

2. Literaturübersicht

2.1. Aufbau der Mamma des Hundes

2.1.1 Anatomie

Die Milchdrüse befindet sich bilateral symmetrisch an der ventralen Bauchwand und wird zum thorakoinguinalen Typ gezählt. Die Anzahl der Mammarkomplexe kann auf beiden Seiten variieren, beträgt jedoch im Mittel beidseits fünf (BERG, 1988; BUDRAS, 1987; HABERMEHL, 1984; LOEFFLER, 1983; MICHEL, 1994; ZIETSCHMANN, 1985): jeweils zwei in der Brustregion, zwei in der Bauchregion sowie einer in der Leistengegend (MICHEL, 1994; ZIETSCHMANN, 1985). BERG (1988) und BUDRAS (1987) bezeichnen sie entsprechend ihrer Lokalisation als thorakal kranial und thorakal kaudal, abdominal kranial und abdominal kaudal sowie inguinal.

Die Strichkanalöffnungen können, außer bei kleinen Hunderassen, mit bloßem Auge erkannt werden. Ihre Anzahl schwankt je nach Größe der Zitze und wird mit 6-20 (HABERMEHL, 1984), 8-20 (BERG, 1988; MICHEL, 1994; ZIETSCHMANN, 1985) bzw. 16-20 (BUDRAS, 1987) angegeben.

2.1.2. Histologie

Das Parenchym der Mamma besteht aus Drüsenepithelien und Stroma (CALHOUN und STINSON, 1981). Die Grundlage des Drüsenläppchens bildet die Endaufzweigung eines Milchganges mit den zugeordneten Drüsenendstücken, die aufgrund ihres weiten Lumens als Drüsenalveolen bezeichnet werden. Unter Vermittlung einer Basallamina steht das Drüsenepithel mit dem interalveolären Bindegewebe in Verbindung. Es bindet einerseits die Drüsenalveolen in die Einheit Drüsenläppchen ein und wird gleichzeitig den Wandbestandteilen der Drüsenalveolen zugeordnet.

Als Drüse ektodermaler Herkunft verfügt die Milchdrüse schließlich über kontraktile Zellen in Form von Myoepithelzellen, die sich als zwischen Drüsenepithel und Basallamina integrierte Wandbestandteile der Drüsenalveolen darstellen. An dieses Alveolensystem schließen sich, zuerst noch intralobulär lokalisierte, englumige, im weiteren Gangverlauf in mittelgroße und große übergehende, interlobulär gelegene Milchgänge an, die unmittelbar in der Zitzenkuppe ausmünden (SMOLLICH, 1992).

2.2. Tumoren des Mammagewebes beim Hund

2.2.1. Ätiologie

Die Ursachen für eine neoplastische Entartung der Mamma des Hundes werden in der Literatur kontrovers diskutiert. FERGUSON (1985) postuliert, daß von einem multifaktoriellen Geschehen auszugehen ist. Neben hormonellen Einflüssen werden Ernährung, Umwelteinflüsse, immunologische Faktoren und bei reinrassigen Hündinnen auch eine genetische Prädisposition als mögliche Ursachen angesehen (GUTBERLET et al., 1998).

Das ab dem fünften Lebensjahr zunehmende unkontrollierte Wachstum des Mammagewebes wird als Folge der der Hündin eigenen Zyklizität angesehen, die oftmals zu einer abnormen Lactatio sine graviditate führt (BOSTEDT und TAMMER, 1995).

Nach ÜBERREITER (1968b) wird die Tumorbildung in der Mamma durch Scheinträchtigkeiten gefördert und durch Trächtigkeiten gehemmt. Während der Scheinträchtigkeit beginnen oft ruhende Knoten zu wachsen und entarten maligne. Am seltensten sind Mammatumoren bei Hündinnen, die nie scheinträchtig waren oder öfter geboren haben (ÜBERREITER, 1968b). Diese Aussagen werden durch MORRIS et al. (1998) relativiert, die in ihrer Studie herausfanden, daß die Gruppe der Hündinnen, die postoperativ an einem neuen Mammatumor erkrankten, die gleiche Inzidenz an Scheinträchtigkeiten aufwiesen, wie die Gruppe der Tiere, die keinen weiteren Mammatumor entwickelten. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß Scheinträchtigkeiten keinen Effekt auf die Entwicklung caniner Mammatumoren haben (MORRIS et al., 1998).

SCHNEIDER et al. (1969) fanden heraus, daß das Risiko an Mammatumoren zu erkranken bei einer Kastration vor dem ersten Zyklus bei 0-0,5%, nach dem ersten Zyklus bei 8,0% und nach dem zweiten Zyklus bei 26,0% liegt. Dieser Einfluß geht jedoch verloren, wenn die Kastration nach dem vierten Zyklus durchgeführt wird (SCHNEIDER et al., 1969; BOSTOCK, 1986).

Die Ergebnisse einer Untersuchung von YAMAGAMI et al. (1996) weisen daraufhin, daß eine Ovariectomie zum Zeitpunkt der Mastektomie keinen Effekt auf die Prognose hat. MORRIS et al. (1998) bestätigen dies in ihrer Studie, in der weitere Beweise erbracht werden, daß die Entwicklung von Mammatumoren bei der Hündin ein in frühester Jugend programmiertes Ereignis darstellt, welches nicht mehr durch Entfernen der hormonellen Stimulation im ausgewachsenen Tier beeinflusst werden kann.

Sie betonen, daß spätere hormonelle Intervention keine effektive Behandlungsmethode ist (MORRIS et al., 1998).

Aber auch eine Virusgenese wird diskutiert (OWEN, 1979; NERURKAR, 1989; MOULTON, 1990). BOSTOCK (1986) erwähnt, daß der Einfluß von Viren und chemischen Karzinogenen noch nicht ergründet ist.

2.2.2. Prognose und Verlauf

Das Alter des Auftretens, der Sitz des Tumors, die Beteiligung des Lymphknotens sowie der Differenzierungsgrad sind erwiesene prognostische Variablen, um die Überlebenszeit vorherzusagen (PEREZ et al., 1997). Unterschiedliche Klassifikationsschemata haben jedoch seit Jahrzehnten zu voneinander abweichenden Angaben zum prozentualen Anteil benigner, prognosegünstiger Neoplasien geführt. Inzidenzen variieren erheblich von 7,63% (GUTBERLET, 1994), über 24,4% (SIMON et al., 1996), 26,3% (DAHME und WEISS, 1958) und 30% (HELLMEN et al., 1993), bis zu 58,76% (VON SANDERSLEBEN, 1959), 64% (MORRIS et al., 1998), 70% (BOSTOCK, 1986) und sogar 72% (KÄLIN et al., 1985). MORRIS et al. (1998) weisen daraufhin, daß die Ergebnisse ihrer Studie wahrscheinlich repräsentativ sind, weil alle Gesäugeveränderungen, die in diesem Zeitraum in lokalen Tierarztpraxen exzidiert wurden, auch untersucht wurden. Sie begründen die scheinbar höhere Inzidenz maligner Tumoren in Studien, die unter Laborbedingungen stattfinden damit, daß hier meist die Tendenz besteht, kleine oder scheinbar benigne Läsionen nicht der histopathologischen Untersuchung zuzuführen (MORRIS et al., 1998).

SCHNEIDER et al. (1969) errechneten für Hündinnen, die infolge metastasierender Mammatumoren gestorben waren, eine durchschnittliche Überlebenszeit von dreieinhalb Monaten nach der Operation und zeigten weiter, daß die Kurve der Überlebensrate von Hündinnen mit malignen Tumoren nur im ersten Jahr post operationem steiler abfiel und später mit derjenigen von Kontrolltieren nahezu parallel verlief.

