

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Standort Mitte

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin  
dem Department of Clinical Sciences of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Cambridge

Veterinary Pathology

dem Institut der Interne Geneeskunde der Faculteit der Universiteit Utrecht

Oncologie / Zytologie

**Prognostische Faktoren zur Beurteilung von caninen malignen Lymphomen unter besonderer Berücksichtigung der Bedeutung von argyrophilen Nukleolus organisierenden Regionen (AgNORs)**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Matti Kiupel  
Tierarzt aus Stralsund

Berlin 1999  
Journal Nr. 2235  
Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Hartung

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. V. Bergmann

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Martin

Tag der Promotion: 29. April 1999

---

## Inhaltsverzeichnis

### [1. Zusammenfassung](#)

[1.1. Summary](#)

[1.2. Zusammenfassung](#)

### [2. Einleitung und Zielstellung](#)

### [3. Literaturübersicht](#)

[3.1. Das canine maligne Lymphom: Ein Überblick mit vergleichenden Aspekten zum non-Hodgkin's Lymphom des Menschen](#)

[3.1.1. Einführung](#)

### **3.1.2. Epidemiologie und Aetiologie**

Genetische Faktoren  
Immunreaktionen  
Chemische Karzinogene  
Viren  
Zytogenetik

### **3.1.3. Klinisches Bild**

### **3.1.4. Hämatologische und klinisch-chemische Befunde**

Hämatologie  
Klinisch-chemische Befunde

### **3.1.5. Pathologische Anatomie**

### **3.1.6. Prognose und Therapie**

Biologisches Verhalten und Überlebenszeit  
**Therapie**

Chirurgie  
Endokrine Therapie  
Strahlentherapie  
Chemotherapie  
Immunotherapie

### **3.1.7. Klassifikation von caninen malignen Lymphomen**

Histomorphologie  
Immunophänotyp

## **3.2. Proliferationsaktivität in Tumoren**

### **3.2.1. Einführung**

### **3.2.2. Zellzyklusphasen und Phasen-Index**

PCNA

### **3.2.3. Wachstumsfraktion**

Ki-67 (MIB-1)

### **3.2.4. Zellzyklusgeschwindigkeit**

AgNORs  
Erfassung und Beurteilung von AgNORs

### **3.2.5. Prognostische und diagnostische Bedeutung der beschriebenen Proliferationsmarker**

## **4. Material und Methode**

### **4.1. Material**

Hunde  
Chemotherapie

### **4.2. Methoden**

#### **4.2.1. Färbemethoden**

Übersichtsfärbungen  
Silberimprägnation  
Immunhistologie  
CD3  
CD79a  
Ki-67 (MIB-1)  
PCNA  
Verwendete Lösungen

#### **4.2.2. Erfassung der Parameter**

Histomorphologie  
CD3 und CD79a  
Mitoserate  
PCNA  
Ki-67  
AgNORs

#### **4.2.3. Automatische Mikroskopbildanalyse**

Bildverarbeitungssystem  
AgNOR-Parameter  
Reproduzierbarkeitsmessung

#### **4.2.4. Statistische Auswertung**

Bestimmung der Überlebenszeit und der Responskriterien  
Schätzung von Ausfallrate und Überlebensfunktion  
Weitere graphische Darstellungen

## **5. Ergebnisse**

### **5.1. Klinische Parameter**

Alter  
Geschlecht  
Masse  
Klinisches Stadium

### **5.2. Histomorphologie**

Kiel-Klassifikation  
Working Formulation

### **5.3. Immunophänotyp**

Zelltyp

### **5.4. Proliferationsmarker**

#### **5.4.1. PCNA**

#### **5.4.2. Ki-67**

Vergleich Ki-67 und PCNA

#### **5.4.3. Mitoserate**

#### **5.4.4. AgNORs**

##### **5.4.4.1. Qualitative Beurteilung**

AgNOR-Typ (TYPE)

##### **5.4.4.2. Quantitative Beurteilung**

Erfassung der AgNOR-Anzahl  
Erfassung der AgNOR-Fläche  
Erfassung der AgNOR-Lokalisation

### **5.5. Zusammenfassung der Ergebnisse**

## **6. Diskussion und Schlußfolgerungen**

### **6.1. Prognostisch verwertbare Parameter**

#### **6.1.1. Klinische Parameter**

#### **6.1.2. Histomorphologie**

#### **6.1.3. Proliferationsmarker**

Mitoserate  
PCNA  
Ki-67  
AgNORs

### **6.2. Vergleichende Wertung der Proliferationsmarker**

### **6.3. Schlußfolgerungen**

## **7. Abbildungen**

### **7.1. Histomorphologie**

T- und B-Lymphozytensystem  
Niedrigmaligne Lymphome  
Hochmaligne Lymphome

### **7.2. Immunophänotyp**

T-Zell-Marker CD3  
B-Zell-Marker CD79a

### **7.3. Proliferationsmarker**

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)  
Ki-67  
Argyrophile Nukleolus organisierende Regionen (AgNORs)  
Qualitative Beurteilung  
Quantitative Beurteilung  
Mikroskopbildanalyse

## **8. Tabellen**

### **8.1. Lymphom-Klassifikation**

Rappaport Klassifikation  
Kiel-Klassifikation  
Aktualisierte Kiel-Klassifikation  
Working Formulation

### **8.2. Behandlungsprotokolle**

Utrecht  
Cambridge

### **8.3. AgNORs - Einsatz in der Pathologie**

Arbeiten mit prognostischem Nutzen an Tumoren des Menschen  
Arbeiten ohne prognostischem Nutzen an Tumoren des Menschen  
Arbeiten zur Beurteilung humaner non-Hodgkin's Lymphome  
Arbeiten zur Beurteilung caniner Tumoren

### **8.4. Reproduzierbarkeit**

AgNOR-Parameter und ihre Reproduzierbarkeit

### **8.5. Überlebensanalysen**

Univariate Analyse zur krankheitsfreien Überlebenszeit und zur Überlebenszeit behandelter Hunde mit malignem Lymphom  
Univariate Analyse zur Überlebenszeit unbehandelter Hunde mit malignem Lymphom  
Multivariate Analyse zur krankheitsfreien Überlebenszeit  
Multivariate Analyse zur Überlebenszeit

### **8.6. Überlebenszeiten**

Überlebenszeiten unbehandelter Hunde mit malignem Lymphom  
Überlebenszeiten behandelter Hunde mit malignem Lymphom

## **9. Literaturverzeichnis**

## **10. Abkürzungsverzeichnis**

## **11. Danksagungen**

## **12. Selbständigkeitserklärung**

## **13. Lebenslauf**

---

## **1. Zusammenfassung**

### **1.1. Summary**

#### **Prognostic factors for the evaluation of canine malignant lymphomas with special consideration of the importance of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs)**

Malignant lymphomas are the third most common canine neoplasm and the most common tumour of the hematopoietic system in dogs. The biological behaviour of canine malignant lymphomas is difficult to predict on the basis of histomorphology alone. Recent classifications are complicated and have only minor prognostic value. Therefore, new methods are necessary to develop a simple, prognostic classification. In this regard, the role of proliferate activity has received special attention.

The aim of this study was to investigate the prognostic importance of age, sex, clinical stage, histomorphology, immunophenotype and different proliferation markers, especially AgNORs, for the evaluation of canine malignant lymphomas in treated and untreated dogs and to develop a prognostic useful classification.

Peripheral lymph node biopsies from 122 dogs with malignant lymphoma were evaluated microscopically and immunohistochemically. The extirpated lymph nodes from 87 dogs were studied prior to chemotherapy with a standardised protocol (vincristine, cyclophosphamide, prednisolone, doxorubicin and L-asparaginase). The other 35 dogs did not receive chemotherapy.

Age, sex, weight, tumor stage, histomorphological grade (Kiel classification, Working Formulation), immunophenotype (using markers for CD 3 and CD 79a) and cell proliferation (Ki-67, PCNA, mitotic index and AgNORs) were evaluated as indicators of prognosis. The AgNORs were assessed qualitatively and quantitatively using also image analysis. All markers were used on routinely formalin fixed, paraffin embedded tissues.

Survival measurements, e.g. tumour response, disease free survival time and survival time for treated dogs and survival time only for untreated dogs were compared to the prognostic criteria. Correlations were determined by univariate (74 dogs) and multivariate (53 dogs) logistic regression analysis based on the Cox proportional hazard model regression method with a forward step selection for treated dogs only. Untreated dogs were used as a comparison and important prognostic criteria for the total survival time were determined by univariate logistic regression analysis based on the Cox proportional hazard regression method with a forward step selection. All parameters with P-values less than 0.3 in the univariate analysis were included in the multivariate analysis for treated dogs only. A P-value of 0.05 was considered significant.

Age, sex, weight, tumour stage and histomorphological grade (Kiel classification, Working Formulation) had no prognostic significance for the survival time of untreated dogs and for the survival time and disease free survival time of treated dogs with malignant lymphoma. The mitotic index was not significant for the prognosis of survival time of untreated dogs, where as the proliferation marker Ki-67 (P = 0.001) and PCNA (P = 0.001) were only significant for the prognosis of survival for single groups of untreated dogs with malignant lymphoma. The maximal distance between two AgNORs (MAXDIST, P = 0.025) and the maximal AgNOR area (MAXNOR, P = 0.026) had a similar importance. Mean AgNOR number (NORNBC, P = 0.001), mean AgNOR area (MEANAR, P = 0.001), AgNOR location (LOCAT, P = 0.048), number of peripherally located AgNORs (BORDER, P = 0.027) and AgNOR type (P = 0.004) were valuable prognostic markers for the survival time of untreated dogs with malignant lymphoma. However, these results are based on the univariate survival analysis only.

In the multivariate analysis immunophenotype (P = 0.027), mean AgNOR area (MEANAR, P = 0.001), maximal distance between two AgNORs (MAXDIST, P = 0.009), ratio AgNOR area/nucleus (AR\_RAT, P = 0.008) and total AgNOR area (S\_AREA, P = 0.003) were of prognostic significance for the total survival time of treated dogs with malignant lymphoma. However, the total AgNOR area (S\_AREA, P = 0.003) was only significant for the prognosis of survival for single groups of treated dogs with malignant lymphoma. Mitotic index (P = 0.028), PCNA (P = 0.009),

Ki-67 ( $P = 0,087$ ), mean AgNOR number (NORNBC,  $P < 0,001$ ), maximal AgNOR area (MAXNOR,  $P = 0,001$ ), AgNOR location (LOCAT,  $P = 0,019$ ), and AgNOR type ( $P = 0,008$ ) were only significant for the prognosis of survival for single groups of treated dogs with malignant lymphoma in the univariate analysis. Mean AgNOR number (NORNBC,  $P = 0,001$ ), mean AgNOR area (MEANAR,  $P = 0,001$ ), total AgNOR area (S\_AREA,  $P = 0,001$ ) and maximal AgNOR area (MAXNOR,  $P = 0,01$ ) were significant in the multivariate analysis for the prognosis of disease free survival of treated dogs with malignant lymphoma. The mean AgNOR number (NORNBC,  $P = 0,001$ ) was the most valuable prognostic marker for the disease free survival time. Mitotic index ( $P = 0,02$ ) and AgNOR type ( $P = 0,012$ ) were only significant in the univariate analysis for the prognosis of disease free survival for single groups of treated dogs with malignant lymphoma.

Immunophenotype and AgNORs were the most important prognostic markers for the treatment of canine malignant lymphomas. Longer survival time of treated dogs with malignant lymphoma correlated with B-cell type lymphomas, a larger mean AgNOR area, a shorter distance between two AgNORs, and a smaller ratio AgNOR area/nucleus. Longer disease free survival time correlated with a smaller mean AgNOR number per nucleus.

The immunophenotype, the mean AgNOR number (NORNBC) and the mean AgNOR area (MEANAR) were the most simple to evaluate and prognostically most important of all investigated parameters. The use of these three parameters only allows to separate high risk dogs with a low change of survival from dogs with possible survival times of up to three years, if treated with chemotherapy. The evaluation of additional AgNOR parameters would increase the accuracy of the prognostic classification, however the necessary computer equipment might present a too high of a cost factor for many small animal veterinary practices. In addition to a quantitative AgNOR analysis, AgNOR pattern distribution is a useful and simple diagnostic tool in predicting survival time. The here proposed classification based on AgNOR types had only in the univariate analysis prognostic value for the survival time of untreated dogs and for the disease free survival time and survival time of single groups of treated dogs with malignant lymphoma. In contrast the maximal distance between two AgNORs (MAXDIST) and the ratio AgNOR area/nucleus (AR\_RAT) were important prognostic factors for the disease free survival time of treated dogs with malignant lymphoma. AgNOR pattern distribution should be further investigated with special reference to these two parameters to develop a classification for the prognostic evaluation of canine malignant lymphomas. At this point of time the here proposed AgNOR type classification combined with the evaluation of the immunophenotype and the mean AgNOR number is the fastest, most accurate and easiest to afford method for the prognostic evaluation of canine malignant lymphomas.

The value of prognostic markers becomes clear with the use of chemotherapy due to longer survival times of treated dogs compared to untreated dogs. Survival times of approximately 2 months only for untreated dogs with malignant lymphoma, early euthanasia after diagnosis and a small total number of cases prevented a multivariate survival analysis and permitted only indicative results with the univariate survival analysis.

The results of this work proof the possibility and importance of a prognostic evaluation of canine malignant lymphomas. An important issue is the use of all markers for a prognostic analysis on routinely formalin fixed, paraffin embedded tissues. Such material may be collected and processed or submitted for further evaluation in any small animal veterinary practice without significant additional costs and time efforts.

## 1.2. Zusammenfassung

Maligne Lymphome sind die dritthäufigste Neoplasie und der häufigste Tumor des hämatopoetischen Systems des Hundes. Das biologische Verhalten caniner maligner Lymphome histomorphologisch vorherzusagen ist schwierig, und die derzeit verwendeten Klassifikationen sind kompliziert in ihrer Anwendung und haben nur geringe prognostische Signifikanz. Neue Methoden werden deshalb benötigt, um unkomplizierte, prognostisch orientierte Klassifikationen zu entwickeln. Dabei hat die Rolle der Proliferationsaktivität besondere Aufmerksamkeit erlangt.

Das Ziel dieser Studie war die Bewertung der klinischen Beurteilung, der histomorphologischen Klassifizierung, des Immunphänotyps und verschiedener Proliferationsmarker, insbesondere AgNORs, für die Prognose caniner maligner Lymphome in behandelten und unbehandelten Hunden, wobei der Versuch unternommen werden sollte, eine prognostisch aussagekräftige Klassifikation zu erarbeiten.

Es wurden 122 periphere Lymphknotenbiopate von 122 Hunden mit malignem Lymphom histologisch und immunhistologisch untersucht. Nach erfolgter Biopsie waren 87 der untersuchten Hunde mit Chemotherapie nach einem standardisierten Protokoll (Vincristin, Cyclophosphamid, Prednisolon, Doxorubicin und L-Asparaginase) behandelt worden, wogegen 35 Hunde unbehandelt blieben.

Das Alter, das Geschlecht, die Masse, das klinische Stadium, der histomorphologische Malignitätsgrad (Kiel-Klassifikation, Working Formulation), der Immunphänotyp (T-Zell-Marker CD3 und B-Zell-Marker CD79a) und die Zellproliferation (Ki-67, PCNA, Mitoserate und AgNORs) wurden auf ihre prognostische Bedeutung analysiert. Die AgNORs wurden sowohl qualitativ als auch quantitativ mit und ohne Hilfe der Mikroskopbildanalyse bewertet. Alle Marker wurden an routinemäßig formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe eingesetzt.

Als Überlebensparameter wurden die Reaktion des Tumors auf die Behandlung, die krankheitsfreie Überlebenszeit und die Überlebenszeit für behandelte Hunde und die Überlebenszeit für unbehandelte Hunde erfaßt. Die prognostische Signifikanz der zuvor beschriebenen Parameter für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden wurde mittels univariater (74 Hunde) und multivariater (53 Hunde) Überlebensanalyse („multivariate logistic regression analysis based on the Cox proportional hazard model regression method with a forward step selection“) untersucht. Unbehandelte Hunde wurden aus Vergleichsgründen untersucht und bedeutende prognostische Kriterien für die Überlebenszeit mittels univariater Überlebensanalyse („univariate logistic regression analysis based on the Cox proportional hazard model regression method with a forward step selection“) bestimmt. Alle Parameter für behandelte Hunde mit P-Werten kleiner 0,3 in der univariaten Analyse wurden mittels multivariater Analyse ausgewertet. Ein P-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit) von 0,05 wurde als signifikant erachtet.

Das Alter, das Geschlecht, die Masse, das klinische Stadium und der histomorphologische Malignitätsgrad (Kiel-Klassifikation, Working Formulation) hatten keine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit von unbehandelten Hunden und für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom. Die Mitoserate war prognostisch nicht signifikant für die Überlebenszeit von unbehandelten Hunden, während die Proliferationsmarker Ki-67 ( $P = 0,001$ ) und PCNA ( $P = 0,001$ ) nur prognostisch signifikant für einzelne Gruppen von Hunden waren. Eine ähnliche Bedeutung hatten der maximale Abstand zwischen zwei AgNORs (MAXDIST,  $P = 0,025$ ) und die maximale AgNOR-Fläche (MAXNOR,  $P = 0,026$ ). Prognostisch bedeutsame Parameter für die Überlebenszeit von unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom waren die durchschnittliche AgNOR-Anzahl (NORNBC,  $P = 0,001$ ), die durchschnittliche AgNOR-Fläche (MEANAR,  $P = 0,001$ ), die Lage der AgNORs im Zellkern (LOCAT,  $P = 0,048$ ), die Anzahl randständiger AgNORs (BORDER,  $P = 0,027$ ) und der AgNOR-Typ ( $P = 0,004$ ). Allerdings wurden diese Angaben nur mit der univariaten Überlebensanalyse ermittelt.

