemischen Darstellung der Proteasen in der Mukosa des Intestinums mehr Mastzellen nachweisen als durch Darstellung der Proteoglykane mit Hilfe von Toluidinblau. In der Submukosa dagegen fanden sie keinen Unterschied in der Mastzellendichte in Abhängigkeit von der Färbemethode. Sie erklärten diese unterschiedlichen Ergebnisse mit der kürzeren Lebensdauer von Mukosamastzellen (ENERBÄCK und LÖWHAGEN, 1979) im Vergleich zu der von Bindegewebsmastzellen (BLENKINSOPP, 1967). Höhere Proliferationsraten in der Mukosa bedingen eine höhere Präsenz unreifer, junger Mastzellen. Für Mastzelltumoren des Hundes konnte RUDOLPH (1971) zeigen, dass die mit Methylenblau darstellbaren Proteoglykane erst zu einem späten Zeitpunkt der Mastzellreifung nachweisbar sind. Die Ergebnisse von ENERBÄCK und ALDENBORG sprechen daher dafür, dass Mastzellproteasen zu einem früheren Zeitpunkt als Mastzellproteoglykane nachweisbar sind.

Bei den in der vorgestellten Studie untersuchten Hunde fand sich dagegen im gesamten Duodenum kein auffallender Unterschied in der Dichte der nachweisbaren Mastzellen in Abhängigkeit von der gewählten Färbemethode. Dies könnte mit einer zeitlich nicht so deutlich unterscheidbaren Reifung der Mastzellinhaltsstoffe in den Mastzellen der Darmmukosa des Hundes zusammenhängen oder für einen Ausgleich der metachromatisch noch nicht darstellbaren jungen Mukosamastzellen durch eine Gruppe von Mastzellen, die mit Hilfe des enzym-immunhistochemischen Proteasennachweises nicht erfaßt wird, erklärt werden. Für die Existenz eines solchen weiteren Mastzelltyps beim Hund sprechen die in den anderen Organen festgestellten Ergebnisse.

Im Gegensatz zu ALDENBORG und ENERBÄCK (1994) konnten bei den in der vorgestellten Studie untersuchten Hunden in den meisten Gewebelokalisationen des Magens, des Duodenums, der Lunge, des Uterus und in der Kapsel und den Trabekeln des Lymphknotens sogar mehr Mastzellen mit der Methylenblaufärbung nachgewiesen werden als mit dem enzym-immunhistochemischen Proteasennachweis.

Gleiche Verhältnisse wurden für den Uterus des Pferdes (WELLE et al., 1997a) und den Uterus des Rindes (KÜTHER et al., 1998) beschrieben. Möglicherweise sprechen diese Ergebnisse für die Existenz eines vierten Mastzelltyps, der weder Tryptase noch Chymase enthält und deshalb mit Hilfe des hier verwendeten enzym-immunhistochemischen Nachweises nicht erfaßt wird.

5.6 Schlußbetrachtung

Aufgrund der in der vorgestellten Untersuchung gewonnenen Ergebnisse lassen sich folgende Empfehlungen für weitere wissenschaftliche Arbeiten ableiten:

1. Um Aussagen über speziesspezifische Unterschiede und über die Beteiligung von Mastzellen im allgemeinen und Mastzellsubtypen im speziellen bei pathologischen Prozessen treffen zu können, ist die Anwendung einheitlicher Nachweis- und Auswertungsmethoden unerlässlich. Daten, die mit unterschiedlichen Nachweismethoden gewonnen werden, sind nur bedingt miteinander vergleichbar, da Unterschiede in der Mastzellendichte und in der Verteilung der Mastzellsubtypen bei Hund und Mensch in verschiedenen Gewebelokalisationen und in Abhängigkeit von der gewählten Fixierungs- und Färbetechnik zu finden sind.

2. Die Typisierung der Mastzellen des Hundes aufgrund des Proteasengehaltes ist wie beim Menschen das zur Zeit geeignetste Heterogenitätskriterium. Bei verschiedenen Erkrankungen des Menschen und des Hundes konnte die Beteiligung der Mastzellsubtypen schon gezeigt werden (IRANI et al., 1987b, 1989b, 1990a und 1990b, 1992b; HARVIMA et al., 1989a und 1990; SCHWARTZ et al., 1987b; WELLE et al., 1997b und 1997c). Das zunehmende Wissen über die funktionelle Bedeutung der beiden wichtigen Mastzellproteasen Tryptase und Chymase kann unter diesem Aspekt zur Klärung der Pathogenese beitragen.

Mit der hier vorgestellten Untersuchung wird eine Kombination zweier histochemischer Reaktionen vorgestellt und geprüft, mit der der Nachweis dieser beiden Mastzellproteasen innerhalb ein und derselben Mastzelle und damit die Identifizierung der an den verschiedensten pathologischen Prozessen beteiligten Mastzellsubtypen möglich ist. Die in der vorliegenden Studie vorgestellten Ergebnisse können näherungsweise als Referenzwerte für die Mastzellichte und die Verteilung der Mastzellsubtypen in verschiedenen Gewebelokalisationen bei verschiedenen Fixations- und Färbebedingungen beim Hund dienen. Damit wird schließlich die Interpretation der bei pathologischen Prozessen erhobenen Befunde gefördert.