MISDORP (1972) beschreibt, daß zwei Drittel der Hunde mit Mammatumoren einen Zeitraum von vier Monaten nach der operativen Entfernung nicht überlebten.

Ähnliche Zahlen sind auch von OWEN (1966) angegeben, der bei den meisten Karzinomformen eine durchschnittliche Überlebenszeit von neun Monaten nach Tumorentfernung, bei eher undifferenzierten Tumoren von nur drei Monaten, feststellte. Derselben Meinung ist BOSTOCK (1975), der die Beobachtung machte, daß die meisten Tumoren mit infauster Prognose innerhalb eines Jahres nach der chirurgischen Entfernung zum Tode des Tieres führen.

Er weist darauf hin, daß eine Auswertung der Ergebnisse, z.B. einer post operativen Immunotherapie, viel früher möglich ist, als bei einer klinischen Studie am Menschen, in der Beobachtungszeiträume von fünf Jahren allgemein üblich sind (BOSTOCK, 1975).

Laut VON SANDERSLEBEN (1959) beträgt die Zeitspanne zwischen erster und zweiter Operation bei gutartigen Rezidiven, wobei der Begriff Rezidiv nach eigener Aussage in diesem Zusammenhang nicht ganz exakt ist, im Mittel 13 Monate, bei den bösartigen im Mittel 3 bis 6 Monate. Er weist darauf hin, daß die Zeitspanne zwischen erster Beobachtung des Tumors und Tod bzw. Tötung infolge Metastasen in der Mehrzahl der Fälle unter einem Jahr lag. Er folgert daraus, daß maligne Blastome der Mamma des Hundes zwar vorwiegend erst in höherem Lebensalter auftreten, daß aber dann Rezidivbildung und Metastasierung relativ schnell erfolgen, meist innerhalb des ersten Jahres.

Zur Bemessung der Länge des Beobachtungszeitraumes ist zu berücksichtigen, daß die mittlere Lebenserwartung der Hunde bei 10-12 Jahren (WIESNER, 1991), die des Menschen bei 75-77 Jahren (PSCHYREMBEL, 1990) liegt, d.h. die von WEISS und KARBE (1990) beschriebene, für den Menschen geltende „Fünfjahresgrenze“ (Fünfjahresüberlebensrate oder Fünfjahrestumor- und -rezidivfreiheit) ist auf den Hund nicht direkt übertragbar, da nur die wenigsten Hunde natürlicherweise 15-17 Jahre alt werden. Daher ist es notwendig, ein Auswertungsschema, in dem die Hundejahre den Menschenjahren entsprechend gegenübergestellt werden, zu Hilfe zu nehmen. Zur Umrechnung des Hundalters auf Altersklassen des Menschen wird nach wie vor in der Literatur das Schema von LEBEAU (1958) herangezogen, aus dem hervorgeht, daß das erste Hundejahr 15 Menschenjahren und das zweite Hundejahr 9 Menschenjahren entspricht. Ab dem zweiten Lebensjahr des Hundes zählt jedes Jahr 4 Menschenjahre (Tabelle 1).

Tabelle 1: Altersäquivalente Mensch und Hund (LEBEAU, 1958)

Menschenalter (Jahre)	entsprechendes Hundalter (Jahre/Monate)
<15	<1/0
15-24	1/0-2/2
25-34	2/3-4/8
35-44	4/9-7/2
45-54	7/3-9/8
55-64	9/9-12/2
65-74	12/3-14/8
75-84	14/9-17/2
>84	>17/2

2.2.3. Onkologische Komparatistik

2.2.3.1. Einleitung

Da Hunde die gleichen Umweltbedingungen mit dem Menschen teilen, ist es für eine onkologische Komparatistik epidemiologisch bedeutsam, genaue Daten über das Vorkommen und Verhalten von spontanen Neoplasien bei Tieren zur Verfügung zu haben (THRUSFIELD, 1988). Nach RUTTEN et al. (1990) zieht das natürliche Vorkommen von Krebs in domestizierten Tieren eine viel engere Parallele zum Krebs des Menschen als experimentell induzierter Krebs in Labortieren. Mammatumoren gehören zu den häufigsten Neoplasien der Frau und der Hündin (WALTER und SCHWEGLER, 1992). ALBERT et al. (1994) postulieren in ihrer Studie, daß die Krebssterblichkeit bei Hunden und Menschen in engem Zusammenhang mit dem Lebensalter steht. Sie weisen aber auch auf die Möglichkeit hin, daß der Alterungsprozess selbst ein Grund oder eine Art Promoter für Krebserkrankungen sein kann (ALBERT et al., 1994).

Auffällig ist, daß Mammatumoren, sowohl bei der Frau als auch bei der Hündin, bevorzugt in der zweiten Lebenshälfte auftreten. So gibt SCHNEIDER (1970) an, daß in seinem Untersuchungsgut das Durchschnittsalter der an Brustkrebs erkrankten Personen bei 58 Jahren, das der an Gesäugetumoren erkrankten Hunde bei 10 Jahren und 6 Monaten lag. Das Risiko, einen Mammatumor zu entwickeln, nimmt ab dem 6. Lebensjahr bei der Hündin und dem 40. Lebensjahr der Frau stetig zu (MOULTON, 1990). Diese Speziesgrenzen überschreitende Übereinstimmung läßt eine Tendenz vermuten, so daß sich spontane Neoplasien beim Hund unter Umständen als Modell für onkologische Fragestellungen beim Menschen empfehlen (WALTER und SCHWEGLER, 1992).

VON SANDERSLEBEN (1968) stellte fest, daß nur bei enger Zusammenarbeit zwischen Kliniker und Pathologen weitere Erkenntnisse für die Prognosestellung bei diesen so häufig vorkommenden Tumoren zu erwarten sind. Diese Meinung wird auch von MISDORP und HART (1979a) geteilt, die zum Ausdruck bringen, daß zwar auch bei retrospektiven, aber in erster Linie bei prospektiven Verlaufsstudien prognostische Faktoren ausgewertet werden können, für die eine intensive Kooperation zwischen Kliniker und Pathologen erforderlich ist.

MISDORP und HART (1976) sowie FRESE (1985) haben herausgefunden, daß zwischen den Neoplasien der Mamma des Hundes und denjenigen der Brustdrüse der Frau eine Reihe von Gemeinsamkeiten besteht. Sie betreffen Aspekte der Epidemiologie, der hormonellen Abhängigkeit, der Morphologie und vor allem des biologischen Verhaltens maligner Tumoren (FRESE, 1985).

Es deutet sich an, daß auch in der Milchdrüse des Hundes präkanzeröse Veränderungen vorkommen, die denen beim Menschen ähneln. Es kann deshalb angenommen werden, daß aus einer detaillierten Erforschung der Mammatumoren- und -dysplasien des Hundes nicht nur veterinärmedizinisch relevante, sondern auch komparative, für das Verständnis neoplastischer Erkrankungen der Brustdrüse der Frau wichtige Erkenntnisse, gewonnen werden können. Darüber hinaus bieten sich die Mammatumoren dieser Tierarten wegen ihres häufigen Vorkommens und wegen ihrer leichten diagnostischen und therapeutischen Zugänglichkeit für die Erprobung neuer therapeutischer und prophylaktischer Methoden an (FRESE, 1985). Diesen Standpunkt vertritt auch BOSTOCK (1975), der die Mammatumoren des Hundes als effizientes Modell für gleichartige Erkrankungen bei der Frau sieht. Schon damals sah der Autor, insbesondere auf dem Gebiet der postoperativen Behandlung wie Immunotherapie, Chemotherapie oder den Einsatz hormoneller Substanzen, Äquivalente im Hündin/Frau-Vergleich. So favorisiert auch MACEWEN (1990) den Hund sowohl als Studienobjekt in der Tumorbilogie als auch als Testobjekt für die Krebstherapie.