Bei der Bewertung der Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom waren der Immunphänotyp ( $P = 0,027$ ), die durchschnittliche AgNOR-Fläche (MEANAR,  $P = 0,001$ ), der maximale Abstand zwischen zwei AgNORs (MAXDIST,  $P = 0,009$ ), das Verhältnis zwischen der AgNOR-Summenfläche und der Zellkernfläche (AR\_RAT,  $P = 0,008$ ) und die AgNOR-Summenfläche (S\_AREA,  $P = 0,003$ )

prognostisch signifikant in der multivariaten Analyse, wobei die AgNOR-Summenfläche (S\_AREA,  $P = 0,003$ ) nur eine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit von einzelnen Gruppen behandelter Hunde mit malignem Lymphom hatte. Mitoserate ( $P = 0,028$ ), PCNA ( $P = 0,009$ ), Ki-67 ( $P = 0,087$ ), durchschnittliche AgNOR-Anzahl (NORNBC,  $P < 0,001$ ), maximale AgNOR-Fläche (MAXNOR,  $P = 0,001$ ), Lage der AgNORs im Zellkern (LOCAT,  $P = 0,019$ ) und AgNOR-Typ ( $P = 0,008$ ) hatten nur in der univariaten Analyse eine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit von einzelnen Gruppen behandelter Hunde mit malignem Lymphom. Die durchschnittliche AgNOR-Anzahl (NORNBC,  $P = 0,001$ ), die durchschnittliche AgNOR-Fläche (MEANAR,  $P = 0,001$ ), die AgNOR-Summenfläche (S\_AREA,  $P = 0,001$ ) und die maximale AgNOR-Fläche (MAXNOR,  $P = 0,01$ ) waren prognostisch signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit in der multivariaten Analyse, wobei sich die durchschnittliche AgNOR-Anzahl (NORNBC,  $P = 0,001$ ) als prognostisch wichtigster Parameter herausstellte. Mitoserate ( $P = 0,02$ ) und AgNOR-Typ ( $P = 0,012$ ) hatten nur in der univariaten Analyse eine prognostische Bedeutung für die krankheitsfreie Überlebenszeit von einzelnen Gruppen behandelter Hunde mit malignem Lymphom.

Der Immunophänotyp und AgNORs sind die wichtigsten prognostischen Marker für die Behandlung caniner maligner Lymphome. Eine längere Überlebenszeit behandelter Hunde mit malignem Lymphom korrelierte mit Lymphomen vom B-Zell-Typ, einer größeren durchschnittlichen AgNOR-Fläche, einem kleineren Abstand zwischen zwei AgNORs und einem kleineren Verhältnis zwischen der AgNOR-Summenfläche und der Zellkernfläche. Eine längere krankheitsfreie Überlebenszeit korrelierte mit einer kleineren AgNOR-Anzahl pro Zellkern.

Der Immunophänotyp, die durchschnittliche AgNOR-Fläche (MEANAR) und die durchschnittliche AgNOR-Anzahl (NORNBC) waren die am leichtesten erfaßbaren und prognostisch bedeutensten Parameter. Schon unter Einsatz dieser drei Parameter ist eine Trennung zwischen Risikohunden mit niedrigen Überlebenschancen und Hunden mit Überlebenszeiten von bis zu drei Jahren unter Einsatz von Chemotherapie möglich. Die Erfassung weiterer AgNOR-Parameter würde zwar einer genaueren prognostischen Klassifizierung dienen, setzt jedoch die Benutzung entsprechender Computersoftware voraus und dürfte somit für viele kleinere Laboratorien einen zu hohen Kostenaufwand darstellen. Neben der Erfassung quantitativer AgNOR-Parameter stellen deshalb Verteilungsmuster von AgNORs einen einfachen und nützlichen diagnostischen Parameter zur Indikation der Überlebenszeit dar. Die hier vorgeschlagene Klassifikation basierend auf dem AgNOR-Typ hatte nur in der univariaten Analyse eine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit unbehandelter Hunde mit malignem Lymphom und für die krankheitsfreie Überlebenszeit und die Überlebenszeit von einzelnen Gruppen behandelter Hunde mit malignem Lymphom. Allerdings waren das Verhältnis zwischen der AgNOR-Summenfläche und der Zellkernfläche (AR\_RAT) und der maximale Abstand zwischen zwei AgNORs (MAXDIST) wichtige prognostische Faktoren für die krankheitsfreie Überlebenszeit behandelter Hunde mit malignem Lymphom. Das Verteilungsmuster von AgNORs sollte weitergehend unter besonderer Berücksichtigung dieser beiden Parameter untersucht werden, um ein Klassifikationsschema für die prognostische Bewertung caniner maligner Lymphome zu entwickeln. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt bietet die hier vorgeschlagene AgNOR-Typenklassifikation, gekoppelt mit der Bestimmung des Immunophänotyp und der AgNOR-Anzahl, das schnellste, kostengünstigste und akkurateste Verfahren zur prognostischen Analyse caniner maligner Lymphome.

Die Bedeutung prognostischer Marker wird erst mit der Verwendung von Chemotherapie deutlich, da die Überlebenszeiten behandelter Hunde wesentlich länger waren, als die Überlebenszeiten unbehandelter Hunde. Überlebenszeiten von durchschnittlich nur zwei Monaten von unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom, eine frühzeitige Euthanasie nach Diagnosestellung und eine kleine Untersuchungsanzahl verhinderten eine multivariate Analyse für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom und lassen die Resultate der univariaten Analyse nur indikativ erscheinen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die Möglichkeit und den Nutzen einer prognostischen Bewertung caniner maligner Lymphome. Ein entscheidender Gesichtspunkt ist hierbei die Verwendbarkeit von routinemäßig formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe zur prognostischen Analyse. Derartiges Material kann ohne größeren Zeit- und Kostenaufwand in der tierärztlichen Praxis gewonnen und entweder weiterverarbeitet oder verschickt werden.

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 2. Einleitung und Zielstellung

Die prognostische Beurteilung caniner maligner Lymphome ist schwierig. Zwar konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, daß histomorphologische und immunologische Klassifikationen eine gewisse prognostische Signifikanz haben, allerdings wird die Mehrzahl von caninen malignen Lymphomen nach den meisten Klassifikationen als „hochgradig“ beurteilt. Trotzdem gibt es innerhalb dieser Gruppe Differenzen hinsichtlich der Präsentation des Krankheitsbildes und des klinischen Verlaufs sowie dem Ansprechen auf die Behandlung und in der Prognose. Der Mangel einer prognostisch orientierten Klassifikation trägt neben den hohen Kosten, den auftretenden Nebenwirkungen und den Gefahren der verwendeten Substanzen für die menschliche Gesundheit trotz des nachgewiesenen Erfolges nur zu einem spärlichen Einsatz der Chemotherapie in der Behandlung caniner maligner Lymphome bei. Zusätzliche Parameter werden deshalb benötigt, um den praktizierenden Tierarzt mit einer schnellen, kostengünstigen und akkuraten prognostischen Analyse caniner maligner Lymphome die Grundlagen für eine erfolgreiche chemotherapeutische Behandlung zu bieten. Eine weitere Anforderung an zukünftige Klassifikationen ist die Verwendung von routinemäßig formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material. Nur eine an Routinematerial durchzuführende Klassifikation wird sich auf die Dauer in der veterinärmedizinischen Praxis durchsetzen. Die Proliferationsaktivität caniner maligner Lymphome hat deshalb in den letzten Jahren besondere Aufmerksamkeit erlangt.

Das Ziel dieser Arbeit ist eine prognostische Beurteilung caniner maligner Lymphome. Untersucht wurden 35 unbehandelte und 87 mit Chemotherapie behandelte Hunde mit malignen Lymphomen. Als Überlebensparameter wurden die Überlebenszeit und zusätzlich nach erfolgter Chemotherapie die Tumorrespons und die krankheitsfreie Überlebenszeit erfaßt. Diese Werte wurden mit dem Alter, dem Geschlecht, dem klinischen Stadium der Hunde, der histomorphologischen Klassifizierung der Lymphome, einschließlich des Immunophänotyps, und der Proliferationsaktivität der Tumoren verglichen. Die Proliferationsaktivität wurde charakterisiert durch Mitoserate, PCNA, Ki-67 und AgNORs. Letztere wurden sowohl qualitativ als auch quantitativ beurteilt.

Die Ergebnisse der Anwendung verschiedener Proliferationsmarker, insbesondere der AgNORs, sollen verglichen und auf ihre prognostische Wertigkeit geprüft werden. Besondere Beachtung gilt hierbei der prognostischen Signifikanz der untersuchten Parameter für die Überlebensdaten chemotherapeutisch behandelter Hunde. Nur unter dem Aspekt einer Behandlung erscheint eine solche Untersuchung sinnvoll, da die kurzen Überlebenszeiten von unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom eine solche Charakterisierung sowohl aus medizinischer, ökonomischer und auch statistischer Sicht nicht dringend notwendig erscheinen läßt. Als Ergebnis dieser Analyse wird die Erarbeitung einer schnell und einfach durchzuführenden, ökonomisch vertretbaren prognostischen Klassifikation caniner maligner Lymphome angestrebt. Eine solche Klassifikation soll existierende Vorurteile gegen eine chemotherapeutischen Behandlung in der Tierärzteschaft abbauen und dem praktizierenden Tierarzt helfen,

eine chemotherapeutische Behandlung nach medizinischen und ökonomischen Gegebenheiten einzusetzen.

Im Literaturteil dieser Arbeit wird besonders auf einen Vergleich des caninen malignen Lymphoms mit dem non-Hodgkin's Lymphom des Menschen eingegangen, da sowohl die histologische Klassifikation, als auch die Beurteilungskriterien für die Proliferationsmarker und die Behandlungsprotokolle der Chemotherapie ihren Ursprung in der Humanmedizin haben.

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

### 3. Literaturübersicht

#### 3.1. Das canine maligne Lymphom: Ein Überblick mit vergleichenden Aspekten zum non-Hodgkin's Lymphom des Menschen

##### 3.1.1. Einführung

Tumoren des lymphatischen Systems treten mit großer Häufigkeit bei den Haussäugetieren auf. Die vielfältigen Erscheinungsformen und die komplexe Biologie des lymphatischen Gewebes haben zu unterschiedlichen Namen geführt und dadurch Verwirrung in der Nomenklatur und in der Klassifikation verursacht. Oft werden auch Begriffe aus der Humanmedizin verwendet, und dies steigert zusätzlich bei auftretenden Unterschieden die Konfusion. So werden beim Menschen Hodgkin's und non-Hodgkin's Lymphome unterschieden.

Für den Hund ist eine solche Trennung nach dem gegenwärtigen Stand der Wissenschaft wenig sinnvoll, da selbst die wenigen Veröffentlichungen zum Auftreten der Hodgkin's Disease (Moulton et Bostick 1958) korrigiert wurden (Moulton 1990). Hinzu kommt, daß alle diesbezüglichen Berichte mit ausführlicher Histopathologie (Simon et al. 1964, Wells 1974) älter als 20 Jahre sind. Mit dem gestiegenen Erkenntnisstand über das lymphatische Gewebe und seine Tumoren kann davon ausgegangen werden, daß die beim Hund auftretenden malignen Lymphome mit dem non-Hodgkin's Lymphom des Menschen (NHL) vergleichbar sind.

Verbesserungen in der Diagnostik und der Behandlung von caninen malignen Lymphomen (CML), die durch den Hundebesitzer auch zunehmend gefordert werden, haben das Interesse an diesen hämatopoetischen Tumoren ständig erhöht. Der nachfolgende Überblick dient der Zusammenfassung der wichtigsten Fakten über das CML im Vergleich zum NHL. Eine solche Gegenüberstellung ist notwendig, da sich die Klassifikation und die Behandlung des CML auf in der Humanmedizin entwickelte Modelle stützen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Ein weiterer Gesichtspunkt sind die möglichen Vorteile der Anwendung des CML als Tiermodell für das NHL (Pierrepont 1985) auf Grund des gleichen Lebensraumes, des einfachen Umgangs mit Hunden und der relativ problemlosen Medikamentenapplikation (Owen et al. 1975a).

##### 3.1.2. Epidemiologie und Ätiologie

Die Literatur über **CML** ist sehr umfangreich. Schon in der Bezeichnung existieren große Unterschiede. Die Begriffe Lymphom, malignes Lymphom und Lymphosarkom werden heute synonym genutzt, wobei darunter ein Tumor des lymphatischen Systems mit Ursprung in einem soliden Organ (z. B. Lymphknoten, Milz, Leber etc.) verstanden wird. Nach Capurro et al. (1992) handelt es sich beim Lymphom des Hundes um eine lymphoproliferative Erkrankung, die aus einer klonalen Proliferation von malignen Lymphozyten entsteht.

Siedamgrotzky (1871) beschrieb als erster die „lymphatische Leukämie“ des Hundes mit Lymphknoten- und Milzvergrößerungen und einem Verhältnis von weißen zu roten Blutzellen von 1 zu 15.

Eine detaillierte pathologische Beschreibung der „Leukose“ des Hundes veröffentlichten Bloom et al. (1945). Sie stellten eine jährliche Inzidenz von 0,2% und ein durchschnittliches Erkrankungsalter von 9,08 Jahren fest und verwendeten den Begriff „malignes Lymphom“ für diese Krankheit.

Bäckgren veröffentlichte 1965 eine Arbeit, in der er die Erkrankungshäufigkeit von Hunden mit **CML** in Teilen Schwedens mit 0,2% angab. Nach Dorn (1976) beträgt die jährliche Erkrankungsrate von Hunden mit malignen Lymphomen 13 bis 24 auf 100 000 Tiere. Capurro et al. (1992) bezeichnen das CML als die dritthäufigste Neoplasie des Hundes mit einer jährlichen Inzidenz von 5 - 7% aller Tumorerkrankungen und 83% der Tumoren des hämatopoetischen Systems. In den Niederlanden wird im Jahr etwa 400 mal ein canines malignes Lymphom diagnostiziert (Teske 1993), was unter Berücksichtigung der Gesamthundepopulation eine jährliche Erkrankungshäufigkeit von 33 auf 100 000 Tiere widerspiegelt.

Weder Bäckgren (1965) noch Dorn et al. (1967) konnten eine geschlechtsgebundene Disposition feststellen. Dies deckt sich mit den Auffassungen von Jarrett et al. (1966), Parodi et al. (1968), Madewell (1986) und Gendron-Fitzpatrick (1986). Nur Cohen et al. (1961) und Van Pelt et Connor (1968) beschrieben eine weibliche Dominanz. Untersuchungen von Schneider (1983) ergaben ein geringeres Risiko für kastrierte Rüden gegenüber unkastrierten.

Ähnlich decken sich die Aussagen oben genannter Autoren zum Alter erkrankter Tiere. Lymphome können bei Hunden jeden Alters auftreten; die größte Erkrankungshäufigkeit liegt jedoch bei einem Alter von 6,3 bis 7,7 Jahren. Dabei erhöht sich die Anzahl von 1,5 pro 100 000 Hunde jünger als 1 Jahr auf 84 pro 100 000 Hunde im Alter von 10 bis 11 Jahren (Capurro et al. 1992).

Beim **Menschen** tritt das NHL häufiger beim männlichen Geschlecht auf. Ebenso steigt mit zunehmendem Alter die Erkrankungshäufigkeit (Bernard 1988).

Die Ätiologie des CML wie auch des NHL ist noch unzureichend geklärt. Verschiedenste Faktoren, wie Infektionen, chemische oder physikalische Einflüsse oder auch beim Menschen soziale und kulturelle Gegebenheiten wurden untersucht, ohne eine eindeutige Assoziation zwischen der Krankheit und ihrer Entstehung finden zu können (Bernard et al. 1984). Trotzdem sollen hier einige mögliche Ursachen näher betrachtet werden.

##### Genetische Faktoren

Priester (1967) geht davon aus, daß es auf Grund hereditärer Vorraussetzungen Rassedispositionen für die Erkrankung an **CML** gibt. So konnte er eine hohe Inzidenz für Boxer nachweisen, wobei unklar ist, ob es sich um eine generelle Disposition für alle Tumoren oder nur Lymphome handelt. Andere Arbeiten sprechen von einer Lymphomdisposition für Scotch Terrier, Bassets, Airdale Terrier und Bulldoggen (Bäckgren 1965, Dorn et al. 1970). Für den Mastiff konnte Onions (1984) eine Erkrankungshäufigkeit von 5000 Fällen auf 100 000 Hunde nachweisen. Rassen mit niedrigem

Risiko sind z. B. Dackel oder Vorstehhunde.

Die Theorie einer hereditären Ursache wird gestützt durch familiäre Häufungen von malignen Lymphomen bei Mastiffs (Onions 1984), Rottweilern und Otterhunden (Teske et al. 1993b). Diese können jedoch auch auf Umwelteinflüssen oder Infektionen basieren. Hardy (1976) analysiert den hereditären Faktor unter dem Gesichtspunkt einer generellen Tumordisposition von Boxern und Cocker Spaniels gegenüber Beagles oder Kreuzungen und kommt zu drei möglichen Ursachen: 1. Eine intensive Zucht von „Moderassen“ könnte zu einer Selektion von Onkogenen gemeinsam mit dem gewünschten Zuchtziel führen. 2. Nach einer solchen Selektion wäre die genetische Weitergabe an die Nachzucht denkbar. 3. Bestimmte Rassen könnten ein genetisch defizientes Immunsystem aufweisen, welches nicht in der Lage ist, das Wachstum von Tumoren zu verhindern.

Auch beim **Menschen** sind familiäre Dispositionen für die Erkrankung an NHL bekannt (Bernard 1988). So erkannten Bartel (1978) und Bernard et al. (1984), daß sowohl jüdische Emigranten aus Westrußland, als auch israelische Juden eine 2-4fach höhere Erkrankungshäufigkeit zeigten. Abramson et al. (1975) kamen zu ähnlichen Ergebnissen und wiesen nach, daß die Häufigkeit von NHL bei über 50jährigen, in Israel geborenen Juden die Erkrankungshäufigkeit in anderen Ländern deutlich übersteigt. Nicht geklärt ist, ob die Ursache dafür genetischen Ursprungs ist oder auf Umwelteinflüssen beruht (Abramson et al. 1975, Bernard 1988).

Lynch et al. (1992) beschreiben in einem Literaturüberblick die verschiedenen familiären Aggregationen von NHL und ziehen, wie auch Hardy (1976), die Möglichkeit eines genetisch defizienten Immunsystems in Betracht.

## Immunreaktionen

Lymphome stellen eine heterogene Gruppe von Neoplasien des Immunsystems dar. Es wird vermutet, daß Fehler im Immunsystem der Grund für eine Geschwulstbildung sind.

So bewiesen Owen et al. (1975b) eine deutlich schwächere humorale und auch zellvermittelte Immunantwort in **Hunden** mit malignem Lymphom. Dabei erhebt sich die Frage, ob diese Immunsuppression Folge oder Ursache der Entwicklung von malignen Lymphomen ist. Teske et al. (1993c) gehen davon aus, daß auf Grund gleicher Immunkompetenz in Hunderassen mit verschiedenem Erkrankungsrisiko die Immunsuppression wahrscheinlich als Folge der Erkrankung auftritt.

Verschiedene Autoimmunerkrankungen wurden mit den unterschiedlichsten Neoplasien des Hundes in Verbindung gebracht (Darke et al. 1975). Keller (1992) konnte zeigen, daß gegenüber Lupus- und Pemphigus-Erkrankungen, autoimmuner Polyarthritits und hämolytischer Anämie nur die immunvermittelte Thrombozytopenie mit einer signifikanten Erkrankungshäufigkeit (5,61) an malignen Lymphomen einhergeht. Dabei waren weder Alter, Geschlecht noch Kastration von Einfluß auf die Prävalenz. Auch in dieser Studie wurde der Ursache - Wirkungs - Zusammenhang nicht näher untersucht.

Besonders erwähnenswert ist noch eine Arbeit von Owen (1971). Er konnte durch Transplantation von Tumorzellen eines Hundes mit lymphozytärer Leukämie auf Hundefeten wiederum eine lymphozytäre Leukämie hervorrufen. Weder mit gesunden Hundewelpen noch mit immunsuppressiven Welpen oder mit Tieren, die Röntgenstrahlung ausgesetzt wurden, gelang dieser Versuch. Zwar ist der Zusammenhang zwischen CML und lymphozytärer Leukämie nicht bewiesen, dennoch gibt diese Arbeit Anhaltspunkte zur Rolle des Immunsystems bei der Entstehung von malignen Lymphomen.

In den letzten 10 Jahren hat sich die Anzahl von Publikationen aus der Humanmedizin erhöht, welche eine Assoziation zwischen Autoimmunerkrankungen und Neoplasien vermuten (McCarty 1985). Beim **Menschen** erhöht sich das Risiko der Entstehung von NHL durch spontane oder iatrogene Immunsuppression. Penn (1984) geht von 43% NHL, bezogen auf die Gesamtheit der sich aus Immunsuppressionen entwickelnden Tumoren, aus. Die Prävalenz von NHL ist ähnlich hoch für Patienten nach einer Organtransplantation. Ebenso wurden durch Janowska-Wieczorek et al. (1987) Immundefekte als sekundäre Ursache nach Erkrankung an NHL beschrieben.

## Chemische Karzinogene

Hayes et al. veröffentlichten 1991 eine Arbeit, in der er einen Zusammenhang zwischen dem Gebrauch von Herbiziden mit 2,4-Dichlorphenoxyacetat durch Farmer und der Ausbildung von malignen Lymphomen bei ihren **Hunden** postulierte. Auch wenn ein solches Sentinel von großem Nutzen für die Humanmedizin wäre, müssen doch Zweifel an der Richtigkeit der Aussage angemeldet werden. Die Veröffentlichung wurde durch ein Expertengremium analysiert und als unbewiesen befunden (Carlo et al. 1992).

Schon 1976 publizierte Hardy eine Aufstellung möglicher Karzinogene und verursachter caniner Tumore. Trotzdem ist auf diesem Gebiet, sowohl was die Ursache als auch was die Erkennung von Karzinogenen anbelangt, vieles noch hypothetisch.

In der Humanmedizin ist die hohe Gefährdung des **Menschen**, Sarkome durch den Kontakt mit Phenoxyssäuren oder Chlorophenolen zu entwickeln, schon länger erwiesen (Eriksson et al. 1981). Dies wurde früher durch die häufige Kontamination dieser Stoffe mit polychlorierten Dibenzodioxinen (PCDD) oder Dibenzofuranen (PCDF) begründet. Mit dem Verbot dieser Chemikalien wurden nicht nur in der Landwirtschaft sondern auch in der Forstwirtschaft 2,4-Dichlorphenoxyacetat und 4-Chloro-2-methylphenoxyacetat sowie korrespondierende Phenoxypropionsäuren als Herbizide eingesetzt. Um so bedeutender war die Arbeit von Hardell et al. (1981), in der er ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von NHL durch Kontakt mit Phenoxyssäuren, Chlorophenolen und organischen Lösungsmitteln nachwies. Die Ursache ist unklar, auch wenn häufig eine durch diese Stoffe verursachte Immunsuppression vermutet wird, was auch die kanzerogene Wirkung einiger anderer Chemikalien erklären könnte (Bernard 1988).

## Viren

Die Bedeutung von Viren für die Ätiologie des **CML** ist bis zum heutigen Tag nicht geklärt. Zwar gelangen Moldovanu et al. (1966b) die zelluläre Transplantation von spontanen malignen Lymphomen und Owen (1971) das gleiche für die lymphozytäre Leukämie; eine zellfreie Übertragung konnte dagegen nie bewiesen werden.

Retroviren sind bekannt als Ursache lymphatischer Tumoren bei verschiedenen Tierarten, z. B. Katzen, Hühnern oder Rindern; einen Überblick gibt



Klein (1980). Beim Hund existieren Veröffentlichungen über den elektronenmikroskopischen Nachweis von Retrovirus-ähnlichen Partikeln in niedriger Konzentration in malignen Lymphomen (Seman et al. 1967, Rudolph 1971) und von virusähnlichen Partikeln bei Retikulumzell-Leukämie (Chapman et al. 1967). Andere Studien konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen (Rangan et al. 1971). Onions (1980) bewies die Aktivität von reverser Transkriptase in 3 von 14 Zellkulturen und in 2 von 11 Biopaten von CML (siehe auch Armstrong et al. 1981). Tomley et al. fanden 1983 in 69 - 76% der Zellkulturen von Lymphomen die Aktivität von reverser Transkriptase. Im Vergleich dazu ergab das lymphatische Gewebe von gesunden Hunden nur bei 17 - 24% eine positive Reaktion. Allerdings war die Isolation eines Virus nicht möglich. Bisher gelang nur die Isolierung eines unbekanntes Retrovirus mit der Morphologie eines Lentivirus aus den mononukleären Zellen einer Blutprobe eines leukämischen Hundes (Safran et al. 1992). Eine immunologische Kreuzreaktion mit bekannten Lenti- und Onkoviren wurde nicht gefunden. In diesem Zusammenhang ist auch der Nachweis von Antikörpern in caninem Serum gegen das Core-Protein von Lentiviren von Interesse (Strandström et al. 1990). Zusätzlich zu seiner möglichen Bedeutung für die Ätiologie caniner maligner Lymphome könnte sich das Lentivirus des Hundes als nützliches Modell für HIV herausstellen.

Für den **Menschen** ist die Virusätiologie einzelner NHL erwiesen. Wichtig scheint hierbei die Suppression des Immunsystems zu sein. So konnte eine Assoziation zwischen AIDS und B-Zell-Lymphomen gefunden werden. Ob es sich dabei um eine direkte Wirkung von HIV handelt oder die Immunsuppression die entscheidende Voraussetzung für eine Erkrankung darstellt, bleibt zu ergründen (Levine 1990). Das Epstein-Barr-Virus, das eine bedeutende Rolle bei der endemischen Form des Burkitt's Lymphome spielt, tritt ebenfalls besonders bei Personen mit erworbener oder angeborener Immunschwäche auf (Mueller et al. 1992). Das bekannte humane T-lymphotrope Virus Typ I (HTLV-I) ist in seiner geographischen Ausbreitung begrenzt und verursacht nur bei etwa 5% positiver Patienten eine T-Zell-Leukämie oder Lymphome (Mueller et al. 1992).

Wenn auch Viren die Hauptursache für die steigende Erkrankungshäufigkeit der Menschen an NHL sind, so sollte ein zusätzliches Augenmerk auf den in den letzten Jahren gestiegenen immunsuppressiven Umwelteinflüssen ruhen.

## Zytogenetik

Nur wenige Veröffentlichungen existieren auf dem Gebiet der zytogenetischen Analyse von normalem oder neoplastischem lymphatischem Gewebe des **Hundes**. Im Vergleich zum Menschen (46 Chromosomen) besitzen Hunde eine hohe Chromosomenzahl (78). Da außer den zwei submetazentrischen Geschlechtschromosomen alle anderen Chromosomen telozentrisch sind und große morphologische Ähnlichkeit aufweisen, ist ihre Identifizierung sehr schwer (Grindem et Buoen 1986).

Zytogenetische Abnormalitäten konnten bisher nicht mit spezifischen Tumoren des lymphatischen Systems in Verbindung gebracht werden. Zwar fanden Grindem et Buoen (1986) Hyperdiploidie und Hypodiploidie sowie extra-metazentrische Chromosomen bei leukämischen Hunden, aber weder der dafür verantwortliche Mechanismus, noch die klinische Relevanz sind bekannt. Hahn et al. (1994) bewiesen, daß eine Trisomie als primäre Chromosomenaberration einen signifikanten prognostischen Parameter für eine längere Überlebenszeit darstellt. Im Unterschied zum Menschen sind die primären Chromosomenaberrationen in CML eher numerischer als struktureller Natur. Eine Assoziation dieser Veränderungen mit der Tumorentstehung wurde bisher nicht gefunden.

Für das NHL des **Menschen** konnte die reziproke Translokation von genetischem Material als Ursache für Störungen in der Eiweißsynthese und nachfolgender Induzierung des Tumorwachstums bewiesen werden. So spielt die Kopplung des Pro-Onkogens *myc* mit Immunglobulin produzierenden Genen eine entscheidende Rolle bei der unkontrollierten Proliferation von Burkitt's Lymphomen (Le Beau 1990). In folliculären Lymphomen konnte eine Translokation des *BCL2* Onkogens und eines Immunglobulin produzierenden Gens nachgewiesen werden (McKeithan 1990). In einer multivariaten Analyse zeigten Kristoffersson et al. (1987), daß charakteristische Chromosomenveränderungen mit der Überlebenszeit korrelierten.

### 3.1.3. Klinisches Bild

Die klinischen Symptome, verursacht durch das **CML**, sind vielfältig und eng mit der Lokalisation des Tumors verbunden. Die generalisierte Lymphadenopathie bei der multizentrischen Form ist schmerzunempfindlich. Auf Grund der Einbeziehung der verschiedensten inneren Organe ins Krankheitsgeschehen kommt es zu unspezifischen Krankheitssymptomen: Depression, Lethargie, Dyspnoe, Anorexie, Vomitus, Diarrhoe, Kachexie, Aszites, Polydipsie und Fieber (Squire et al. 1973).

Röntgenbilder zeigten bei 60% der erkrankten Hunde eine sternale Lymphknotenvergrößerung, bei 47% eine Hepatomegalie, bei 55% eine Splenomegalie und bei 50% eine Umfangsvermehrung der sublumbalen Lymphknoten (Ackerman et Madewell 1980). Abnormale Dichten im Lungengewebe sind häufig, sowohl nodulär als auch fokal-alveolär und interstitiell.

Oft leiden Tiere mit der mediastinalen Form unter folgenden Krankheitssymptomen: Lethargie, Bewegungsintoleranz, Dyspnoe, Husten, Schluckbeschwerden, Anorexie, Vomitus, Masseverlust, Polydipsie, Polyurie (Couto 1985).

Bei der alimentären Form finden sich als weitere Symptome oft Hämatemesis und Melaena.

Die extranoduläre Form zeigt abhängig von der Lokalisation des Tumors die unterschiedlichsten Krankheitsbilder. Die kutane Form des malignen Lymphoms kann generalisiert oder multifokal mit den verschiedensten Manifestationen auftreten: Noduli (dermoepidermal oder subkutan), Ulzerationen, Plaques, Erythroderm und exfoliative Dermatitis (Muller et al. 1989). Pruritus und Einbeziehung der Mukosa der Maulhöhle sind weitere Erscheinungsformen. Die meisten primären kutanen Lymphome sind epidermotrope Lymphome. Wilcock et Yager (1989) geht von drei Symptomen für diese Form im Anfangsstadium aus: mukokutane und Sohlenballenulzerationen, generalisiertes exfoliatives Erythroderm und kutane Noduli. Eine dieser Formen ist die Mycosis fungoides. Als Varianten dieser Erkrankung wurden Sezary's Syndrome (De Boer et al. 1990) und die pagetoide Retikulose (Woringer-Kolopp's Disease) beim Hund beschrieben (Muller et al. 1989). Kutane Lymphome können auch als disseminierte Formen von anderen anatomischen Ursprungsorten auftreten.

Eine weitere Form des extranodulären Lymphoms ist das okuläre Lymphom. Nach Swanson (1990) treten Verdickungen der Iris, Glaukom, Hypopyon und posteriore Synechien als Krankheitssymptome auf. Bei der weiteren Untersuchung können choroidale Tumoren, Hämorrhagien im Glaskörper, Ablösung der Retina und Infiltrationen des Nervus opticus festgestellt werden.

Couto et al. untersuchten 1989 das neurale Lymphom, ebenfalls eine Form des extranodulären Lymphoms, mit sowohl zentralnervöser als auch das periphere Nervensystem befallender Manifestation. Die klinischen Symptome deckten sich mit denen der Metastasierung multizentrischer

## Lymphome in das Gehirn.

Beim **Menschen** sind die klinischen Symptome verursacht durch das NHL vergleichbar denen des malignen Lymphoms des Hundes. Gall et Mallory beschrieben schon 1942 bei 90% ihrer Patienten eine Umfangsvermehrung der peripheren Lymphknoten ohne Auftreten von Schmerzen. Bei 40% der Erkrankten sind Veränderungen im Knochenmark zu registrieren (Dick et al. 1974). Allerdings zeigten Jones et al. (1972), daß es sich meistens um ältere Patienten handelte, bei denen auch das Knochenmark Veränderungen auf Grund des NHL aufwies. In etwa 50 - 70% der Fälle waren die mediastinalen Lymphknoten vergrößert und bei 20% eine Splenomegalie palpierbar. Eine Vergrößerung der Leber, Ikterus oder systemische Symptome wie Fieber, Masseverlust und Schweißausbrüche gehörten zu den eher seltenen Befunden (Davis 1985).

Bei etwa 30% der Erkrankungen tritt eine extranoduläre Form auf. Hauptsächlich betroffen sind Haut, Verdauungssystem, Knochen und Lunge (Moormeier et al. 1990). Im Gegensatz zum Hund ist die Haut häufiger in Folge multizentrischer Lymphome erkrankt, aber auch beim Menschen können drei Typen des primären T-Zell Lymphoms unterschieden werden: Mycosis fungoides, Sezary's Syndrome und Woringer-Kolopp's Disease (Davis 1985).

Die häufigste neurale Manifestation des NHL ist charakterisiert durch eine Kompression des Rückenmarks auf Grund ektodermaler Tumore. Eine Erkrankung des Leptomeninx wird von Davis (1985) selten, von Moormeier et al. (1990) dagegen häufiger gefunden. Bei Kindern tritt bei 25% aller Patienten eine Manifestation im zentralen Nervensystem auf.