Ebenso postulieren MOTTOLESE et al. (1994), daß die Gesäugetumoren des Hundes ein geeignetes Modell für immunotherapeutische Studien des Brustkrebses der Frau repräsentieren.

CLARKE (1996) publiziert, daß viele physiologische Effektoren existieren, die geeignet sind, das Wachstum und das Fortschreiten einer Brustkrebserkrankung zu beeinflussen; und das sind so verschiedene wie endokrinologische, immunologische und das Verhalten betreffende. Gerade in diesen Bereichen der Brustkrebsbiologie kann der Gebrauch des Tiermodells eine Menge zum Grundverständnis beitragen (CLARKE, 1996). Außer den benutzten Nagetiermodellen eignet sich insbesondere der Hund als Modell für Mammatumorerkrankungen (CLARKE, 1996). RUTTEMAN (1992) weist daraufhin, daß in der Literatur viele Einwände gegen den Einsatz des Hundes in Toxizitätsstudien existieren. Er gibt zu bedenken, daß bis dato insbesondere der Einfluß des Wachstumshormons GH (growth hormone) bei der Entstehung caniner Mammatumoren unklar ist, während ein tumorstimulierender Effekt in anderen Spezies wie Nagetieren, Katze, Affe und Mensch beobachtet wurde (RUTTEMAN, 1992).

2.2.3.2. Bedeutung lymphozytärer Infiltrate für den Brustkrebs der Frau

Die prognostische Relevanz lymphozytärer Infiltrate beim Mammakarzinom der Frau wird in der humanmedizinischen Literatur kontrovers diskutiert (Tabelle 2, S. 16).

WINTZER et al. (1991) beobachteten in einer Follow-Up-Studie, daß lymphozytäre Infiltrate nicht signifikant mit der Gesamtüberlebenszeit korrelieren. Ebenso wird die tumorfreie Überlebensrate nicht durch lymphozytäre Infiltrate beeinflusst (WINTZER et al., 1991).

Einige Autoren geben an, daß sie keinen prognostisch vorteilhaften Effekt lymphozytärer Infiltrate gesehen haben (CHAMPION et al., 1972; MORRISON, 1973; SCHOORL et al., 1976; PICKARTZ et al., 1985; SCHOLL et al., 1994). SCHOLL et al. (1994) erklären dies damit, daß die Entzündungszellreaktion eine vom Tumor induzierte Antwort ist, die dazu tendiert, Tumorwachstum zu fördern.

Nach SCHOORL et al. (1976) besteht zwischen dem Grad der lymphozytären Infiltration und dem Entdifferenzierungsgrad eine statistisch signifikante, positive Korrelation. Es wurde jedoch nur in den intraduktalen Karzinomen eine nennenswerte Menge an B-Lymphozyten identifiziert, ansonsten dominierten die T-Zellen (SCHOORL et al., 1976).

Laut PICKARTZ et al. (1985) wächst die Stärke des Infiltrates ebenfalls mit der Entdifferenzierung der Karzinome, wobei in der Mehrzahl der Tumoren die Zahlen CD4-positiver (Helfer-) und CD8-positiver (Suppressor-) Zellen annähernd ausgewogen sind. Verglichen mit den normalen Verhältnissen im peripheren Blut liegt demnach eine Vermehrung der das T8-Antigen exprimierenden Zellen (Suppressorzellen) vor (PICKARTZ et al., 1985).

Die Zahl der B-Lymphozyten ist sehr niedrig und nimmt mit der Stärke des lymphozytären Infiltrates zu. Die Mehrzahl der B-Zellen findet sich in follikelähnlichen Infiltraten am Tumorrand (PICKARTZ et al., 1985).

Eine größere Anzahl von Veröffentlichungen diskutieren, daß beim Mammakarzinom die Prognose günstiger ist, wenn viele Entzündungszellen den Tumor infiltrieren (BERG, 1959; CUTLER et al., 1969; BLACK et al., 1975; FEGIZ, 1977; CHAITCHIK et al., 1987; AALTOMAA et al., 1992; YOSHIMOTO, 1993; ASAGOE et al., 1996). Als Musterbeispiel dafür steht das sogenannte medulläre Karzinom, das sich durch eine besonders dichte lymphozytäre Reaktion und eine bessere Prognose auszeichnet (BLOOM et al., 1970; RIDOLFI et al., 1977).

ASAGOE et al. (1996) führten eine klinisch-pathologische Studie über Prognosefaktoren bei Brustkrebspatientinnen, deren Lymphknoten alle frei von Metastasen waren, durch. Sie fanden heraus, daß von insgesamt 11 untersuchten pathologischen Merkmalen, sich 3 Faktoren (histologischer Typ, histologischer Grad und der Grad der tumorinfiltrierenden Lymphozyten) als prognostisch aussagekräftig erwiesen.

Sie heben hervor, daß der Grad der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (fehlende lymphozytäre Infiltrate - schlechtere Prognose) ein besonders signifikanter prognostischer Faktor in lymphknotenmetastasennegativen Brustkrebskrankungen ist (ASAGOE et al., 1996).

CASELITZ et al. (1985) konnten in einer morphometrischen Analyse, kombiniert mit immunhistochemischen Verfahren aufzeigen, daß T-Zellen mit Beginn der Invasion signifikant zunehmen, wobei das Überwiegen der T-Suppressorzellen auffällig ist.

Dagegen schreiben GOKEL et al. (1985), daß in ihrer Studie die follikelartigen Zellaggregate am Rande von soliden Karzinomverbänden praktisch ausschließlich aus reifen T-Lymphozyten bestehen, wobei Helferzellen überwiegen. B-Zellen kommen nur ausnahmsweise in kleinen angedeuteten Keimzentren vor und fallen zahlenmäßig nicht ins Gewicht (GOKEL et al. 1985). Ebenso beobachteten MÜLLER et al. (1985), daß bei der entzündlichen Reaktion auf den Tumor zumeist die T-Helferzellen dominieren.

In einer Untersuchung von MARROGI et al. (1997) zeigen Patienten mit frühen Tumorstadien oder jene, die die Krankheit überstanden haben, eine deutlich höhere Anzahl zytotoxischer T-Zellen innerhalb der tumorinfiltrierenden Lymphozyten, im Vergleich zu den Patienten mit späten Tumorstadien, bzw. denen, die an der Krankheit verstorben sind. Ihre Ergebnisse demonstrieren, welche starke biologische Bedeutung insbesondere tumorinfiltrierende Lymphozyten für das Fortschreiten von Brustkrebskrankungen haben (MARROGI et al., 1997).

Tabelle 2: Humanmedizinische Literatur über die prognostische Bedeutung lymphozytärer Infiltrate für den Brustkrebs der Frau

	Prognose günstig	Prognose ungünstig	prognostisch nicht aussagekräftig
Autoren	BERG, 1959 CUTLER et al., 1969 BLACK et al., 1975 FEGIZ, 1977 CHAITCHIK et al., 1987 AALTOMAA et al., 1992 YOSHIMOTO, 1993 ASAGOE et al., 1996	CHAMPION et al., 1972 MORRISON, 1973 SCHOORL et al., 1976 PICKARTZ et al., 1985 SCHOLL et al., 1994	WINTZER et al., 1991

2.2.3.3. Bedeutung lymphozytärer Infiltrate für Gesäugetumoren der Hündin

Vor einigen Jahren ist es gelungen, die Leukozyten des Hundes zu „clustern“. Der „cluster of differentiation“ ist eine Zusammenstellung standardisierter Antikörper zur Erkennung definierter Oberflächen-Antigene auf immuninvolvierten Zellen.

Nach MACEWEN (1986) soll auch beim Tier, wie beim Menschen, das Immunsystem in die Entwicklung von Tumoren eingreifen, wie das Vorkommen spontaner Regressionen bei gleichzeitiger Anwesenheit lymphozytärer Infiltrate zeigt.