Zur klinischen Klassifikation von Patienten mit NHL wurde 1971 die „Ann Arbor Staging Classification“ entwickelt (Carbone et al. 1971). Diese Klassifikation umfaßt vier Stadien (stages), wobei Stage IV, disseminierte Formen, am häufigsten vorkommt. Während bei der Hodgkin's Disease die Prognose mit jedem progressiven Stadium sinkt, ist dies für NHL nicht gleichbedeutend. Hinzu kommt, daß nur wenige histologische Subtypen den Stadien I und II entsprechen und somit diese Klassifikation nur wenig prognostischen und therapeutischen Wert besitzt (Rosenberg 1977).

Von der WHO (World Health Organization) wurde ein klinisches Klassifikationssystem für maligne Tumore entwickelt (Hermanek et al. 1987). Diese Klassifikation wurde durch Owen (1980) auf das maligne Lymphom des **Hundes** angewendet. Mit diesem System kann die Schwere der Erkrankung des Tieres beschrieben werden. Folgende Stadien sind definiert:

- Stadium I: Die Erkrankung ist limitiert auf einzelne Lymphknoten oder lymphatisches Gewebe eines einzelnen Organs (mit Ausnahme des Knochenmarks).
- Stadium II: Erkrankung mehrerer Lymphknoten in einer Region, die Tonsillen können mitbefallen sein.
- Stadium III: Generalisierte Lymphknotenerkrankung.
- Stadium IV: Zusätzliche Metastasierung in Leber und / oder Milz.
- Stadium V: Zusätzliche Manifestation im Knochenmark und Blut und / oder in anderen Organen.

Jedes Stadium ist unterteilt nach dem Auftreten von systemischen Krankheitssymptomen.

Zusätzlich werden pathologisch-anatomisch folgende Formen unterschieden:

- generalisiert,
- alimentär,
- thymisch,
- kutan,
- „echte“ Leukämie (nur Blut und Knochenmark betroffen),
- andere (einschließlich der solitären renalen Form).

Das Myelom kann durch die Klassifikation nicht erfaßt werden.

Eingeschränkt wird dieses System, da die Mehrzahl der CML den Stadien III, IV oder V zuzuordnen ist (Withrow et McEwen 1989). Auch die korrekte Einteilung extranodulärer Lymphome nach diesem Schema wurde bezweifelt (Couto 1985).

### 3.1.4. Hämatologische und klinisch-chemische Befunde

Für viele Formen des CML sind hämatologische und klinisch-chemische Abweichungen häufige Begleiterscheinungen.

#### Hämatologie

Als eine häufige durch **CML** hervorgerufene Veränderung beschreiben Van Pelt et Connor (1968) eine fortgeschrittene Anämie im terminalen Stadium. Dabei scheint ein deutlicher Zusammenhang zwischen einer Anämie und der Chronizität des Krankheitsprozesses zu bestehen. Madewell (1986) konnte eine Anämie bei 38% aller von ihm untersuchten Hunde mit malignem Lymphom nachweisen. Die Ursache kann sowohl hämolytisch (Van Pelt et Connor 1968), als auch chronisch entzündlich sein oder sich auf die Erkrankung des Knochenmarks begründen (Squire 1969). Wahrscheinlich sind die Ursachen eher komplex. Besonders die große Anzahl abnormaler Erythrozyten, welche bei einigen Hunden in Knochenmarkbiopsaten gefunden wurde, läßt eine Immunohämolyse, eine Myelophthisis oder andere Syndrome einer ineffektiven Erythropoese vermuten (Madewell 1986).

In den meisten Veröffentlichungen wird von einer Leukozytose, hervorgerufen durch eine Erhöhung juveniler (stabkerniger), neutrophiler Granulozyten, gesprochen (Bloom et al. 1945, Jennings 1953), welche bei etwa 26% der erkrankten Hunde auftritt (Madewell 1986). Jennings (1953) vermutet als Ursache hierfür Gewebeschäden und Nekrosen auf Grund der Expansion des Tumors. Madewell (1986) beschreibt dagegen bei 9,3% der Hunde mit malignem Lymphom eine Leukopenie. Eine Lymphozytose konnte er nur in 18,3% der Hunde mit malignem Lymphom, eine Lymphopenie sogar bei 21,7% der Tiere nachweisen (Madewell et Theilen 1987).

Die meisten Erkrankungen verlaufen aleukämisch oder subleukämisch (Van Pelt et Connor 1968). Allerdings bestehen hierzu unterschiedliche Auffassungen. Während Bloom et al. (1945) und Jennings (1953) diese Meinung teilen, beschreiben andere Autoren bei mehr als 50% aller

erkrankten Hunde eine leukämische Reaktion (Squire 1969, Madewell 1986). Dies ist zum einen durch die unterschiedliche Definition einer Leukämie erklärlich, zum anderen spielt die Weiterentwicklung der Diagnostik eine große Rolle. Raskin et al. (1989) fanden 57% leukämische Hunde bei einer Untersuchung von 53 Tieren mit multizentrischem Lymphom. Diese Prozentzahl setzte sich zusammen aus Hunden mit Befunden von atypischen Zellformen, unausgereiften Zellen oder abnormaler Gewebeverteilung von lymphoiden Zellen im Blut (50%), in Knochenmark-Aspiraten (60%) und in Knochenmark-Biopsaten (97%). Ein Vergleich von Knochenmark-Biopsaten und Blutproben ergibt einen Unterschied in der Bewertung des Vorliegens einer Leukämie von nahezu 50%. Dies könnte eine logische Erklärung für die unterschiedlichen Literaturangaben sein.

Eine Thrombozytopenie, wahrscheinlich immunvermittelt (Keller 1992), ist ebenfalls bei nahezu 50% aller Fälle beschrieben, auch wenn Gerinnungsstörungen nur selten auftreten (Van Pelt et Connor 1968, Squire 1969, Madewell 1986).

Sowohl Davis (1985) als auch Moormeier et al. (1990) gehen bei 10% aller **NHL** von einer Anämie zum Krankheitsbeginn aus, welche mit zunehmendem Fortschreiten der Krankheit bei etwa 50% der Patienten auftritt. Das weiße Blutbild ist selten verändert, allerdings kann eine Lymphozytose vorkommen. Veränderungen des Zellbildes von Blut und Knochenmark sind deutlich assoziiert mit den verschiedenen histologischen Typen der Lymphome. Durch Knochenmark-Biopsate konnte nur bei weniger als 30% der Patienten eine Leukämie bewiesen werden (Jones et al. 1972, Dick et al. 1974).

#### Klinisch-chemische Befunde

Hyperkalzämie ist mit Sicherheit die am häufigsten publizierte, labordiagnostische Veränderung von **Hunden** mit malignem Lymphom (Elliott et al. 1991, Weller et Hoffman 1992). Die Ursache für das Auftreten einer Hyperkalzämie in Verbindung mit malignen Lymphomen könnte ein Faktor sein, welcher für die Resorption von Knochen verantwortlich ist und durch das Tumorgewebe vermehrt produziert wird. Beim Menschen wurde ein solcher Faktor mit der Bezeichnung „Osteoklasten-aktivierender Faktor“ beschrieben (Heath et al. 1980) und es wird angenommen, daß er durch Lymphokine aus neoplastischen Lymphozyten freigesetzt wird. Weir et al. (1988b) schlagen zwei weitere mögliche Mechanismen vor: 1. Die Metastasierung von soliden Tumoren in den Knochen könnte lokal wirkende, knochenresorbierende Faktoren stimulieren. 2. Die sogenannte „humorale Hyperkalzämie durch Malignität“ könnte eine weitere Ursache darstellen. Der Grund hierfür soll ein zirkulierender humoraler Faktor sein, welcher eine Hyperkalzämie durch Knochenresorption und erhöhte Kalziumrückresorption aus der Niere verursacht. Er könnte in seiner Ausschüttung durch das Tumorgewebe stimuliert werden. Auch wenn seine Struktur noch unbekannt ist, könnten Parathormon-ähnliche Peptide (PTHrP) oder transformierende Wachstumsfaktoren oder andere, Knochen-resorbierende Proteine eine entscheidende Rolle als Mediatoren spielen. Verschiedene Studien an Hunden mit malignem Lymphom postulieren eine durch PTHrP verursachte humorale Hyperkalzämie durch Malignität, da sowohl eine Hyperkalzämie als auch PTHrP und die dadurch verursachten klinischen Symptome gemeinsam auftraten (Weir et al. 1988a, Weir et al. 1988b). In anderen Studien konnte kein erhöhter Serumspiegel von PTHrP gefunden werden, was gegen diese Theorie spricht (Heath et al. 1980). Bei der Untersuchung von Tumorgewebe auf Adenyl-Zyklase-stimulierende Aktivität (ACSA), welche die Umwandlung von ATP in cAMP im Verhältnis zur Bindung an PTH-Rezeptoren charakterisiert, ergab sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe des ACSA-Spiegels und einer Hyperkalzämie (Weir et al. 1988a).

Hyperkalzämie beim Hund verursacht Anorexie, Polydipsie (80%), Polyurie (80%), Muskelschwäche, Masseverlust und Depression (Weller et Hoffman 1992). Ihr Auftreten im Zusammenhang mit dem caninen malignen Lymphom wird mit 10 - 40% angegeben (Madewell 1986, Chew et Meuten 1982). Alters- und geschlechtsgebundene Dispositionen konnten nicht gefunden werden, und Rassedispositionen nur in einer Studie, in der bis zu 25% der Fälle beim Bernhardiner auftraten (Weller et al. 1982a). Teske et al. (1993b) beschrieben ein erhöhtes Risiko für Boxer. Während Chew et Meuten (1982) einen Zusammenhang zwischen der mediastinalen Form und einer Hyperkalzämie fanden, konnten Weller et al. (1982a) dies nicht bestätigen. Dagegen wiesen sowohl Weir et al. (1988a), als auch Teske (1993) einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Hyperkalzämie und T-Zell Lymphomen nach. Eine prognostische Bedeutung ergab sich nicht aus dem Vergleich des Auftretens einer Hyperkalzämie mit verschiedenen Überlebensparametern (Rosenberg et al. 1991).

Bei **Menschen** mit NHL ist eine Hyperkalzämie nur selten zu diagnostizieren, und die Inzidenz beträgt nicht mehr als 2% (Grossmann et al. 1981). Bei einem durch Retroviren verursachten T-Zell Lymphom oder einer Leukämie ist die Auftretenswahrscheinlichkeit der Hyperkalzämie deutlich höher (Kinoshita et al. 1982).

Ein weiterer biochemischer Befund bei **Hunden** mit malignem Lymphom sind Veränderungen im Kohlenhydrathaushalt. So stellten Vail et al. (1990a) fest, daß Hunde mit malignem Lymphom einen insuffizienten Metabolismus bei erhöhten Laktatkonzentrationen aufwiesen. In einer anderen Arbeit zeigten sie, daß bei einem Glukose-Toleranz-Test sowohl die Werte für Glukose, als auch Laktose und Insulin deutlich erhöht waren. Viele dieser Veränderungen sind denen des Menschen mit neoplastischer Kachexie ähnlich und lassen den Hund als mögliches Modell für weitere Studien geeignet erscheinen (Vail et al. 1990b).

#### 3.1.5. Pathologische Anatomie

Jarrett et al. beschrieben 1966 zwei Gruppen pathologischer Veränderungen durch **CML**. Die erste Gruppe war charakterisiert durch bilaterale, symmetrische Vergrößerung der meisten superfizialen Lymphknoten mit Hepato-Splenomegalie. Hinzu kamen tumoröse Veränderungen in den meisten tiefen Lymphknoten sowie den verschiedensten anderen Geweben. Die zweite Gruppe war durch Tumore im Verdauungstrakt gekennzeichnet, ohne die Körperlymphknoten und die Milz zu betreffen.

Moulton (1990) klassifiziert Lymphome auf Grund ihrer Anatomie nach folgenden Gruppen: multizentrisch, thymisch, alimentär, kutan. Von Couto (1985) wird eine andere Klassifikation gewählt, welche sowohl die Lokalisation als auch die pathologischen Befunde berücksichtigt:

1. Multizentrische Form: Häufigste Form des CML mit generalisierter Lymphadenopathie, Hepatomegalie, Splenomegalie und Knochenmarksbefall.
2. Mediastinale Form: Die kranialen, mediastinalen Lymphknoten sind primär befallen, pleurale Effusionen sind häufig.
3. Alimentäre Form: Solide oder diffuse gastrointestinale Lymphome sind charakteristisch, häufig sind Leber, Milz und mesenteriale Lymphknoten miteinbezogen.

4. Extranoduläre Form: Hierzu gehören alle anderen Lymphomtypen, wobei kutane Lymphome die Mehrheit bilden. Seltener sind okuläre, zentralnervöse und andere Formen.

McEwen (zit. nach Withrow et McEwen 1989) beschrieb bei 80% aller Hunde mit malignem Lymphom eine Umfangsvermehrung der Körperlymphknoten. Die veränderten Lymphknoten zeigten Petechien und vereinzelt Ekchymosen. Die sich vorwölbende Schnittfläche war von hellgelblicher, hellgrauer oder graurosa Färbung und meist feucht. Eine scharfe Grenze zwischen Kortex und Medulla war nicht mehr erkennbar. Die Konsistenz erschien oft wie gekocht. Einige Lymphknoten zeigten nekrotische Bezirke, andere wirkten marmoriert auf Grund von Hämorrhagien. Die Kapsel war in den meisten Fällen unbeschädigt, allerdings kam es in terminalen Stadien zu Durchbrüchen und der Ausbildung diffuser, perinodulär gelegener, lymphatischer Massen (Van Pelt et Connor 1968).

Von den erkrankten Tieren wiesen 20% eine Umfangsvermehrung im Bereich des Thorax auf; die mediastinalen Lymphknoten waren besonders im kranialen Bereich befallen. Diese Lymphknoten formten oft große, pleomorphe Gebilde. Eine pulmonale Infiltration ist ebenfalls möglich, und in einer Arbeit wurde dieser Fall in 27% der Tiere mit multizentrischem Lymphom beschrieben (McEwen et al. 1981).

Die Splenomegalie kann bedeutende Ausmaße erreichen und die primäre Ursache für die sichtbaren Krankheitserscheinungen des Hundes darstellen. Befallen sind die Milzfollikel, von denen sich das lymphatische Gewebe diffus ausbreitet, wobei die rote Pulpa obliteriert. Solitäre Tumoren, welche die Kapsel durchbrechen, sind ohne Splenomegalie nur selten zu finden (Squire 1969).

In der Leber sind meistens die periportal Gebiete zuerst betroffen, aber auch sinusoidale und zentrolobuläre Infiltrate treten auf, besonders in leukämischen Fällen. Die Schnittfläche ist gelblichgrau bis braungrau oder ähnelt einer Muskatnuß (Van Pelt et Connor 1968).

Die alimentäre Form macht nur etwa 10% der Lymphome aus (Couto et al. 1989). Kutane Lymphome bilden die Mehrheit der extranodulären Form des CML (Muller et al. 1989). Seltener sind okuläre (Swanson 1990), zentralnervöse (Couto et al. 1984) und andere Formen.

### 3.1.6. Prognose und Therapie

#### Biologisches Verhalten und Überlebenszeit

Das biologische Verhalten von **CML** ist in der Regel hochmaligne. Eine spontane Regression ist sehr selten (Schwartz 1988). Die Überlebenszeiten ohne Behandlung betragen im Durchschnitt 60 Tage. Allerdings variieren die in der Literatur angegebenen Zeiten von 10 bis zu 100 Tagen (Moldovanu et al. 1966a, Brick et al. 1968, McEwen et al. 1987a). Eine Erklärung dafür wären Unterschiede im Zeitpunkt der Ersterkennung oder die Entscheidung des Besitzers auf Euthanasie.

Zur Beurteilung der CML sind nur wenige prognostische Faktoren verfügbar. Um einen Vergleich verschiedener Veröffentlichungen zu ermöglichen, sind einheitliche Parameter für die prognostische Bewertung Voraussetzung. Dixon et al. (1987) schlagen hierfür die Überlebenszeit, die Erreichung der vollständigen Remission des Tumors und die krankheitsfreie Überlebenszeit vor. Nahezu alle Arbeiten zur Prognose von CML konnten keinen Zusammenhang zwischen den genannten Kriterien einerseits, sowie Alter, Körpermasse oder Geschlecht andererseits nachweisen (Carter et al. 1987, Greenlee et al. 1990, Teske et al. 1993d). Zwar geben einige Autoren ein höheres Risiko für männliche Tiere an (McEwen et al. 1987a), dies wird jedoch durch die meisten Untersuchungen nicht bestätigt (Greenlee et al. 1990, Hahn et al. 1992, Teske et al. 1993d). Östrogen- oder Progesteronrezeptoren konnten weder in normalem lymphatischem Gewebe noch in Lymphomen gefunden werden (Vicini et al. 1991, Teske et al. 1993a), was eine Modulation des Wachstums oder eine Differenzierung von Lymphozyten durch Geschlechtshormone zweifelhaft erscheinen läßt. Andere prognostische Parameter, wie das klinische Stadium, sind unterschiedlich bewertet worden. Während McEwen et al. (1981) und Cotter (1983) das Stadium III als prognostisch günstiger beurteilen als die Stadien IV oder V, konnten andere Untersuchungen keinerlei prognostische Aussagen an Hand des klinischen Stadiums treffen (Squire et al. 1973, Greenlee et al. 1990, Hahn et al. 1992). Durch Teske et al. wurde 1990 in einer umfassenden Studie das klinische Stadium als wichtiger prognostischer Parameter statistisch nachgewiesen. Weder Hypokalzämie noch andere labor diagnostische Parameter waren prognostisch bedeutend (Rosenberg et al. 1991).

Histomorphologische Parameter werden gesondert im Kapitel „Klassifikation von caninen malignen Lymphomen“ diskutiert.

Beim **Menschen** konnte eine Korrelation zwischen dem biologischen Verhalten von NHL und dem Immunophänotyp, der Histomorphologie und dem klinischen Stadium nachgewiesen werden (National Cancer Institute 1982). Dies führte zur Erstellung verschiedener Klassifikationen mit unterschiedlicher prognostischer Bedeutung (Lukes et Collins 1974, Lennert et Mohri 1978), auf die im oben angeführten Kapitel näher eingegangen wird. Auch das Alter zum Beginn der Erkrankung ist wichtig für eine prognostische Aussage, da mit höherem Alter die Toxizität der angewendeten Chemotherapie steigt (Yi et al. 1990). Ebenso könnte der konditionelle Status eine Rolle spielen.

#### Therapie

Verschiedene Methoden der Therapie von **CML** wurden und werden genutzt. Da es sich in den meisten Fällen um eine systemische Erkrankung handelt, sind die chirurgische Behandlung oder die Bestrahlung von limitierter Einsatzbreite. Eine endokrine Therapie wird oft genutzt, da sie relativ untoxisch und preiswert ist. Am häufigsten findet die Chemotherapie Anwendung und dies mit den bislang besten Resultaten. Ein zunehmender Einsatz der Immunotherapie zeichnet sich für die Zukunft ab.

#### Chirurgie

Wie schon erwähnt, ist die chirurgische Behandlung der **CML** oft nur begrenzt einsetzbar, da es sich meistens um eine systemische Erkrankung handelt. Auf jeden Fall spielt sie eine wichtige Rolle als Grundlage der histopathologischen Untersuchung durch die Bereitstellung von qualitativ guten Biopaten. Vereinzelt kommt ihr auch eine gewisse Bedeutung bei Fällen im I. oder II. klinischen Stadium oder lokalisierten Hautformen zu (Rosenthal et McEwen 1990).

Einige Autoren sehen eine Splenektomie als nützliche therapeutische Methode an. So beschreibt Moldovanu et al. (1966a) diesen Eingriff, um die Milz als Grundlage für zirkulierende Tumorzellen zu eliminieren. Brooks et al. (1987) nehmen die Operation nach dem Auftreten klinischer Symptome einer massiven Splenomegalie, die bis zur Milzruptur führen kann, vor. Beide Autoren empfehlen eine nachfolgende Chemotherapie. Von den 16 von Brooks et al. (1987) behandelten Hunden starben 5 an Sepsis oder disseminierter intravaskulärer Koagulopathie. Sieben der

zusätzlich chemotherapeutisch behandelten Tiere überlebten durchschnittlich 14 Monate. Squire et al. (1973) gehen von einem Negativeffekt der Splenektomie auf die Überlebenszeit aus.

## Endokrine Therapie

Eine endokrine Therapie von **CML** mit einem einzeln verabreichten Kortikosteroid ist preiswert und relativ untoxisch. Während Squire et al. (1964) eine vollständige Rückbildung von Lymphomen bei 41% von 49 Hunden mit einer durchschnittlichen Rückbildungsdauer von 52 Tagen nach Prednisolon-Gaben beobachteten, wurden in anderen Studien deutlich niedrigere Remissionsraten erzielt (17% innerhalb von 30-60 Tagen, Bell et al. 1984)

Der Wert einer Anti-Östrogen-Therapie von caninen malignen Lymphomen ist sehr zweifelhaft, da weder Östrogen- noch Progesteron-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Vicini et al. 1991) und ein Therapieversuch keinerlei Erfolg zeigte (Teske et al. 1993a).

Beim **Menschen** wurden von Zaniboni et al. (1986) bei 52% der Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie Östrogenrezeptoren und bei 26% Progesteronrezeptoren nachgewiesen. Allerdings konnten durch eine Therapie mit dem Anti-Östrogen Tamoxifen bei Rezeptor-positiven Patienten keine Veränderungen erzielt werden. Dies steht im Gegensatz zu einer Arbeit von Narashimham (1984), in der er den erfolgreichen Einsatz von Tamoxifen bei NHL beschreibt.

## Strahlentherapie

Der systemische Charakter von **CML** limitiert den Einsatz ionisierender Strahlung in ähnlicher Weise wie für die Chirurgie beschrieben. Da Lymphozyten sensibel gegenüber radioaktiver Strahlung sind (Rosenthal et McEwen 1990), ist ein therapeutischer Einsatz vorstellbar. So erreichten Giger et al. (1989) die Heilung eines Boxers mit solitärem malignem Lymphom in der Vordergliedmaße durch Bestrahlung mit 45 GRay in 10 Fraktionen innerhalb von 22 Tagen. Auch für systemische Formen schlagen Laing et al. (1988) eine Teilkörperbestrahlung mit 7 GRay vor, wobei die andere Körperhälfte mit der gleichen Dosis 28 Tage später bestrahlt wird. Johnson et al. (1969) unterzogen 14 Hunde einer Ganzkörperbestrahlung mit täglichen fraktionierten Dosen von 15 oder 30 Rad über mehrere Wochen. Nur bei etwa 40% ihrer Patienten gelang eine vollständige oder teilweise Tumorrückbildung mit einer Überlebenszeit von etwa 100 Tagen.

Wesentlich erfolgreicher scheint eine Kombination von Strahlentherapie mit Chemotherapie und autologer Knochenmarkstransplantation zu sein. In mehreren Veröffentlichungen beschrieben Bowles et al. (1980) und Bowles et Lucas (1980) die Heilung von 25% der erkrankten Hunde und deutlich verlängerte krankheitsfreie Überlebenszeiten. Appelbaum et al. (1986) erzielten ähnliche Resultate mit der Übertragung mononukleärer Blutzellen.

## Chemotherapie

Die Chemotherapie ist die am häufigsten angewandte Methode zur Behandlung von **CML**. Die große Zahl unterschiedlicher Medikamente und Protokolle (Mono- oder Kombinationstherapie) im Zusammenhang mit unzureichenden Informationen zur Effektivität der Behandlung, der Toxizität und dem finanziellen Aufwand läßt eine Beurteilung der jeweiligen Therapie nur schwerlich zu. Im allgemeinen wird eine Kombinationstherapie von Chemotherapeutika und Kortikosteroiden als wirkungsvollste Methode betrachtet und ist somit am weitesten verbreitet (McEwen et al. 1981).

Zu den am häufigsten verwendeten Medikamenten zählen Doxorubicin (Adriamycin), Vincristin, Cyclophosphamid und L-Asparaginase. Ogilvie et al. (1989) erzielten mit der Verabreichung von Doxorubicin bei 65% aller Hunde mit malignem Lymphom eine vollständige oder teilweise Rückbildung des Tumors, allerdings konnte bei einer niedrigen, geringgradig toxischen Dosierung (10 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche i. v.) über 15 Wochen nur bei einem von neun Hunden eine vollständige Tumorrückbildung für 231 Tage erzielt werden (Ogilvie et al. 1991b). Novotney et al. (1992) schlagen zur Erhöhung der Dosis ohne toxische Nebenwirkungen auf 30 mg/m<sup>2</sup> eine jeweils 90minütige Erhöhung der Körpertemperatur auf 42 °C vor. Gray et al. (1984) erhöhten den Anteil von Hunden mit vollständiger Tumorrückbildung auf 12 von 13 Tieren durch die Kombination von Doxorubicin und Dacarbacin (ADIC). Mit der gleichen Kombination konnten Vechten et al. (1990) bei acht von 15 Hunden, die alle auf die Monotherapie mit Doxorubicin keine Wirkung mehr zeigten, eine erneute vollständige oder teilweise Tumorrückbildung erzielen. Während Carter et al. (1987) davon ausgehen, daß eine Kombinationstherapie mit COP (Cyclophosphamid-Zytoxan, Vincristin-Oncovin, Kortikosteroid-Prednisolon) keine Vorteile gegenüber der Einzelanwendung von Doxorubicin aufweist, befürworten Cotter et Goldstein (1987) eine Kombinationstherapie aus COP und Doxorubicin (Adriamycin) - COPA, da sich die toxische Wirkung nicht erhöht und der krankheitsfreie Überlebenszeitraum sich im Vergleich zu den Monotherapien deutlich verlängert.

McEwen et al. bewiesen 1987 (b) die antitumorale Wirkung von Polyäthylenglycol-konjugierter (PEG) Asparaginase bei der Behandlung von caninen malignen Lymphomen. Von 19 Hunden zeigten 14 eine Tumorremission. Dies deckt sich mit den Ergebnissen, die von Carter et al. (1987) mit Doxorubicin erreicht wurden. Durch Kombination von PEG-Asparaginase mit Vincristin, Cyclophosphamid, Methotrexat und Prednisolon konnten bei 13 von 17 Hunden eine vollständige und bei 2 Hunden eine teilweise Tumorrückbildung erzielt werden (McEwen et al. 1987b). Stone et al. (1991) kamen mit einer ähnlichen Kombination bei 76% der Hunde zu einer vollständigen Tumorrückbildung.

Die bisher höchsten Remissionsraten (88 - 96%), die längste krankheitsfreie Überlebenszeit (durchschnittlich 215 - 250 Tage) und die längsten Überlebenszeiten (durchschnittlich 350 - 356 Tage) wurden mit einer Kombinationstherapie bestehend aus PEG-L-Asparaginase, Cyclophosphamiden, Vincristin, Doxorubicin oder Methotrexat in Verbindung mit geringer werdenden Dosen von Prednisolon erreicht (Teske et al. 1990, McEwen et al. 1992). Mit dieser Therapie konnte bei etwa 10% der Hunde eine vollständige Heilung erzielt werden.

In den letzten Jahren wurden neue Medikamente getestet. So erzielten Ogilvie et al. (1991a) mit einer Monotherapie mit Mitoxantron bei 30% erkrankter Hunde eine Remission. Natürlich erhebt sich für die Anwendung neuerer Chemotherapeutika beim Hund die Frage nach dem finanziellen Aufwand. Ein anderer Aspekt ist jedoch die mögliche Verwendung des Hundes als therapeutisches Modell (Johnson et al. 1968).

Ziel beim Einsatz neuer Medikamente ist eine Kombination mit anderen Chemotherapeutika, um die applizierten Konzentrationen und damit die toxischen Nebenwirkungen zu verringern und die Remissionsrate weiter zu erhöhen bzw. deren Dauer zu verlängern. Zwar sind nicht alle neuen Chemotherapeutika zur Behandlung caniner maligner Lymphome verwendbar, z.B. konnten Hohenhaus et Matus (1990) nur eine geringe Aktivität von Etoposid (VP-16) auf „Rückfall“-Hunde feststellen, dafür beweisen andere Arbeiten die sich durch die Kombinationstherapie verringern den Nebenwirkungen (Mandell et al. 1992). Diese Nebenwirkungen betreffen neben dem Gerinnungssystem mit Thrombosen und Thromboembolien

und dem Immunsystem vor allem das Verdauungssystem und äußern sich in Symptomen wie Vomitus, Diarrhoe und Masseverlust z.B. durch mittlere Dosen von Methotrexate (Bortnowski et Rosenthal 1991). Eine besondere Gefährdung chemotherapeutisch behandelter Hunde stellt das Tumor-Lysis-Syndrom dar (Laing et Carter 1988). Bei Hunden mit gleichzeitig auftretender Hyperkalzämie ist eine symptomatische Therapie erforderlich (Weller et al. 1982b).

## Immunotherapie

Eine Alternative zur Kombinationstherapie ist die Immunochemotherapie. So wurden Behandlungsprotokolle bestehend aus COPA durch die Applikation einer Vakzine aus autogenen Tumorzellen in Freund's Adjuvans ergänzt (Crow et al. 1977). Der Unterschied der Überlebenszeit derartig behandelter Hunde gegenüber der konventionellen Therapie betrug durchschnittlich 200 Tage (Theilen et al. 1977). Weller et al. (1980b) gehen davon aus, daß Freund's Adjuvans eine Reihe spezifischer und unspezifischer immunpotenzierender Wirkungen hervorruft und somit den eigentlichen Wirkstoff der verabreichten Vakzine bildet. Dieser Erklärung widersprechen die Untersuchungen von Jeglum et al. (1989), in denen sie eine Erhöhung der humoralen Antikörper nach Vakzinierung feststellten.

Eine interessante Behandlungsmethode stellten Rosales et al. (1988) vor. Sie bewiesen die zytolytische Aktivität von murinen Anti-caninen Lymphom Antikörpern ohne das Vorliegen toxischer Nebenwirkungen. Dagegen scheinen Behandlungen auf der Basis von Vitamin E und Linolsäure (Williams 1988) wenig geeignet zur Therapie der CML.

Die Unterschiede bei der Behandlung von humanen **NHL** sind gegenüber dem CML sehr groß. Dies äußert sich in einer intensiven Therapie von hochmalignen Tumoren und einer konservativen Variante für niedrigmaligne Tumore (Rosenberg 1979, Portlock 1990). Da die angewendeten Methoden äußerst vielfältig sind und den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden, soll hier nur auf einige generelle Entwicklungen in der Chemotherapie eingegangen werden.

Die erste Generation getesteter Medikamente führte zur Anwendung des COPA-Protokolls. Hiermit wurden entsprechend der Malignität des Tumors 61% bzw. 50% Remissionen erreicht (Jones et al. 1985). Basierend auf den Chemotherapeutika der 2. und 3. Generation fanden folgende Protokolle Anwendung: COP-BLAM (Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisolon, Bleomycin, Doxorubicin und Procarbazine), M-BACOD (Methotrexat, Bleomycin, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Dexamethason) und ProMACE-MOPP (Prednisolon, Methotrexat, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Etoposid, Mechlorethamin, Vincristin, Procarbazine, Prednisolon) in der 2. Generation und ProMACE-ZytaBOM (ProMACE und Zytarabin, Bleomycin, Vincristin, Methotrexat), COP-BLAM III und MACOP-B (Methotrexat, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisolon, Bleomycin) in der 3. Generation (Miller et al. 1988). Mit diesen Protokollen konnten bei mehr als 80% der Patienten vollständige Tumorrückbildungen erreicht werden (Winkler et al. 1986, Winokur 1987).

### 3.1.7. Klassifikation von caninen malignen Lymphomen

Verschiedene Klassifikationen von **CML** wurden aufgestellt, um das klinische Verhalten beurteilen und damit eine prognostische Aussage treffen zu können. Neben einer klinischen Klassifikation nach Owen (1980), die bereits zuvor beschrieben wurde und in ihrer Aussagekraft umstritten ist (Gendron-Fitzpatrick 1986), sind vor allem histologische Klassifikationen des NHL in Anwendung. Alle Klassifikationen wurden für das NHL des Menschen entwickelt und von Veterinärpathologen für eine Beurteilung des CML genutzt. Mit der Einführung der Immunhistochemie gewann der Einsatz spezifischer Antikörper an Bedeutung. Nachfolgend werden die wichtigsten Klassifikationen des NHL des Menschen und ihre Vor- bzw. Nachteile erläutert. Alle beschriebenen Systeme wurden auf ihre diagnostische Verwendbarkeit für das CML geprüft und als übertragbar eingeschätzt.

## Histomorphologie

Die Lymphom-Klassifikation nach Rappaport (1966, siehe Anhang Tabelle 1) wurde lange Zeit durch die meisten Pathologen favorisiert. Angewandt auf das **CML** wäre die Mehrzahl der Tumoren als histiozytisch zu beurteilen (Holmberg et al. 1976, Teske et al. 1993e). Da dieses histiozytische Lymphom verschiedene Subtypen mit völlig unterschiedlichen Zelltypen zusammenfaßt, konnte keine prognostische Bedeutung der Rappaport-Klassifikation für das CML gefunden werden (Weller et al. 1980a).

Mit zunehmendem Wissen über den immunologischen Aspekt von Lymphomen, die Reifung und Differenzierung von Lymphozyten und Veränderungen in der Chemotherapie wurden andere Klassifikationen entwickelt.

Etwa zeitgleich wurden die Lukes-Collins-Klassifikation (Lukes et Collins 1974) in Nordamerika und die Kiel-Klassifikation (Lennert et Mohri 1978) entwickelt. Beide Systeme werden auch heute noch gleichermaßen häufig verwendet. Sie basieren auf immunologischen Konzepten und unterscheiden sich nur, abgesehen von Fragen der Terminologie, in 2 von 13 Gruppen signifikant. Einer der Gründe hierfür ist die unterschiedliche Position von Zentrozyten innerhalb der Zellreihe (siehe Anhang Abb. 1). Trotzdem ist eine Übersetzung beider Klassifikationen in die jeweils andere möglich (Lennert et al. 1983).