GILBERTSON et al. (1983) schlagen vor, ein Punktesystem (Grading) von 0 bis 3 für lymphozytäre Reaktionen einzuführen, wobei 0=fehlend, 1=minimal, 2=mäßig und 3=ausgeprägt bedeuten. Analog zu dem in der Humanmedizin existierenden System, werden die Grade 0 und 1 als negativ, die Grade 2 und 3 als positiv, und damit als spezifisch gegen den Tumor gerichtet, festgelegt. Es wird darauf hingewiesen, daß diese spezifische Reaktion nur in nekrosefreien Arealen bewertet werden kann (GILBERTSON et al., 1983). Selbst wenn die erhobenen Daten keine signifikanten Unterschiede im biologischen Verhalten von Neoplasien mit oder ohne lymphozytärer Zellreaktion aufzeigen können, ist doch bemerkenswert, daß diffuse zelluläre Infiltrate am häufigsten in undifferenzierten invasiven Karzinomen zu finden sind (GILBERTSON et al., 1983).

Laut KÄLIN et al. (1985) sind 47% aller malignen Tumoren der Hündin von lymphozytären Infiltrationen begleitet. Beim Hund konnten laut KÄLIN et al. (1985) bisher keine signifikanten Unterschiede im biologischen Verhalten von Tumoren mit oder ohne lymphozytärer Reaktion beobachtet werden. Die Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, daß dieses Phänomen beim Hund ebenfalls eine Rolle spielen könnte, da 47% aller Hunde, die nach zweieinhalb Jahren noch am Leben waren, eine deutliche lymphozytäre Reaktion zeigten, während bei Tieren mit metastasierenden Tumoren solche Infiltrate dagegen nur in 25% der Fälle nachgewiesen werden konnten (KÄLIN et al., 1985).

Histologische Studien haben angedeutet, daß die Prognose für Hunde besser ist, wenn lymphozytäre Infiltrate in der Nähe des Tumors präsent sind (MACEWEN, 1986).

GUTBERLET (1994) fand hingegen häufiger Lungenmetastasen bei Hündinnen, die stärkere Entzündungen im Bereich der Mammakarzinome aufwiesen.

LÖHR (1996) sieht in ihrem Untersuchungsgut einen engen Zusammenhang von lymphozytären Infiltraten mit der Dignitätsgradierung, so daß sie insgesamt eine gewisse prognostische Relevanz nicht von der Hand weist.

MISDORP und HART (1979) erwähnen, daß die Ergebnisse von Immuntherapien durchaus ermutigend zu sein scheinen. Die hierbei verwendeten immunmodulierenden Substanzen aktivieren Makrophagen, induzieren die Zytokin-Produktion und haben verschiedene Effekte auf die Aktivität und Proliferation von T- und B-Lymphozyten (VAN KAMPEN, 1997). Immunmodulatoren werden als unspezifische Stimulatoren sowohl der humoralen als auch der zellulären Immunität betrachtet (VAN KAMPEN, 1997).

Einen Überblick über Erfolge und Mißerfolge verschiedener Immuntherapien bei Mammatumoren des Hundes und der Katze, die in der einschlägigen Literatur beschrieben werden, geben RUTTEN et al. (1990). Hier ist erwähnenswert, daß die durch eine BCG (Bacillus Calmette Guérin)-Therapie induzierte B-Zell-Aktivität nicht mit einer Tumor-Regression assoziiert ist (PARODI et al., 1983). Ebenso ist die Bildung zirkulierender Immunkomplexe mit einer schlechten Prognose verbunden (RUTTEN et al., 1990).

Untersuchungen von BERG und RÜSSE (1994) belegen, daß der Einsatz des Paramunitätsinducer aus Pockenviren PIND-ORF (Baypamun HK) zu einer besseren Prognose führt. PIND-ORF löst eine stufenweise Reaktionskaskade des paraspezifischen Immunsystems mit Querverbindungen zum spezifischen Immunsystem, speziell den T-Lymphozyten, aus (BERG, 1994).

2.2.4. Klassifikation

Jede Probe wird nach GUTBERLET et al. (1998) in Anlehnung an die Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (HAMPE und MISDORP, 1974) histogenetisch klassifiziert, eine Einteilung, die auf der Benennung der einzelnen Gewebskomponenten basiert. Zusätzlich erhält jede Neoplasie für die Malignitäts- und Tumorkennzeichen der Veränderung Wertungspunkte (s. 2.2.4.1. Beurteilung der Malignität durch Wertungspunkte, S. 19). Ähnlichen Methoden des Tumorgradings, die sich auf ein Punktesystem stützen, mißt man auch in der humanmedizinischen Krebsforschung eine prognostische Bedeutung zu (REINER et al., 1985).

GUTBERLET (1994) konnte in einer Studie nachweisen, daß die Tiere, die innerhalb des ersten Jahres nach Erstbeobachtung an Mammatumoren gestorben sind, eine höhere Punktzahl aufwiesen, als die Tiere, die erst innerhalb des zweiten Jahres an Mammatumoren gestorben sind. Mammatumoren, die durch Histologie und Punktwertung als höher maligne eingestuft werden, sind mit einer schlechteren Prognose verbunden (GUTBERLET, 1994).

Nach dem Beurteilungsschema nach GUTBERLET et al. (1998) können sich nun folgende Kurzdiagnosen ergeben, die dem direkten Vergleich dienen und sich auf die Hauptveränderung beschränken (Tabelle 3).

Tabelle 3: Histologische Einteilung der Mammatumoren des Hundes (GUTBERLET et al., 1998)

benigne Tumoren	maligne Tumoren
<i>epithelial</i>	
Adenom (Drüsengewebe) komplexes Adenom (Drüsen- und Myoepithel benigne) Myoepitheliom	Adenokarzinom (Drüsengewebe) komplexes Karzinom (Drüsen- und Myoepithel maligne) malignes Myoepitheliom, Myoepithelkarzinom solides Karzinom Spindelzellkarzinom anaplastisches Karzinom
<i>mesenchymal</i>	
Fibrom, Osteom, Chondrom Kombinationen Lymphom Lipom Mastzellentumor, potentiell maligne	Fibro-, Osteo-, Chondrosarkom kombinierte Sarkome Lymphosarkom Liposarkom Mastzellensarkom
<i>epithelial und mesenchymal</i>	
benigner Mischtumor (beide Anteile benigne)	Karzinosarkom, maligner Mischtumor (beide Anteile maligne) Kombinationen von malignen und benignen Tumoren unklassifizierte Tumoren

2.2.4.1. Beurteilung der Malignität durch Wertungspunkte

Für einzelne Merkmale, die mit der Beurteilung der Dignität eines Mammatumors zusammenhängen, werden nach GUTBERLET (1994) Wertungspunkte vergeben. Ihr Schema stellt sich wie folgt dar: In dieser Region lokalisierte Neoplasien, deren Ausgangsgewebe nicht der Mamma entstammt sowie nicht-neoplastische Gesäugeveränderungen werden bei diesem Punktesystem ignoriert und mit 0 Punkten bewertet. Kennzeichen, die bei Auftreten in jedem Fall als maligne eingestuft werden, erhalten immer fünf Punkte, unabhängig vom Ausmaß ihrer Ausprägung. Dazu gehören anaplastisches Wachstum des Drüsengewebes, einzelne Drüsenzellen im Stroma oder Stränge von Drüsenzellen im Stroma, Einbrüche in Blut- und/oder Lymphgefäße, durchbrochene oder infiltrierte Kapseln und mehrfach durchbrochene Kapseln, sowie infiltratives Wachstum innerhalb der Veränderung und in die Umgebung.