Um der herrschenden Verwirrung und weiteren Klassifikationen vorzubeugen, veranlaßte das "National Cancer Institute" eine multiinstitutionale Studie, um eine gemeinsame Klassifikation zu erarbeiten (NCI 1982). Als Ergebnis dieser Arbeit entstand die Working Formulation. Im Gegensatz zu den zuvor angesprochenen Klassifikationen handelt es sich hierbei um eine Art Übersetzung aller existierenden Klassifikationen, die streng klinisch orientiert ist und nicht einem morphologischen Prinzip folgt (Lennert et Feller 1990). Die Working Formulation bestimmt die Malignität eines Lymphoms auf der Grundlage der Überlebenskurven und ordnet dem so ermittelten Malignitätsgrad die entsprechenden histomorphologischen Ergebnisse zu. Verschiedene Vergleichsstudien wurden veröffentlicht (Liebermann et al. 1986), die auf die Unvollkommenheit dieses "Lymphom-Esperantos" hinwiesen und einen Einsatz der Working Formulation als primäre Klassifikation ablehnten (Burke 1990). Dies erfolgte auch für das CML (Delverdier et al. 1988). Trotzdem ist eine Anwendung der Working Formulation unumgänglich, da sie international bekannt ist und sich vor allem klinisch durchgesetzt hat.

Sowohl die Kiel-Klassifikation als auch eine Übertragung in die Working Formulation eignen sich für die Klassifikation von **CML** (Carter et al. 1986, Greenlee et al. 1990), und die meisten Kategorien können reproduziert werden (Parodi et al. 1988). Eine ausführliche Darstellung der entsprechenden Subtypen befindet sich im Anhang. (Tabellen 2 und 4)

Großzellige Lymphome wurden beim Hund nach der Working Formulation am häufigsten festgestellt und entsprechen dem zentroblastischen

Subtyp der Kiel-Klassifikation (siehe Anhang Abb. 5 bis 7). Lymphoblastische Lymphome sind sehr selten (Baron et al. 1990) bzw. zweifelhaft in ihrer Existenz (Valli et al. 1981, Parodi et al. 1988). Dies wurde auch durch elektronenmikroskopische Studien bestätigt (Chapman et al. 1981). Die Frequenz der unterschiedlichen Subtypen des CML ist denen des NHL vergleichbar, allerdings treten beim Menschen wesentlich häufiger niedrigmaligne Tumore auf (Liebermann et al. 1986, siehe Anhang Abb. 2 bis 4).

Mit der Kiel-Klassifikation konnten 12% aller Lymphome des **Menschen** nicht beurteilt werden. Deshalb wurde mit detaillierten immunhistochemischen Definitionen der einzelnen Lymphomtypen (Stein et al. 1981) die bestehende Klassifikation aktualisiert (siehe Anhang Tabelle 3). Diese "updated"-Kiel-Klassifikation (Lennert et Feller 1990) erwies sich auch für die Beurteilung des CML als vorteilhaft.

Nach morphologischen Kriterien ist eine Differenzierung von B- und T-Zellen beim **Hund** deutlich schwieriger als beim Menschen, da typische Anhaltspunkte aus der Humanmedizin, wie hochendotheliale Venolen, viele "Hintergrund"-Zellen wie Plasmazellen, eosinophile Granulozyten, Histiocyten, und das Fehlen von Zentroblasten und Zentrozyten für den Hund nicht zuzutreffen scheinen. Auch sind die immunoblastischen Zellen des Hundes kleiner als die des Menschen und nicht voneinander zu unterscheiden (Parodi et al. 1988, siehe Anhang Abb. 8). So konnten Teske et al. (1993e) etwa 30% T-Zell-Lymphome nachweisen, von denen viele zuvor als zentroblastisch/zentrozytischer oder zentroblastisch/zentrozytoider B-Zell-Subtyp charakterisiert worden waren (siehe Anhang Abb. 4 und 7).

Ein Problem der aktualisierten Kiel-Klassifikation ist die Schwierigkeit, diese T-Zell-Lymphome zu klassifizieren, da sie zytomorphologisch sehr verschieden sind. Beim **Menschen** wurde die Klassifikation auch für periphere T-Zell-Lymphome in Frage gestellt (Noorduyn et al. 1990, Hastrup et al. 1991).

Eine zytologische Beurteilung von **CML** nach der Kiel-Klassifikation ist gegenüber einer histologischen deutlich schlechter zu bewerten (Carter et Valli 1988), dagegen sind die Ergebnisse für die aktualisierte Kiel-Klassifikation gut (Teske et van Heerde 1993).

Der Einsatz der besprochenen Klassifikationen zur prognostischen Beurteilung der **CML** ist heftig umstritten. In vielen Arbeiten konnte kein Zusammenhang zwischen Morphologie und Therapie gefunden werden (Carter 1988, Parodi et al. 1988, Greenlee et al. 1990). Teske et al. (1993b) wiesen dagegen in einer wesentlich umfassenderen Studie mit Hilfe einer multivariaten Analyse nach, daß Hunde mit gemäß Kiel-Klassifikation hochmalignen Tumoren eine häufigere vollständige Remission aber kürzere krankheitsfreie Überlebenszeiträume als Tiere mit niedrigmalignen Lymphomen aufwiesen, wogegen die Working Formulation einen Zusammenhang zwischen höherer Malignität und kürzerer Überlebenszeit erkennen ließ. Diese Ergebnisse decken sich mit Resultaten aus der Humanmedizin (Lennert et Feller 1990).

## Immunophänotyp

Die Bestimmung des Immunophänotyps von **CML** stellt die Grundlage der aktualisierten Kiel-Klassifikation dar. Ein entscheidendes Problem ist der Mangel an verfügbaren caninen monoklonalen Antikörpern. Kreuzreaktionen mit humanen monoklonalen Antikörpern sind selten (Sandusky et al. 1986).

Frühe Studien von Onions (1977) zur Charakterisierung von B- und T-Zellen mit Rosetten-formenden Indikator-Erythrozyten lieferten keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

Einer der wenigen humanen Antikörper mit Kreuzreaktion ist der Anti-CD3 Antikörper. Dieser läßt sich auch an formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe verwenden (Ferrer et al. 1992, siehe Anhang Abb. 9 und 10).

In den letzten Jahren stieg auch die Anzahl der caninen monoklonalen Antikörper wie Anti-CD4 und Anti-CD8 (Moore et al. 1992), Anti-CD18 (Moore et al. 1990) oder Anti-Thy-1 (McKenzie et Fabre 1981), wobei die meisten mit T-Zellen reagieren und nicht an Paraffinschnitten einsetzbar sind. Letzteres gilt auch in der Humanmedizin (Jaffe 1990).

Unter Benutzung dieser Antikörper konnte die Mehrheit der untersuchten CML als B-Zell-Lymphome bestimmt werden (Appelbaum et al. 1984), wobei deutliche Unterschiede im prozentualen Anteil von T-Zell-Lymphomen bestanden (Greenlee et al. 1990, Teske et al. 1993e). Die fehlende Korrelation von Morphologie und Immunophänotyp wurde schon diskutiert.

Beim **Menschen** liegt der Anteil von T-Zell-Lymphomen an den NHL wesentlich niedriger (Schuurmann et al. 1987). Der Immunophänotyp kann im Gegensatz zum Hund durch histomorphologische Charakteristika bestimmt werden, allerdings zeigen selbst histopathologisch gut definierte Kategorien eine gewisse Heterogenität im Immunophänotyp (Jaffe et al. 1982, Van Heerde et al. 1982). Ein Phänomen, das eine möglich Erklärung hierfür bietet, sind die von Ramsay et al. (1988) und Macon et al. (1992) beschriebenen T-Zell-reichen B-Zell-Lymphome.

Die prognostische Bedeutung des Immunophänotyps ist umstritten. So fanden Lippmann et al. (1988) eine längere Überlebenszeit von Menschen mit NHL vom B-Zell-Typ gegenüber Patienten mit T-Zell-Lymphomen. In der aktualisierten Kiel-Klassifikation werden T-Zell-Lymphome in niedrig- und hochmaligne Lymphome unterteilt, dennoch gehen viele Autoren davon aus, daß die meisten nodulären T-Zell-Lymphome ein aggressives biologisches Verhalten aufweisen und als hochmaligne Tumore betrachtet werden sollten (Noorduyn et al. 1990).

## [Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

### 3.2. Proliferationsaktivität in Tumoren

#### 3.2.1. Einführung

Die Proliferationsaktivität eines Tumors basiert auf sich im Zyklus befindenden Zellen und äußert sich im Wachstum des Tumors. Sie kann somit auf Grund ihres Mechanismus oder ihres Ergebnisses definiert werden (Brugal 1994).

Der Mechanismus wird charakterisiert durch die Geschwindigkeit des Zellzyklus oder die diesem indirekt proportionale Generationszeit der Zellen und die Anzahl sich im Zyklus befindender Zellen, die auch als Wachstumsfraktion bezeichnet wird.

Das Wachstum eines Tumors ist dagegen klinisch erfaßbar. Es wird gemessen als Tumorverdopplungszeit, z.B. durch Palpation oder Röntgenbilder, und variiert in Abhängigkeit von der Art des Tumors. Dies erklärt sich aus dem Umstand, daß mit dem Tumorwachstum nicht nur die

Anzahl neugebildeter Zellen und damit Gewebemasse beschrieben wird, sondern auch die Balance zum Anteil abgestorbener oder metastasierter Zellen. Ein Tumor mit hoher Proliferationsaktivität kann also ein niedriges Tumorstadium aufweisen. Somit sind die Wachstumsfraktion und die Zellzykluszeit klinisch nicht erfassbar, und die Tumorverdopplungszeit kann nicht durch diese kinetischen Parameter ermittelt werden (Brugal 1994).

Der folgende Abschnitt geht näher auf die Kinetik der Zellproliferation ein, wobei die Zellzyklus-Phasen mit dem Phasenindex, die Wachstumsfraktion und die Zellzykluszeit näher betrachtet und einige ausgewählte Proliferationsmarker erläutert werden.

### 3.2.2. Zellzyklusphasen und Phasen-Index

Der Zellzyklus besteht aus den Phasen  $G_1$ , S,  $G_2$  und M. Diesen gegenüber steht die Ruhephase  $G_0$  (Trene 1993b). Der Anteil von Zellen in einer der Phasen an der Gesamtpopulation von Tumorzellen kann durch verschiedenen Marker ermittelt werden. Mit dieser Aussage allein läßt sich die Proliferationsaktivität nicht näher beschreiben, da der Anteil von Zellen in einer Zyklusphase nicht konstant ist, sondern sich relativ mit der Veränderung der Länge einer solchen Phase oder der Wachstumsfraktion vergrößern oder verkleinern kann und natürlich auch absolut durch eine Änderung der Zellzahl in der jeweiligen Zyklusphase (Brugal 1994).

Mit Hilfe mitotischer Figuren ist es möglich, den M-Phasen-Index zu ermitteln. Dieser charakterisiert den Anteil sich in der Mitose befindlicher Zellen. Entsprechend des jeweiligen Mitoseabschnittes, in dem sich die Zelle befindet, sind in konventionellen Präparaten die klassischen Teilungsmuster zu erkennen (siehe Anhang, Abb. 13 - 16).

Als weitere Phase des Zellzyklus ist außerdem noch die S-Phase gesondert erfassbar. Das kann mit Hilfe des Antikörpers gegen das „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA), auch Cyclin genannt, geschehen.

#### PCNA

PCNA/Cyclin ist ein 36 kDa Protein, das in verschiedenen Zelltypen des Menschen, sowie von Mäusen, Hamstern und Vögeln nachgewiesen wurde (Bravo et al. 1987). Es ist assoziiert mit der DNA-Polymerase  $\delta$  und fungiert als Co-Faktor während der DNA-Synthese (Pich et al. 1992b). Beschrieben wurden zwei Formen von PCNA: Die eine findet sich in sehr niedrigen Konzentrationen in ruhenden Zellen und spielt eine Rolle bei DNA-Reparaturen, die andere ist an Orten der Replikation lokalisiert (Oates et al. 1994). Letztere vermehrt sich stark in Zellen, die sich im Zellzyklus befinden, wobei eine Erhöhung in der  $G_1$ -Phase auftritt, die ihren Höhepunkt in der S-Phase erreicht und während der  $G_2$ -Phase bis auf eine sehr niedrige Konzentration in der M-Phase fällt (Trene 1993a). Neben dieser "Phasenüberlappung" stellt die lange Halbwertszeit der PCNA von mehr als 20 Stunden ein weiteres Problem bei der Beurteilung der PCNA-markierten Zellen dar. In der Immunhistochemie äußert sich dieser Umstand, sowie das generelle Vorhandensein von PCNA, in einer schwachen, diffusen Färbung der Zellkerne und des Plasmas. Demgegenüber ist die stabilere PCNA-Fraktion, welche an die Replikationsorte gebunden ist, durch punktförmige nukleäre Strukturen erkennbar (Brugal 1994). Deshalb sollten nur intensiv gefärbte Zellkerne, die durch dunkle Granulationen charakterisiert sind, gezählt werden (Yu et al. 1992). Markiert wird die PCNA durch den humanen monoklonalen Antikörper PC10.

### 3.2.3. Wachstumsfraktion

Die Wachstumsfraktion spiegelt das Verhältnis von Zellen im Zellzyklus zur Gesamtheit der Zellen, also ruhenden und proliferierenden Zellen, wieder. Zur Erfassung dieses Parameters ist es somit notwendig, die Anzahl ruhender oder proliferierender Zellen in einem repräsentativen Tumorabschnitt zu ermitteln. Eine Markierung der Zellen im Zellzyklus kann durch den Marker Ki-67 erfolgen.

#### Ki-67 (MIB-1)

Gerdas et al. stellten 1983 den monoklonalen Antikörper Ki-67 vor. Damit war zum ersten Mal ein Antikörper verfügbar, der ein nukleäres Antigen markierte, welches nur in proliferierenden Zellen zu finden war. Eine Reaktion mit ruhenden Zellen konnte nicht festgestellt werden.

In einer weiteren Arbeit (Gerdas et al. 1984) gelang es dann, Ki-67 den einzelnen Zyklusphasen zuzuordnen. So konnte bewiesen werden, daß sowohl in der S-, der  $G_2$ - als auch in der M-Phase ein Ki-67-nukleäres Antigen auftrat, aber in der  $G_0$ -Phase, also in ruhenden Zellen, fehlte. Dagegen ist die Ki-67 Antigen Expression in Zellen in der  $G_1$ -Phase umstritten. Während Zellen, die von der  $G_0$ - in die  $G_1$ -Phase ( $G_{1A}$  und  $G_{1T}$ ) gelangten, negativ waren, reagierten Zellen in der  $G_1$ -Phase nach der Mitose stets positiv. Eine Vermutung zur Klärung dieses Phänomens ist das Durchlaufen der Zellen von verschiedenen metabolischen Pfaden nach der  $G_0$ - oder M-Phase in der  $G_1$ -Phase. Deshalb sollte der Übergang von der M- in die  $G_1$ -Phase als initiale Sequenz der Proliferation und nicht als Bestandteil des Zellzyklus betrachtet werden.

Das Ki-67 nukleäre Antigen ist während der Mitose perichromosomal lokalisiert und scheint somit zu den non-Histon-Proteinen zu gehören (Soomro et al. 1990). Bei der Analyse von proliferierenden Zellen mit Western Blot stellt es sich als 345 und 395 kDa Doppelband dar (Gerdas et al. 1992). Das kodierende Gen befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 10 und ist evolutionär hochkonservativ (Brugal 1994). Dies ermöglicht seinen Einsatz in der Veterinärpathologie.

Ein entscheidendes Problem war die Limitierung der Applikation von Ki-67 auf Frischmaterial, da eine Fixierung zur Zerstörung der zu markierenden Epitope führte. Durch Klonierung und Sequenzierung von Teilen des Ki-67 Genes (Gerdas et al. 1991) wurde ein neuer Antikörper, MIB-1, produziert, der das Ki-67 nukleäre Antigen auch in Gefrier- und in routinemäßig fixierten Paraffinschnitten (Shi et al. 1991) erkennt.

### 3.2.4. Zellzyklusgeschwindigkeit

Als ein entscheidender Parameter der Proliferationsaktivität ist die Zellzykluszeit zu betrachten. Bisher existierten keinerlei Marker, um die Zeit oder die Geschwindigkeit des Zellzykluses zu erfassen und somit die Proliferationskinetik interpretieren zu können (Brugal 1994). Mit der Untersuchung von argyrophilen Nukleolus organisierenden Regionen (AgNORs) durch mikroskopische Zählung oder Mikroskopbildanalyse in verschiedenen Zelllinien konnte ein Zusammenhang zwischen Zellzyklus und AgNORs ermittelt werden (Derenzini et al. 1992). Während einige Autoren davon ausgehen, daß die AgNOR-Anzahl die Ploidie widerspiegelt (Suresh et al. 1990), bewiesen Öfner et al. (1992) an Zelllinien von Mammatumoren,



daß die AgNOR-Fläche mit der Zellverdopplungsrate korreliert ist. Derenzini et al. (1994) fanden heraus, daß die Menge der AgNORs vom Anfang der G<sub>1</sub>-Phase bis zur späten S-Phase zunimmt. Wesentlich stärker ist dagegen ein Anstieg der AgNORs mit schneller werdender Zellverdopplungsrate (Derenzini et Trere 1991a). Selbst bei einem Unterschied von nur 4 Stunden in der Verdopplungszeit konnte eine statistisch signifikante Änderung der AgNOR-Fläche festgestellt werden (Trere et al. 1988). Eine solche Bewertung kann nur an Interphase-Kernen durchgeführt werden (Derenzini et Ploton 1991).

Da eine Beurteilung der AgNORs und der verschiedenen AgNOR-Parameter eng mit den Strukturen und dem Metabolismus der Nukleolen verbunden ist, geht das nächste Kapitel näher auf diese Problematik ein. Die unterschiedlichen AgNOR-Parameter wurden sowohl für die Klärung diagnostischer, als auch prognostischer Fragestellungen an vielen Tumoren herangezogen. Eine Trennung von Zellen mit unterschiedlicher Malignität, z.B. Hyperplasien und Neoplasien, bereitet bei jeweils hoher Proliferationsaktivität große Schwierigkeiten (Rüschhoff 1992). Auch bei Vorliegen signifikanter Korrelationen ist der dafür verantwortliche Mechanismus oft unzureichend aufgeklärt.

## AgNORs

Der Nukleolus ist eine lebenswichtige, intranukleäre Organelle, die sich in somatischen Zellen z.B. nach der Feulgen-Färbung hell vom übrigen Chromatin abhebt (Bielka 1985). Als Ort der rRNA-Synthese ist er für die Deckung des enormen Bedarfs der Säugerzelle an rRNA verantwortlich (Wachtler et al. 1986). Er besteht aus Loops von DNA (mehreren hundert Doppelsträngen von rRNA Genen), an denen die Transkription von rRNA-Molekülen stattfindet, an die sich sofort eine Assoziation mit verschiedenen Proteinen anschließt, was zur Entstehung von präribosomalen Partikeln führt (Ploton 1994). Howell (1982) analysierten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie die Feinstruktur des Nukleolus genauer und grenzten drei Komponenten ab:

1. einen aus 15 nm großen Fibrillen zusammengesetzten "granulären Anteil" (granular component)
2. einen aus sehr dicht gepackten 3-5 nm dicken Fibrillen aufgebauten "dichten fibrillären Anteil" (dense fibrillar component)
3. ein von den zuvor beschriebenen Anteilen eingeschlossenes, aus locker angeordneten 4-8 nm dicken Fasern bestehendes "fibrilläres Zentrum" (fibrillar centre, siehe Abb. I).

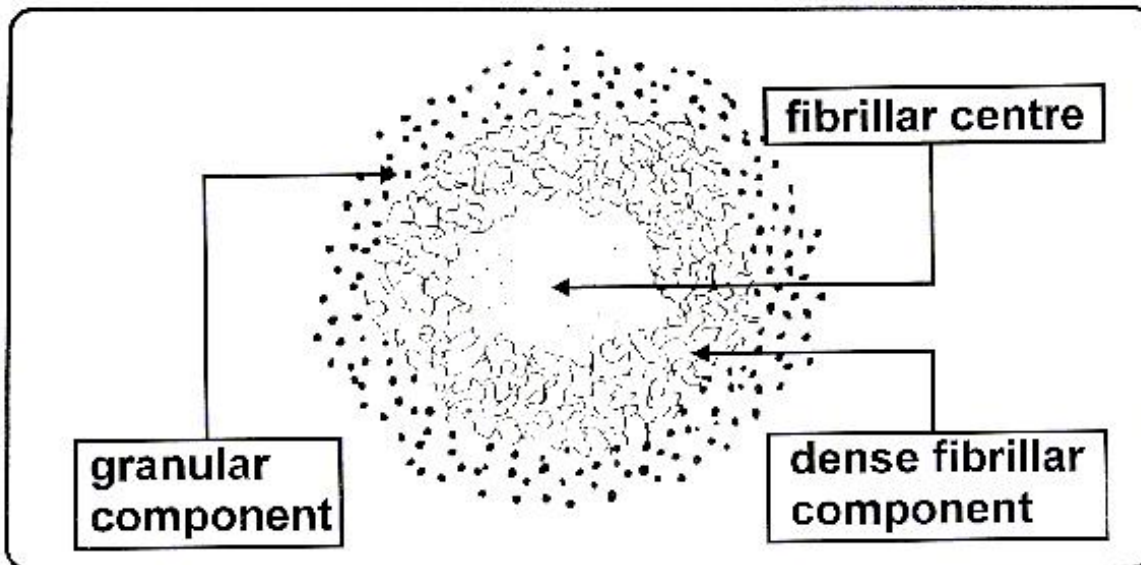


Abb. I: Ultrastruktur eines fibrillären Zentrums und der umgebenden Schichten (nach Crocker 1990)

Eine Identifizierung der rRNA-Gene nur nach morphologischen Kriterien ist bis jetzt nicht gelungen (Somerville et Scheer 1987). Mit der Chromatin spreading Technik ließ sich die Organisation der rRNA-Gene in den Nukleolen weiter aufklären (Scheer et Benavente 1990). Aus den Nukleolen wurde ein fibrilläres Material isoliert, das im Elektronenmikroskop an hintereinandergereihte "Farnwedel" erinnert. Hierbei handelt es sich um vollständig entspiralisierte, fadenförmig ausgezogene rDNA (Rüschhoff 1992). Zahlreiche Polymerase I-Enzyme mit seitlich davon wachsenden RNA-Transkripten sind perlschnurartig aufgelagert. Die rRNA-Gene existieren in multiplen Kopien, die als tandemartige Wiederholungen angeordnet sind, wobei jeder "Farnwedel" jeweils einem für rRNA kodierenden Gen entspricht, welche durch nichttranskribierende Zwischenstücke (Spacer) getrennt sind. Thiry et Goessens (1992) untersuchten die Lokalisation der rRNA-Gene und kamen zu dem Schluß, daß sie sich in den fibrillären Zentren und in wenigen Chromatinaggregationen innerhalb des Nukleolus befinden würden. Damit widerlegten sie die Hypothese von Wachtler et al. (1992), die den dichten fibrillären Anteil der rRNA-Gene zugeordnet hatten. Neben Nukleinsäuren treten im Nukleolus auch Proteine auf. Während die Histon-Proteine als "DNA-Skelett" fungieren (Rüschhoff 1992), sind die non-Histon-Proteine nur unvollständig erforscht. Sie haben grundsätzlich zwei Funktionen: Zum einen regulieren sie die RNA-Synthese (Jordan et Cullis 1982) und andererseits spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Chromatinorganisation, so z.B. das Nukleoplasmin.

Parallel zum Zellteilungszyklus verläuft der Nukleoluszyklus, der die Auflösung der Nukleolen während der Prophase und deren Neubildung während der Telophase beinhaltet (Crocker 1990). In germinalen Zellen sind Nukleolus-organisierende Regionen (NOR) entweder als interstitielle Sekundäreinschnürungen auf den Chromatiden erkennbar oder sie nehmen eine terminale Position ein (Stahl 1982). Sie sind die Genorte der rDNA und da rRNA selbst den Hauptbestandteil der Ribosomen bildet, werden NORs auch als Ribosomenfabrik der Zelle bezeichnet (Rüschhoff et Barth 1992). Basierend auf den morphologischen Gemeinsamkeiten und dem Vorhandensein von argyrophilen Proteinen wird generell angenommen, daß die fibrillären Zentren das Interphase-Gegenstück zu den chromosomalen NORs bilden (Goessens 1984). Allerdings kann sich die Anzahl der

fibrillar centers als Folge nukleolärer Aktivitäten in einem gegebenen Zelltyp verändern und die Anzahl der chromosomalen NORs deutlich übersteigen (De La Torre et Gimenez-Martin 1982).

Eine grundlegende Arbeit für die Aufklärung der NOR-Strukturen lieferten Goodpasture et Bloom (1975) mit der Entdeckung, daß Silber selektiv die sekundären Konstriktionen auf Metaphasechromosomen anfärbt. Durch Howell (1977) wurde darauf hingewiesen, daß sich das Silber wahrscheinlich nicht an rDNA direkt bindet, sondern an spezifische non-Histon-Proteine. Busch et al. (1984) analysierten diese Proteine und konnten eine selektive Anfärbbarkeit für C<sub>23</sub> und B<sub>23</sub> mit Silber feststellen. C<sub>23</sub>/Nukleolin ist das am besten untersuchte Nukleolusprotein mit einem Molekulargewicht von 110 kDa. Es ist an der Regulation der Polymerase I-Aktivität beteiligt und damit an der rDNA-Transkription (Jordan et Cullis 1982). Spector et al. (1984) wiesen in einer Untersuchung die Lokalisation dieser Proteine in den fibrillar centers und den umgebenden dense fibrillar components nach. Dies wurde auch in weiteren Arbeiten bestätigt (Angelier et al. 1982, Hernandez-Verdun et Derenzini 1983, Pession et al. 1991).

Wie schon in den vorherigen Abschnitten angedeutet, wird der exakte Ort der rRNA Synthese kontrovers diskutiert. So konnten Scheer et Benavente (1990) die Polymerase I nicht im dense fibrillar component, sondern nur im fibrillar center des Nukleolus nachweisen. Jordan et Cullis (1982) gehen davon aus, daß im fibrillar center nur nichttranskribierende Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Nukleolin in Form eines Präinitiationskomplexes vorliegen. Nach der Initiierung geht dieser in den dense fibrillar component über und die Transkription startet am Promotor (siehe Abb. II). An dieser Stelle bindet Nukleolin, dem somit die Steuerung der NOR-Transkription zukommt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Derenzini et al. (1990c), die den fibrillar centers und den dense fibrillar components ebenfalls eine Schlüsselrolle bei der Transkription zuordnen.

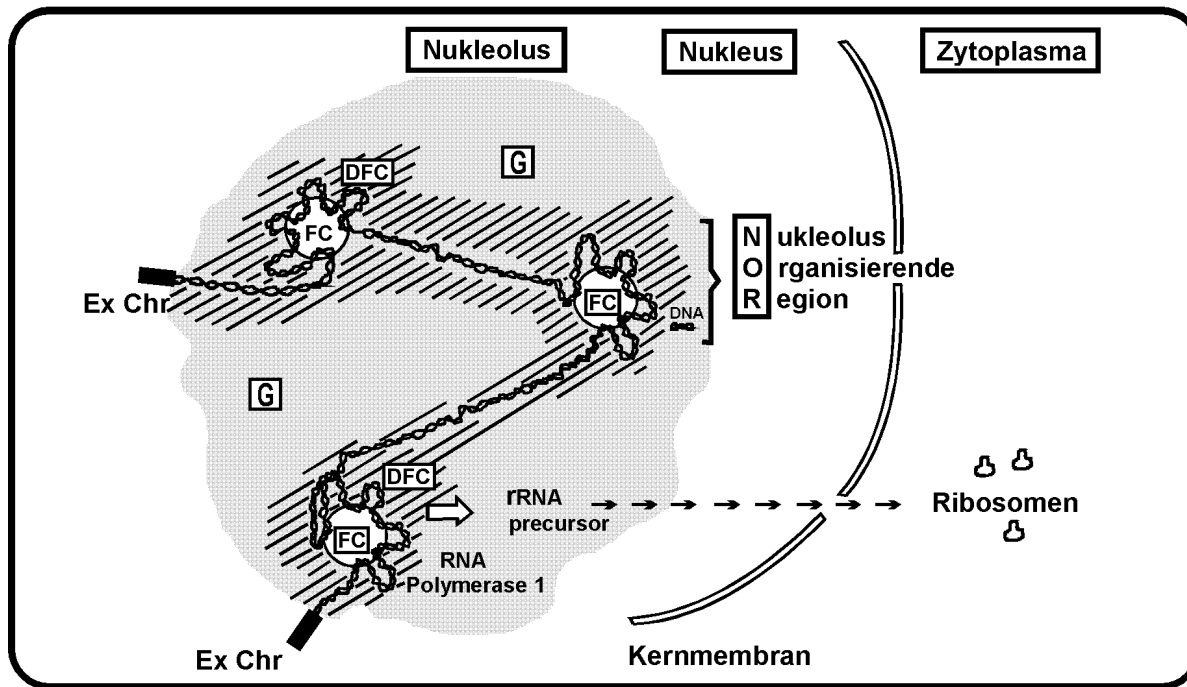


Abb. II: Nukleolusstruktur (nach Jordan et Cullis 1982),

FC = fibrillar center, DFC = dense fibrillar component, G = granular component, ExChr = extranucleolar and condensed chromatin

Während Rüschoff (1992) und andere Autoren davon ausgehen, daß nur phosphorylierte und nicht methylierte Proteine Silber binden und somit nur aktiv an der Transkription beteiligte Strukturen sichtbar gemacht werden, lehnen Roussel et al. (1992) eine solche Erklärung ab und postulieren die Abhängigkeit der Anfärbbarkeit von der Konzentration von sauren Aminosäuren am Aminosäurende des Nukleolins.

Nach dem heutigen Wissensstand gelten folgende Kenntnisse für die Bewertung von AgNORs als gesichert:

Nur aktiv transkribierende NOR-Regionen sind argyrophil und werden als AgNORs mit Silber sichtbar gemacht (Rüschoff et Kleb 1992). Die Versilberung ist an aktivierte NORs gebunden, und wie Wachtler et al. (1986) an ruhenden und stimulierten Lymphozyten bewiesen, existierten in letzteren deutlich mehr AgNORs als Hybridisierungsstellen. Dieses Verhältnis war für ruhende Lymphozyten umgekehrt, was einen direkten rDNA-Nachweis durch AgNORs ausschließt.

Die Anzahl der kleinen AgNORs (< 0,16 µm) ist nahezu linear mit der rRNA-Syntheserate korreliert (Busch et al. 1984). Es sollten vor allem diese Partikel, auch in Clustern, als einzelne Strukturen erfaßt werden, um mit der AgNOR-Anzahl eine Aussage über die Proliferationsaktivität treffen zu können.

Field et al. (1984) bewiesen die Abhängigkeit der AgNOR-Anzahl, -Fläche und -Verteilung von den Zellzyklusphasen und der Zellaktivierung. Bei schnell wachsenden Zellen ist die G<sub>1</sub>-Phase zu kurz, um das rDNA-Material in Form eines einzelnen Nukleolus zu sammeln. Dies führt zu einer Erhöhung der AgNOR-Anzahl bis hin zu feindispersen Verteilungsmustern (Rüschoff et Barth 1992). Da ein besonderes Augenmerk in dieser Arbeit auf einer Bewertung der Verteilungsmuster lag, wird im Ergebnisteil näher auf dieses Problem eingegangen.

Weiterhin konnte bewiesen werden, daß mit zunehmender Zellreife sich die AgNOR-Anzahl verkleinerte bei gleichzeitiger Vergrößerung der AgNOR-Fläche. Dabei fiel in stimulierten, also stark proliferierenden Zellen die große Anzahl kleiner AgNORs innerhalb der Nukleolen auf (Crocker 1990).

Durch Derenzini et al. (1987, 1988a, 1990b) wurde in mehreren Arbeiten der Zusammenhang zwischen AgNORs und Proliferationsaktivität nachgewiesen. Die Zellzyklusgeschwindigkeit war ausschließlich mit der AgNOR-Anzahl und/oder der AgNOR-Gesamtfläche korreliert.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Darstellung der AgNORs von dem Aktivierungszustand der rRNA-Gene (NORs), dem Zellzyklus, dem Reife- und Proliferationsgrad und somit auch von der Dignität einer Zelle abhängig ist (Rüschoff 1992). Dieser Zustand läßt sich durch Erfassung der AgNOR-Parameter für die Anzahl, die Fläche und die Verteilung charakterisieren.

#### Erfassung und Beurteilung von AgNORs

Die Silberfärbung nach Ploton et al. (1986) wurde von verschiedenen Autoren zur Sichtbarmachung der Nukleolus organisierenden Regionen angewendet und ihre Spezifität bestätigt (Crocker 1990, Plate et al. 1992, Rüschoff et al. 1992). Während der letzten Jahre erschien eine große Anzahl von Publikationen zur Verbesserung der Silberimprägnation. Diese Arbeiten versuchten Problemen der Hintergrundfärbung und Färbeartefakten durch Fixativa mit Färbekombinationen mit der Feulgen-Reaktion (Korek et al. 1991), Nachbehandlungen mit Schiff's Reagenz (Moreno et al. 1988) oder Thiosulfaten (Lindner 1993) oder mit einer primären Wärmebehandlung (Leong et al. 1986, Öfner et al. 1994a) bzw. mit einer Erwärmung der Schnitte während des Färbvorganges (Chin et al. 1989, Chiu et al. 1989, Coghill et al. 1990) zu begegnen. Andere Autoren kombinierten die AgNOR-Technik mit immunhistochemischen Methoden, um eine Trennung heterogener Zellpopulationen vorzunehmen zu können (Murray et al. 1989). Auch die Anwendung an zytologischen Präparaten erwies sich als möglich (Boldy et al. 1989, Rüschoff et al. 1989a).

Der Einfluß von Fixativ und Färbeprotokoll (Temperatur und Dauer) auf die AgNOR-Fläche und -Anzahl ist unbestritten (Derenzini et al. 1988b, Zaczek et al. 1994). Dies führte zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Auswertung (Griffiths et al. 1989, Biesterfeld et al. 1994). Durch Smith et al. (1988) und Rowlands et al. (1993) wurden zusammenfassende Arbeiten zum Einfluß unterschiedlicher Fixierungen auf AgNORs publiziert.