Andere alleine nicht zu einer malignen Diagnose führende Merkmale werden je nach Ausprägung ihrer Veränderung mit ein (geringes Ausmaß) bis fünf (ausschließliches Vorkommen) Punkten bewertet. Nach diesem Schema werden solides und ungeordnetes Wachstum der Drüsenzellen, abgerundete oder sehr unterschiedliche Zellgestalt, deutliche oder vermehrte Nukleoli, Kernwandhyperchromasie und Mitosen beurteilt.

Eine nicht infiltrierte und nicht durchbrochene Kapsel wird mit mindestens einem Punkt bewertet. Mesenchymale neoplastische Zellen werden je nach Ausprägung und Differenzierung des gebildeten interstitiellen Gewebes mit ein bis fünf Punkten gewertet.

Um die Gesamtpunktzahl zu erhalten, werden bei Einzeltumoren die Punkte addiert, bei vorliegendem Phänomen der primären Multiplizität wird der Tumor mit der höchsten Punktzahl als der entscheidende angesehen und dessen addierte Punktzahl als Gesamtpunktzahl gewertet.

2.2.5. Gradeinteilung nach GILBERTSON et al. (1983)

Tabelle 4 gibt Auskunft über die Gradeinteilung der lymphozytären Reaktionen in caninen Mammatumoren, wie sie von GILBERTSON et al. vorgeschlagen wird.

Tabelle 4: Gradeinteilung nach GILBERTSON et al. (1983)

Grading	Lymphozytenmenge	Immunreaktion
Grad 0	fehlend	negativ, unspezifisch
Grad 1	minimal	negativ, unspezifisch
Grad 2	mäßig	positiv, spezifisch gegen den Tumor gerichtet
Grad 3	ausgeprägt	positiv, spezifisch gegen den Tumor gerichtet

2.2.6. Gruppeneinteilung nach COCKERELL und SLAUSON (1979)

Die beiden Autoren erarbeiteten ein Schema zur Auswertung des lymphozytären Musters innerhalb von cutanen Histiocyten des Hundes am HE-gefärbten Routineschnitt. Die zu ermittelnden Parameter sind hierbei die semiquantitativ bestimmte relative Menge und das Verteilungsmuster der Entzündungszellinfiltrate mit folgender Gruppeneinteilung (Tabelle 5).

Tabelle 5: Gruppeneinteilung nach COCKERELL und SLAUSON (1979)

Gruppe	relative Lymphozytenmenge	Lymphozytenverteilungsmuster
Gruppe I	minimal bis abwesend	diffus am Übergang zu normalem Gewebe
Gruppe II	mäßig	herdförmig an der Peripherie mit diffuser Komponente im Tumorzentrum
Gruppe III	auffallend	herdförmig an der Peripherie und im Tumorzentrum
Gruppe IV	auffallend, überwiegend Lymphozyten	

2.3. Mechanismen der Immunantwort

2.3.1. Allgemeines

Die außerordentlich langlebigen (Monate und Jahre) und häufig rezirkulierenden Lymphozyten sind die Schlüsselzellen im immunologischen Geschehen. Da sie sich weiter teilen und differenzieren können, stellen sie keine hämatologischen Endzellen dar. Im entzündlichen Geschehen treten sie vermehrt auf, wenn dieses längere Zeit dauert beziehungsweise chronisch wird (WEISS, 1990).

Nach Antigenkontakt antwortet das Immunsystem auf zwei gleichzeitig ablaufende Arten.

Die zelluläre (zellvermittelte) Immunantwort benötigt für einen optimalen Ablauf Interaktionen zwischen den verschiedenen T-Zelltypen (T-Effektorzelle und T-Helferzelle) und Antigen-präsentierenden Zellen.

Das humorale Immunsystem (B-Zellsystem) reagiert mit Synthese und Abgabe von freien Antikörpern (Immunglobulinen) in das Blut und in andere Körperflüssigkeiten (SCHLIESSER, 1990).

2.3.1.1. T-Lymphozyten (T-Zellen)

Die thymus-abhängig entstehenden T-Zellen (Tabelle 6) wandeln sich bei Antigenstimulation in T-Lymphoblasten um. Diese proliferieren dann und haben mehr und vielfältigere Aufgaben als B-Zellen.

Sie können sich zu T-Effektorzellen ($T8^+$) mit einerseits Zytolyse-Eigenschaften auf Zielzellen oder andererseits Mediatorenfreisetzung (Lymphokine) differenzieren. Sensibilisierte T-Lymphoblasten können aber auch Funktionen als T-Helferzellen ($T4^+$), T-Suppressorzellen ($T8^+$) und Gedächtniszellen übernehmen (SCHLIESSER, 1990).

Tabelle 6: T-Lymphozyten und zelluläre Immunität (nach SCHLIESSER, 1990)

Entstehungsort	Umwandlung bei Antigenstimulation	Aufgaben
Periphere lymphatische Organe: Lymphknoten, Milz, Peyersche Platten im Darm, Tonsillen (Thymusabhängiges System)	T-Lymphoblasten	Erkennung und immunologische Abwehr bakterieller, viraler und parasitärer Erreger
	T-Effektorzellen (Zytolyse, Lymphokine)	Zytotoxizität für fremdes Gewebe, abartige Zellen und bestimmte Tumorzellen, Bildung von Lymphokinen
	oder	
	T-Helferzellen	Helferfunktionen bei der Immunantwort von T- und B-Zellen auf Antigene
	oder	
	T-Suppressorzellen	Suppressorfunktionen auf Zellen des T- und B-Zellsystems
	oder	
	Gedächtniszellen	Informationsspeicher für Sekundärantwort

2.3.1.2. B-Lymphozyten (B-Zellen)

Die in sekundären lymphatischen Organen und Geweben entstehenden B-Zellen (Tabelle 7) werden durch Antigenstimulierung zu B-Lymphoblasten (Immunoblasten) transformiert, die als Vorstufen der Plasmazellen gelten.

Die reife Plasmazelle ist in der Lage, Antikörper zu synthetisieren und zu sezernieren. B-Lymphoblasten können mit T-Helfer- und T-Suppressorzellen kooperieren oder sich zu Gedächtniszellen differenzieren (SCHLIESSER, 1990).

Tabelle 7: B-Lymphozyten und humorale Immunität (nach SCHLIESSER, 1990)

Entstehungsort	Umwandlung bei Antigenstimulation	Aufgaben
Säugetiere: aus von Knochenmarkszellen abstammenden, sekundären lymphatischen Organen und Geweben: Lymphfollikel, Keimzentren der Tonsillen, Peyerschen Platten im Darm und anderer Gewebe	B-Lymphoblasten	Kooperationen mit T-Zellen
	Plasmazellen	Antikörper synthetisieren und sezernieren
	oder	
Vögel: Bursa Fabricii	Gedächtniszellen	Informationsspeicher für Sekundärantwort

2.3.1.3. T-Zell-Rezeptor-Komplex

Nach SCHLIESSER (1990) erfordern die unterschiedlichen Funktionen der T-Zellen eine gewisse Heterogenität, die sich in unterschiedlichen Oberflächen-Antigenen und -Antigenrezeptoren zeigt.

Das T3-Antigen ist auf allen reifen T-Lymphozyten vorhanden und ist Teil des Antigenrezeptors. T-Lymphozyten mit Helferfunktion besitzen zusätzlich das T4-Antigen im T-Zell-Antigenrezeptor, während jene mit Suppressorfunktion und vermittelter Zytotoxizität an dieser Stelle zusätzlich das T8-Antigen aufweisen (SCHLIESSER, 1990). Der T-Zell-Rezeptor (TCR) besteht aus zwei Glycoproteinketten, der TCR- α -Kette und der TCR- β -Kette, analog zu den Immunglobulinen. Auf der Zelloberfläche ist dieser Rezeptor mit den drei Proteinen des CD3-Antigens, der CD3- ϵ , der CD3- δ und der CD3- ζ -Kette assoziiert (van DONGEN et al., 1987).

Nach CLEVERS et al. (1988) existiert außerdem noch eine CD3- ϵ -Kette. SAN JOSE et al. (1998) postulieren ein neues Modell, bei dem der TCR/CD3-Komplex aus zwei TCR α / β Heterodimeren, einem CD3 ϵ Dimer, einem CD3 δ Dimer und einem CD3 ζ Homodimer besteht.

2.3.1.4. B-Zell-Rezeptor-Komplex

Zur Antigenerkennung benötigen die B-Zellen spezifische Rezeptoren an ihrer Oberfläche in Form von Ig-Molekülen der IgM- und IgD-Klasse (SCHLIESSER, 1990). Das IgM-Molekül ist in der B-Zell-Membran mit einem Heterodimer, bestehend aus dem IgM- μ - und dem Ig- δ -Protein, nicht kovalent verknüpft (HOMBACH et al., 1990). Das IgM- μ -Protein ist ein Produkt des mb-1-Gens (van NOESEL et al., 1991), während das Ig- δ -Protein ein Produkt des B29-Gens darstellt (MASON et al., 1991). Beide Genprodukte zusammen ergeben ein über Disulphid-Brücken verbundenes Dimer, welches die Expression von IgM auf der B-Zelloberfläche kontrolliert und eine Rolle in der Signaltransduktion nach Antigenbindung spielen soll, ähnlich der TCR-assoziierten CD3-Komponente der T-Zellen (MASON et al., 1991).

2.3.1.5. Antigene und Antikörper

2.3.1.5.1. Einleitung

Immunzellen besitzen, wie alle Zellen, Oberflächen-Antigene und -Antigenrezeptoren, die den unterschiedlichen Funktionen dienen und die eine Charakterisierung des Zelltypes ermöglichen. So können T- und B-Lymphozyten anhand ihrer Oberflächen-Antigene identifiziert werden. Dies kann mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die CD-Antigene erkennen, erfolgen. Der CD (cluster of differentiation) ist eine Zusammenstellung WHO-standardisierter monoklonaler Antikörper zur Erkennung definierter Oberflächen-Antigene auf immuninvolvierten Zellen (BUNDSCHUH et al., 1988).

So konnte bereits sehr früh ein Epitop des CD3-Proteins auf T-Zellen durch einen polyklonalen, im Kaninchen hergestellten Antikörper identifiziert werden (MASON et al., 1989). FERRER et al. (1992) etablierten dann diesen Marker an formalinfixiertem, paraffineingebettetem caninem Gewebe.

Andere Antikörper, die gegen die Leukozyten-Differenzierungs-Antigene des Hundes gerichtet sind, sind im Jahr 1994 auf dem „First International Canine Leucocyte Antigen Workshop“ (CLAW) vorgestellt und wenn möglich entsprechend der CD-Nomenklatur definiert worden (COBBOLD et al., 1994).

In diesem Workshop wurden drei Antikörper unterbreitet, die im Gefrierschnitt B-Zellen markieren, allerdings war ihr Molekulargewicht nicht so eindeutig, um sie als anti-CD21-Antikörper zu bestimmen (COBBOLD und METCALFE, 1994; RABANAL et al., 1995; WILLIAMS, 1997).

So weist WILLIAMS (1997) darauf hin, daß zur Identifizierung der B-Lymphozyten immer noch die als vorherrschende Moleküle auf der B-Zell-Oberfläche lokalisierten Immunglobuline IgG und IgM geeignet sind.

Einige erfolgreiche Versuche wurden unternommen, sich die intrazytoplasmatisch lokalisierten Epitope des auf der Plasmamembran der B-Lymphozyten exprimierten CD20-Antigens mit Hilfe des monoklonalen CD20-Antikörpers anti-BLA.36 in formalinfixierten, paraffineingebetteten caninem Gewebe zunutze zu machen (DARBES et al., 1997; MAJZOUB et al., 1997; SCHULDEN et al., 1997).

Auf dem „Fifth International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens“ (LAWS) wurde ein mit membrangebundenen Immunglobulinen auf der B-Zell-Oberfläche verknüpftes Heterodimer als CD79 bezeichnet (MASON et al., 1995).

2.3.1.5.2. CD3 (T3)-Antigen

Das CD3-Antigen besteht aus drei Proteinketten, der CD3- α , der CD3- β sowie der CD3- γ Kette, welche mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) verbunden sind und eine Rolle in der Signaltransduktion vom TCR zu intrazytoplasmatischen Komponenten spielt (van DONGEN et al., 1987; van DONGEN et al., 1988). Nach CLEVERS et al. (1988) existiert zusätzlich noch eine CD3- δ -Kette. MASON et al. (1989) etablierten einen im Kaninchen hergestellten, polyklonalen Antikörper, der gegen eine intrazytoplasmatisch gelegene Domäne der CD3- β Kette gerichtet ist. Die Epitope dieser Aminosäuresequenz sind einer Denaturierung gegenüber resistent und können daher in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe markiert werden (MASON et al., 1989).

Da die Rezeptoren der Lymphozyten hochkonservierte Regionen in der Evolution darstellen, gelang es FERRER et al. (1992), das CD3-Antigen in formalinfixiertem, paraffineingettetem Gewebe des Hundes mit diesem Marker zu identifizieren.

2.3.1.5.3. CD79a-Antigen

Den ersten Beweis für Immunglobulin-assoziierte Moleküle auf B-Lymphozyten lieferten SAKAGUCHI et al. (1988), als sie die Nukleotid-Sequenz eines aus Mäusen cDNA isolierten Gens (mb-1) beschrieben, welches für eine B-Zell spezifische Expression selektiert wurde. Zusätzlich isolierten sie einen cDNA Clone des Menschen, welcher eine enge Homologie (ca. 90%) zu den Mäuse-Genen zeigte.

Die von diesem Gen kodierte Aminosäure-Sequenz des mb-1 Proteins zeigte insgesamt strukturelle Ähnlichkeiten zu den CD3 α - und β -Ketten, aber keine Sequenz-Homologie (SAKAGUCHI et al., 1988).

Die Autoren deuten an, daß das mb-1 Protein das B-Zell-Äquivalent des CD3-Proteins der T-Zellen ist (SAKAGUCHI et al., 1988). Unabhängig davon identifizierten HOMBACH et al. (1988) bei Mäusen ein mit dem Membran-IgM assoziiertes 34 kD Protein (IgM⁺), welches in Zellen fehlte, die IgM nicht an ihrer Oberfläche exprimierten. Interessanterweise konnte die Expression von IgM auf der Zellmembran durch Übertragung eines mb-1 cDNA clones erreicht werden (HOMBACH et al., 1988). Dies ist ein starker Hinweis dafür, daß das identifizierte 34 kD Protein das Produkt des mb-1 Gens ist und, mit der transmembranen Form des IgM nicht-kovalent verbunden, dessen Transport zur Zell-Oberfläche bewerkstelligt (MASON et al., 1991).

In murinen B-Zellen bildet das 34 kD IgM assoziierte (mb-1) Polypeptid mit einem 39 kD (B29) Polypeptid, welches vom B29 Gen kodiert wird, ein über Disulphid-Brücken verbundenes Heterodimer (HERMANSON et al., 1988; HOMBACH et al., 1990; MASON et al., 1991; MASON et al., 1992; van NOESEL, 1991; van NOESEL, 1992).

Dieses Heterodimer ist mit den membrangebundenen IgM auf der B-Zell-Oberfläche nicht kovalent verknüpft und spielt eine Rolle in der Signaltransduktion nach Antigenbindung, in Analogie zur T-Zell-Rezeptor-assoziierten CD3-Komponente der T-Lymphozyten (MASON et al., 1991). Aufgrund dieser strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten werden diese Komponenten als B-Zell-Antigen-Rezeptor-Komplex angesehen (HOMBACH et al., 1990; MASON et al., 1991).

Auf dem „Fifth International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens“ (LAWS) wurden die Proteine des mb-1 Gens und des B29 Gens als CD79a und CD79b bezeichnet (MASON et al., 1995).

MASON et al. (1995) beschreiben den erfolgreichen Einsatz des anti-CD79a monoklonalen Antikörpers JCB117 an paraffineingebettetem Material des Menschen.

Der monoklonale Antikörper HM57, der ebenfalls das CD79a-Antigen auf B-Lymphozyten identifiziert, kann an Gefriermaterial einer Vielzahl von Säugetierspezies (Tabelle 8) eingesetzt werden (MASON et al., 1991; JONES et al., 1993). Er reagiert mit dem intrazytoplasmatisch gelegenen C-Terminalen-Ende des mb-1-Proteins (CD79a).

Tabelle 8: Möglichkeiten des Einsatzes des monoklonalen Antikörpers HM57 bei verschiedenen Säugetierspezies

Autoren	Spezies	Reaktion
MASON et al., 1991	Mensch, Affe, Schwein, Pferd, Kaninchen, Rind, Meerschweinchen, Ratte, Maus	B-Zell-Areale positiv
JONES et al., 1993	Mensch, Kalb, Meerschweinchen, Pferd, Affe, Maus, Schwein, Ratte	B-Zell-Areale positiv

Diese breite Kreuzreaktivität ist damit erklärbar, daß die Antikörper direkt gegen intrazytoplasmatisch gelegene Peptidsequenzen transmembraner Leukozytenmoleküle gerichtet sind. Jede dieser Ketten wird von hoch konservierten DNA-Regionen kodiert, was vermutlich ihre funktionelle Bedeutung widerspiegelt (JONES et al., 1993). Der Antikörper CD79a kann zusätzlich zu den oben genannten Spezies auch an formalinfixiertem, paraffineingebetteten Gewebe des Hundes eingesetzt werden (MILNER et al., 1996; CANGUL et al., 1998; SCHULDEN et al., 1998a,b).

2.4. Immunfärbung

2.4.1. Methoden der Immunfärbung

2.4.1.1. Einleitung

Immunhistochemische Färbemethoden sind heute bereits so weit verbreitet, daß sie als eine von vielen speziellen Färbetechniken angesehen werden können (BOENISCH, 1989).

Zentrale Reagenzien aller immunhistochemischer Färbungen sind Immunglobuline. Antisera, die spezifische Antikörper gegen eine ständig zunehmende Zahl klinisch verwertbarer Gewebsantigene enthalten, haben die Quantität und Qualität des immunhistologischen Repertoires enorm vergrößert.

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht darauf, mit Hilfe von Antikörpern gewebliche oder zelluläre Antigene morphologisch zuordenbar im histologischen Präparat zu visualisieren.

2.4.1.2. Die Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode

Die Alkalische Phosphatase, die aus dem Darm von Kälbern gewonnen wird und ein Molekulargewicht von 100 kD besitzt, entfernt durch Hydrolyse Phosphatgruppen und transferiert diese von organischen Estern, indem sie die P-O-Bindung zerbricht (BOENISCH, 1989). Als Zwischenprodukt entsteht kurzzeitig eine Enzym-Substratbindung (PO_4). Die wichtigsten metallischen Aktivatoren der alkalischen Phosphatase sind Mg^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} .

Die alkalische Phosphatase fand erst nach der Publikation der sogenannten APAAP-Methode in der Immunhistochemie breite Anwendung (CORDELL et al., 1984). Dabei stellen unmarkierte Brückenantikörper (rabbit anti-mouse) die Verbindung zwischen monoklonalen Primärantikörpern (mouse) und dem APAAP-Komplex (mouse) her.

Werden in anderen Tierarten als der Maus hergestellte monoklonale oder polyklonale Antikörper verwendet, muß zwischen Primärantikörper und Brückenantikörper ein Sekundärantikörper eingesetzt werden, der den Primärantikörper „mausifiziert“, also für den Brückenantikörper als „mouse“ erkennbar macht (SCHWEGLER, 1994).

Zur Blockierung endogener alkalischer Phosphatase wird dem Substrat Levamisol zugefügt (CORDELL et al., 1984, FRITZ et al., 1985).

Das in den Verdünnungspuffern enthaltene fetale Kälberserum verhindert darüber hinaus unspezifische Bindungen der Antikörper mit dem Gewebe. Gegebenenfalls kann für 30 min. eine Präinkubation mit blockierendem Normalserum notwendig sein. Im Vergleich zu den Immunperoxidase-Methoden wie PAP- (Peroxidase-anti-Peroxidase) und ABC- (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex) Technik, sind bei der APAAP-Methode keine Fehlinterpretationen aufgrund endogener Peroxidaseaktivität zu befürchten. Endogene Peroxidasen können mit dem Peroxidase-Substrat reagieren und zu falsch positiven Ergebnissen führen. Viele Zellen verfügen über Peroxidase-Aktivitäten, wie z.B. Peroxisomen der Leberzellen, Mastzellen, aber auch weiße Blutzellen und durch das Hämoglobin die Erythrozyten (HEYDERMANN, 1979). Diese Peroxidasen können durch eine Behandlung mit 0,3%igem H_2O_2 in Methanol (STRAUS, 1971; STREEFKERK, 1972) eliminiert werden.

2.4.1.3. Das Biotin-Streptavidin Amplifikations (B-SA)-Nachweissystem

Das StrAviGen Super Sensitive Detektionssystem der Firma BioGenex repräsentiert eine neue Technik zum Nachweis von Antigen-Antikörper-Bindungsreaktionen. Das Prinzip ist ähnlich der APAAP-Methode, wobei bei der B-SA-Methode biotinylierte Brückenantikörper die Verbindung zwischen Primärantikörper und dem Alkalische-Phosphatase-konjugierten Streptavidin-Komplex herstellen. Da der Brückenantikörper aus Immunglobulin G gegen Maus-, Kaninchen-, Meerschweinchen- und Ratten-Antikörper besteht (Multi-Link), kann bei Einsatz von in diesen Tierarten hergestellten monoklonalen oder polyklonalen Primär-Antikörpern auf eine „Mousification“ verzichtet werden. Bei der B-SA-Technik ist der Brückenantikörper derart modifiziert, daß die Bindung von mehreren Biotinmolekülen ohne ungünstige Beeinflussung seiner Bindungsaffinität möglich wird. Zusätzlich ist das Verfahren zur Konjugation von Markierungsenzymen mit Streptavidin vom Hersteller optimiert worden, um ein maximales Labeling von Streptavidinmolekülen mit mehreren Enzym-Molekülen zu ermöglichen. Die kombinierte Wirkung dieser Verbesserungen bedeutet einen erheblichen Anstieg der Signalwirkung im Vergleich zu jedem indirekten Standardverfahren (PAP, APAAP oder ABC), die durch die Antigen-Antikörper Bindung erzeugt werden. Für eine maximale Sensitivität wird die alkalische Phosphatase der Meerrettichperoxidase als Markierungsenzym vorgezogen, da die Substrate in Kombination mit alkalischer Phosphatase sowohl einen höheren Umsatz als auch Extinktionskoeffizienten aufweisen.

Außerdem entfallen, wie bei der APAAP-Methode, mögliche Fehlinterpretationen auf Grund einer endogenen Peroxidaseaktivität. Zur Blockierung endogener alkalischer Phosphatase wird Levamisol dem Substrat beigefügt.

Zur Entwicklung des Enzymkomplexes kommt, wie bei der APAAP-Methode, Fast-Red zum Einsatz, sodaß ein intensiv leuchtend rotes Chromogen entsteht. Eine Kontrastierung im Rahmen einer Gegenfärbung wird durch die Anwendung von Hämalan erreicht. Sowohl bei der APAAP-Methode als auch bei der B-SA-Methode hydrolysiert das Enzym Naphtholphosphat Ester (Substrat) zu Phenolkomponenten und Phosphaten (BOENISCH, 1989). Die Phenole kuppeln mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogene) und bilden so unlösliche Azofarbstoffe; verschiedene Kombinationen von Substraten und Chromogenen wurden bisher erfolgreich eingesetzt (BOENISCH, 1989). Naphtol AS-MX-Phosphat kann sowohl in seiner sauren Form oder als Natriumsalz verwendet werden (BOENISCH, 1989). Durch Entwicklung des Enzymkomplexes mit Fast-Red- oder Fast-Blue-Substrat entsteht ein leuchtend rotes oder blaues Chromogen, dessen Intensität bei der APAAP-Methode durch wiederholte Inkubation verstärkt werden kann und das sogar geringe Mengen antigenhaltiger Zellen sichtbar werden läßt (CORDELL et al., 1984). Zur Gegenfärbung wird bei der Einfachreaktion mit Fast-Red-Substrat Hämalan, bei der Doppelmarkierung mit Fast-Red- und Fast-Blue-Substrat Eisenhämatoxylin (GUTBERLET, 1994) oder Methylgrün (SCHULDEN et al., 1998b) verwendet.

2.4.1.4. Fixierung und Antigenmaskierung

Durch die Fixierung von Gewebeproben in Formalin kommt es zur Reduktion der Antigenität: zum einen treten intermolekulare methylenartige Quervernetzungen zwischen Polypeptidketten auf (SHI et al., 1991), des weiteren können andere molekulare Strukturen an das Epitop binden (SHI et al., 1991). Bestimmte Antigene werden somit nach Formalinbehandlung von einigen Antikörpern nicht mehr erkannt. Dieser Vorgang ist allerdings teilweise wieder reversibel, da viele Antigene durch die Methylenbrücken nicht zerstört, sondern lediglich für den Antikörper „maskiert“ werden (SHI et al., 1991). Nach MORGAN et al. (1994) besteht die Möglichkeit, daß die Zellproteine in ihrem formalin-fixierten Zustand mit Kalzium-Ionen Komplexe bilden, die zu einem wechselnden Grad der Antigenmaskierung führen.

2.4.1.5. Antigenemaskierung durch Vorbehandlung

Die unterschiedlichen Arten der Vorbehandlung formalinfixierter Schnitte zielen darauf, maskierte Epitope für die Antikörper wieder zugänglich zu machen und somit die Immunoreaktivität wiederherzustellen. Einige Antigene können durch enzymatische Vorbehandlung z.B. Pepsin-, Trypsin- oder Proteasevorverdauung, für den Antkörper wieder erkennbar gemacht werden; andere Antigene werden erst durch Kochen in der Mikrowelle (MWO) in verschiedenen (Metall-) Salzlösungen demaskiert (SHI et al., 1991; CATTORETTI et al., 1993). Allerdings sind die Mechanismen, warum die Techniken so effektiv in der Antigenemaskierung sind, noch unklar (PILERI et al., 1997). Die während der Mikrowellenbehandlung auf das Gewebe einwirkende Hitze scheint das Polypeptidgrundgerüst anzugreifen, sodaß die durch Formalinfixierung entstandenen Vernetzungen gespalten werden (NORTON, 1993). Es wird vermutet, daß die metallischen Salze bzw. der Harnstoff des Puffers gleichzeitig die Tertiärstruktur der Proteine durch Dissoziation der Wasserstoffbindungen öffnen (NORTON, 1993). Laut MORGAN et al. (1994) liefert die Mikrowellenhitze die Energie, die zur Herauslösung des Kalziums aus der Proteinbindung benötigt wird und ermöglicht somit die Kalzium-Chelatbildung mit den Ionen einer als Puffer verwendeten Salzlösung, wie z.B. den Zitrat-Ionen des Zitrat-Puffers. CATTORETTI und SUURMEIJER (1995) halten es für denkbar, daß sich die Wiederherstellung der Antigenität ereignet, wenn sich die verwendete Lösung abkühlt. SHI et al. (1995) betonen, daß für manche Antigene der pH-Wert der Pufferlösung ein wichtiger Kofaktor ist.

Bei der Mikrowellen-Methode ist zu beachten, daß Zahl und Position der Färbeküvetten (Coplin-Gefäße) die Temperatur in der Mikrowelle beeinflussen. Ausführliche Erläuterungen zur Mikrowellen-Technik und zur Steigerung der Sensitivität der Antigenentdeckung finden sich bei SHI et al. (1991). Wichtig ist, daß die Schnitte nicht austrocknen dürfen. Das wird erreicht, indem die Schnitte in unterschiedlichen Pufferlösungen im Mikrowellenherd in Intervallen gekocht werden und dazwischen wieder Pufferlösung nachgefüllt wird (SHI et al., 1991).

Ein weiterer Vorteil der nicht-enzymatischen (MWO) gegenüber der enzymatischen (Trypsin, Pronase) Antigenemaskierung besteht darin, daß endogene Enzyme, wie z.B. die Alkalische Phosphatase, die zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten, durch die Mikrowellenhitze vollständig zerstört werden (CATTORETTI, 1993). Versuche von IGARASHI et al. (1994) dokumentieren, daß Lymphozyten gute Zielscheiben für die Antigen-Wiedergewinnung mit Hilfe dieser Vorbehandlungsmethoden sind.

2.4.1.6. Kreuzreaktivität

Die Interaktion eines Antikörpers mit ähnlichen oder sogar unterschiedlichen Epitopen eines heterologen Antigens, das jedoch nicht ursächlich seine Bildung stimulierte, werden als Kreuzreaktivität bezeichnet (BOENISCH, 1989).

Dieses Phänomen ist üblicherweise eine Eigenschaft von Antikörpern mit geringer Affinität und verändert sich im Laufe der Affinitätsreifung (BOENISCH, 1989). Als Beispiel von Kreuzreaktivitäten zwischen spezifischen Antikörpern und ihren identischen Epitopen auf verschiedenen Proteinmolekülen sind Antikörper gegen leichte Ketten zu nennen, sie reagieren mit allen 5 Immunglobulin-Klassen (BOENISCH, 1989). Eine Kreuzreaktion kann schwächer ausfallen als diejenigen mit dem spezifischen Antigen. Derartige Vorgänge vermitteln Kenntnisse über den Aufbau der antigenen Determinanten, da notwendigerweise strukturelle Ähnlichkeiten zwischen spezifischen Antigenen bestehen müssen, durch die es dann zu Kreuzreaktionen kommt (BOENISCH, 1989). Ebenso werden solche Reaktionen zwischen unterschiedlichen Spezies beobachtet, die nur durch im Interspezies-vergleich hochkonservierte Regionen der für diese Proteine kodierenden DNA-Abschnitte erklärbar sind (JONES et al., 1993).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Material

Als Material werden chirurgisch entfernte Gesäugeveränderungen von 84 betroffenen Hündinnen verwendet, die von Februar 1995 bis März 1997 im nativen Zustand für diese Arbeit aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin überbracht werden.

Eine Hälfte des Materials wird nach der makroskopischen Beschreibung in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren und anschließend bis zur immunhistochemischen Färbung bei -80°C im Stickstoffdampf gelagert. Die zweite Hälfte des Materials wird 24 Stunden in 4% neutral gepufferten Formalin fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet und steht daraufhin sowohl für Routinediagnostik als auch für weitere immunhistochemische Färbungen zur Verfügung.