Eine Antwort auf die Probleme der Färbemethodik gab Crocker 1995. Er stellte heraus, daß die AgNOR-Färbung prinzipiell einfach ist. Eine der Grundvoraussetzungen für gute Ergebnisse ist die ausschließliche Verwendung von deionisiertem Wasser. Die Fixierung mit Formalin ist ein Aspekt, der zwar die Qualität der Auswertung beeinträchtigen kann, aber für die Verwendung von Routinematerial unerlässlich ist. Ein komplizierteres Färbeprotokoll würde den Vorteil der schnellen und einfachen Anwendung der AgNOR-Technik gegenüber allen anderen Proliferationsmarkern zunichte machen.

Als ein besonderes Problem stellten sich in den letzten Jahren Fragen zur Methodik der Auswerteverfahren der AgNOR-Technik (Rüschoff et al. 1989b, Hittmair et al. 1991) dar. So gab es Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit der Resultate unterschiedlicher Arbeitsgruppen. Die Arbeiten von Giri et al. (1989) und Smith et al. (1988) sowie Raymond et al. (1989) über AgNORs in Mammatumoren unterscheiden sich ebenso in ihrer Aussage zur prognostischen Bedeutung der AgNOR-Zahl wie die Arbeiten von Howat et al. (1988), Leong et al. (1989) und Reborá (1992) an Melanomen. Hinzu kommen sogar Unterschiede in der Malignitätsbestimmung, wie bei der Abgrenzung von Melanomen von Spitznävi (Fallowfield et al. 1988, Howat et al. 1989, Gonzalez-Campora et al. 1991, Orrell et al. 1991). Es stellt sich somit die Frage, welche AgNOR-Parameter prognostisch bedeutsam sind und wie sie erfaßt werden sollten.

Ursprünglich wurden durch Crocker et al. (1989) eine Auszählung aller AgNORs unter Durchfokussierung des Schnittes vorgeschlagen. Da diese Methode zeitaufwendig ist und von der Schnittstärke abhängt, verwendeten Rüschoff et al. (1990c), Ploton et al. (1992), Hufnagel et al. (1994) und Öfner et al. (1994b) die automatisierte Mikroskopbildanalyse. Mit der Anwendung dieser Methode erhöht sich zwar die Genauigkeit aber auch die Anzahl der erfaßten Parameter. Dies wird zum Problem, wenn nur einzelne Parameter gemessen oder bewertet werden. So sind Arbeiten von Derenzini et al. (1990a), Eusebi et al. (1991), Mourad et al. (1992) und Roller et al. (1993) an Mammatumoren nicht vergleichbar, da sie sich entweder auf die AgNOR-Fläche, die AgNOR-Zahl oder die AgNOR-Cluster-Bewertung stützen.

In den Richtlinien des AgNOR-Komitees (Aubele et al. 1994e) wird die Auszählung der AgNORs unter Ölimmersion als Methode zweiter Wahl charakterisiert. Die Mikroskopbildanalyse wird als beste Technik vorgeschlagen, auch wenn damit nicht die eigentlichen AgNORs, sondern eher nukleoläre Strukturen erfaßt werden. Trere (1994) schlug sogar eine Ausdehnung der Färbzeit und Versilberung des gesamten Nukleolus als Meßgrundlage vor. Crocker wies 1995 auf das Problem der Kosten einer Mikroskopbildanalyse hin und forderte eine Standardisierung der AgNOR-Bewertung. Veröffentlichungen von Lesty et al. (1992) oder Aubele et al. (1994a, b) machen die Notwendigkeit einer multivariaten Analyse zur prognostischen Bewertung der großen Menge an erhaltenen AgNOR-Parametern deutlich.

Der große Vorteil der Mikroskopbildanalyse liegt in der Möglichkeit, ruhende Lymphozyten als interne Kontrolle (Derenzini et al. 1991b) zu nutzen. Ein oft kritizierter Umstand ist die Zeitintensivität der Vermessung der AgNORs mit der Mikroskopbildanalyse, da eine Mindestanzahl von 100 erfaßten Zellen pro Tumor von vielen Autoren als notwendig erachtet wird. Durch Rüschoff (1992) wurde mit der Technik des „kumulierten Mittelwertes“ nachgewiesen, daß schon eine Vermessung von 30 Normalgewebszellen die Fehlergrenze im Mittel auf unter 5% drückt. Im Gegensatz dazu sank der Fehler auch bei 500 vermessenen Zellen kaum (Martin et al. 1992).

Weiterhin ist es ein Mangel der Mikroskopbildanalyse, daß neben den Kosten der Anlage eine Bewertung der Färb- und Verteilungsmuster noch nicht möglich ist. Ansätze dazu geben Field et al. (1984), Crocker et al. (1989), Hansen et al. (1990), Hufnagel et al. (1991), Ferrari et al. (1993) und Rüschoff et al. (1994).

Field et al. (1984) untersuchten die Silberfärbung nukleolärer Strukturen in PHA-stimulierten humanen Lymphozyten. Ihnen war die Spezifität bestimmter Nukleolusproteine, Silberionen zu binden, nicht bekannt und die gefärbten Strukturen wurden als Nukleolen bezeichnet. Ruhende, nicht stimulierte Zellen hatten in der Regel einen kleinen silbergefärbten Nukleolus (siehe Abb. III, A). Dagegen hatten Lymphozyten der 2. und 3. Generation in allen Zyklusstadien nach einer PHA-Stimulierung mehrere Nukleolen. Die durchschnittliche AgNOR-Fläche verringerte sich in stimulierten Zellen, aber die gesamte AgNOR-Fläche war größer als die Fläche der einzelnen argyrophilen Strukturen in Zellen der 1. Generation (siehe Abb. III, F und G). Eine lineare Anordnung der AgNORs war charakteristisch für Zellen in der S-Phase (siehe Abb. III, D und E).

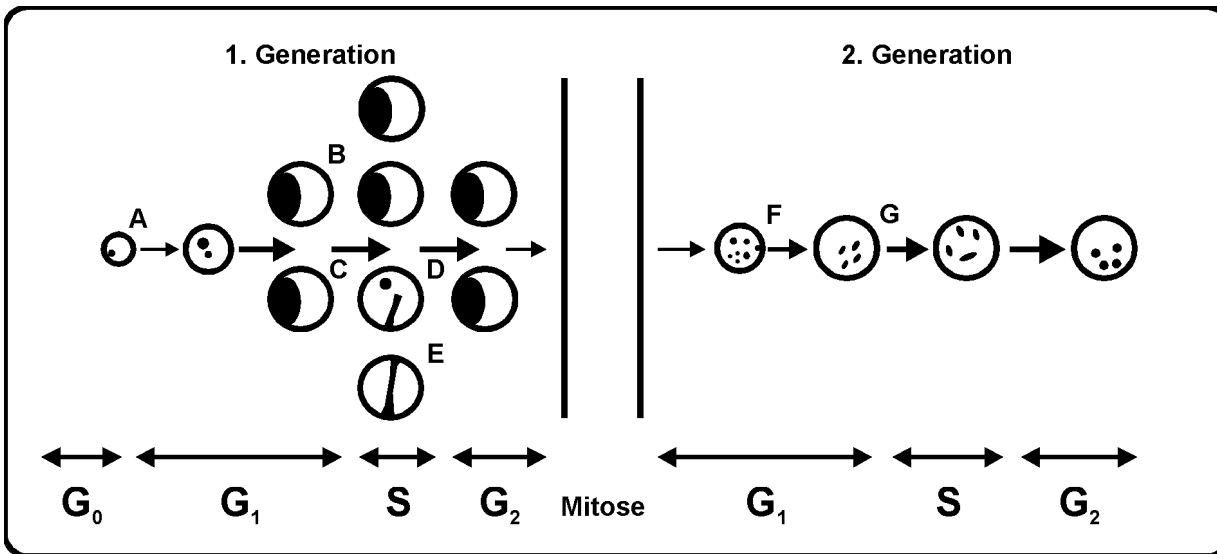


Abb. III: Entwicklung der Nukleolen in einer mit PHA stimulierten Zellkultur humaner Lymphozyten (nach Field et al. 1984)

Diese Ergebnisse vervollständigen die Studien von Anastassova-Kristeva (1977) zur nukleolären Kinetik während der Mitose.

Crocker et al. (1989) beschrieben vollständig aggregierte, runde, solitäre AgNORs in ruhenden menschlichen Lymphozyten und anderen Zellen. Sie schlußfolgerten, daß diese Strukturen mit dem eigentlichen Nukleolus korrespondieren. Weiterhin beschrieben sie zwei andere grundsätzliche Verteilungsmuster von AgNORs. Im Typ 2 befanden sich mehrere kleinere AgNORs sowohl im Inneren des Nukleolus, als auch im Zellkernplasma. Der Typ 3 war durch eine große Anzahl im Zellkern verstreuter, kleiner "echter" AgNORs charakterisiert und repräsentativ für hochmaligne Zellen.

Hansen et Ostergard (1990) schlugen eine Methode zur Differenzierung zwischen gut- und bösartigen Prostatatumoren mittels AgNOR-Verteilungsmuster vor. Die beschriebene Klassifikation enthielt 3 verschiedene Typen, welche "AgNOR-Satelliten" präsentierten (siehe Abb. IV, A1: einzelne "AgNOR-Satelliten", A2: mehrere verstreute "AgNOR-Satelliten", A3: mehrere gruppierte "AgNOR-Satelliten"), 3 verschiedene Typen, welche fein granulierte AgNORs in Nukleolen enthielten (siehe Abb. IV, B1: kleine, fein granulierte AgNORs, B2: mittelgroße, fein granulierte AgNORs, B3: große, fein granulierte AgNORs) und 3 verschiedene Typen, welche "semi-solide" AgNORs enthielten (siehe Abb. IV, C1: kleine, "semi-solide" AgNORs, C2: mittelgroße, "semi-solide" AgNORs, C3: große, "semi-solide" AgNORs). In der Arbeit von Hansen et Ostergard (1990) wurde keine diagnostische Bedeutung der AgNOR-Anzahl ermittelt, dagegen ergab die Typisierung die Möglichkeit, zwischen benignen und malignen Veränderungen zu unterscheiden. Die Typen C1, C2 und B2, B3 wurden dabei nur in Karzinomen beschrieben.

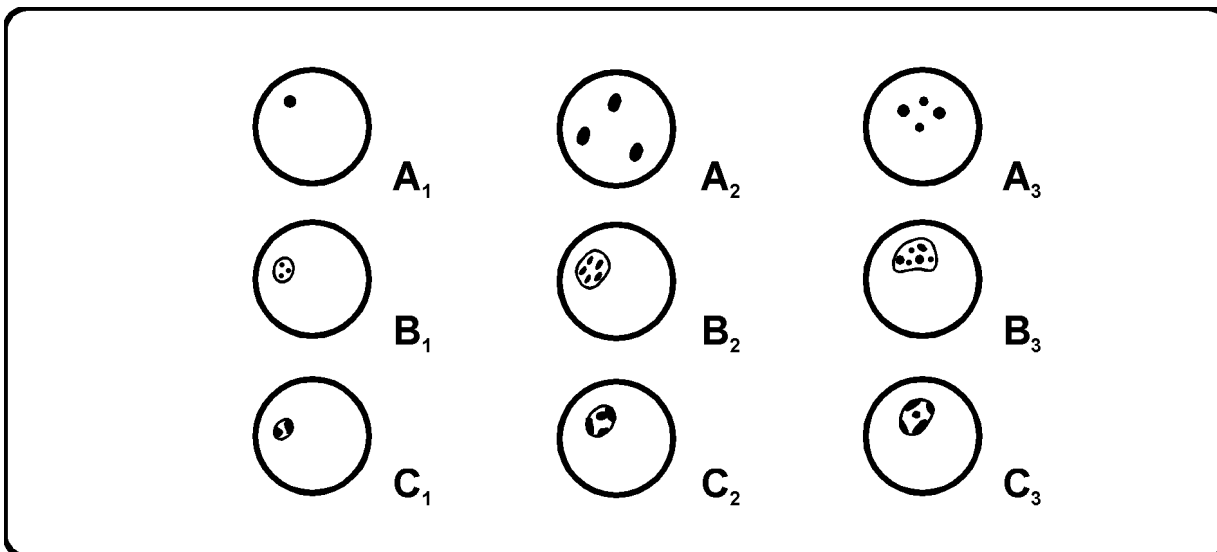


Abb. IV: AgNOR-Typisierung nach Hansen et Ostergard 1990

Rüschoff et al. (1994) verwendeten erstmals die Mikroskopbildanalyse, um AgNOR-Verteilungsmuster zu untersuchen. Die durchschnittliche AgNOR-Anzahl und die gesamte AgNOR-Fläche erhöhten sich signifikant mit sich verringernder Populationsverdopplungszeit in 4 verschiedenen Urothelzelllinien. Zusätzlich erhöhten sich beide Parameter während des Übergangs von der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase zur S/G<sub>2</sub>-Phase und waren ebenfalls erhöht in polyploiden Zellen. In zytologischen Präparaten wurden große AgNOR-Aggregate (Cluster) nur in hochdifferenzierten Zelllinien gefunden. Eine kombinierte Analyse wurde empfohlen.

### 3.2.5. Prognostische und diagnostische Bedeutung der beschriebenen Proliferationsmarker

In den meisten Veröffentlichungen zur prognostischen Bedeutung von Proliferationsmarkern werden nur ein Marker, in seltenen Fällen auch zwei genutzt, um ein Verhältnis zu den untersuchten Überlebensparametern herzustellen. Die aufeinanderfolgende Bewertung der Wachstumsfraktion durch Ki-67, der Zyklusgeschwindigkeit mit AgNORs und letztlich der S-Phase mit PCNA (Mitoserate), als Anhaltspunkt für mögliche karyologische Abnormalitäten, wäre notwendig, um die Kinetik einer Zellpopulation zu beschreiben (Brugal 1994). Auch wenn alle bisherigen Versuche fehlten, einen solchen Zusammenhang als generelle Formel zu erfassen, gibt eine kombinierte Betrachtung dennoch die Möglichkeit, Beziehungen zwischen karyologischen Besonderheiten, vergrößerter Proliferationsgeschwindigkeit, klonaler Expansion und Metastasierung zu erkennen. Ein Beweis der Komplexität dieser Vorgänge ist die unterschiedliche prognostische Bedeutung der angeführten Proliferationsmarker für verschiedene Tumoren bei einer isolierten Betrachtung der einzelnen Marker.

Einen Überblick über den prognostischen Nutzen der AgNORs bei verschiedenen Tumoren des **Menschen** geben die Tabellen 7 (Korrelation mit prognostischen Daten) und 8 (keine Korrelation). Weitere Angaben finden sich bei Derenzini et Trere (1994) und Martin (1994). Ebenso ist ein diagnostischer Einsatz von Proliferationsmarkern möglich. So konnten sowohl Burger et al. (1986), als auch Hara et al. (1990, 1991) mittels Ki-67 benigne von malignen ZNS-Tumoren beim Menschen differenzieren. Di Stefano et al. (1991) nutzten Ki-67 um Mammatumoren zu klassifizieren. Auch die AgNOR-Technik versuchte man zu diagnostischen Zwecken zu benutzen.

Die Tabelle 9 zeigt die Arbeiten der vergangenen Jahre zur prognostischen und diagnostischen Bedeutung von AgNORs in NHL. Die Ergebnisse der einzelnen Autoren zur Beurteilung von NHL variieren nicht nur in der AgNOR-Anzahl, sondern auch in der Auswahl der beurteilten Parameter. Yekeler et al. (1993) beschreiben eine AgNOR-Zahl von 1,2 pro Zellkern für unveränderte Lymphknoten, eine Zahl von 2,8 für niedrigmaligne Lymphome und von 10,5 für hochmaligne Lymphome. Bei Kim et al. (1988) liegen die Werte bei 1,3 für niedrigmaligne und 4,2 bis 8,3 für hochmaligne Lymphome. Crocker et Egan (1988) differenzieren zwischen niedrigmalignen Lymphomen mit 1,5 AgNORs pro Zellkern und hochmalignen Lymphomen mit 4,4 bis 6,8 AgNORs pro Zellkern. Einen Anstieg der Anzahl der AgNORs mit steigender Malignität postulieren alle Autoren. Dies trifft auch auf Myelome (Pich et al. 1994) und eine Unterscheidung zwischen gesundem Knochenmark (Arden et al. 1989) und chronischen, sowie akuten Leukämien zu (Ivanyi et al. 1992). Für die Diagnose von follikulären Hyperplasien gegenüber Lymphomen ist die AgNOR-Anzahl dagegen nicht geeignet (Cronin et al. 1989). Auch die AgNOR-Fläche wurde als Parameter zur Malignitätsbestimmung beschrieben (Jakijc-Razumovijc et al. 1992, Munakata et Hendricks 1993). Dabei steigt die Fläche der AgNORs mit abnehmender Malignität (Kalir et al. 1994). In einigen Arbeiten an NHL wird die AgNOR-Anzahl mit anderen Proliferationsmarkern bzw. zytogenetischen Parametern verglichen. So bewiesen Jan-Mohamed et al. (1989), daß die AgNOR-Zahl nicht mit der Chromosomenanzahl assoziiert ist, sondern eher mit der Zyklusgeschwindigkeit (Crocker et al. 1988b). Auch ergab sich eine lineare Korrelation zwischen Ki-67 und AgNORs (Crocker et al. 1988a) und dem S-Phasen-Index, der durch DNA-Zytometrie ermittelt wurde (Crocker et al. 1988b). Demgegenüber waren AgNORs nach einer Auswertung mit Mikroskopbildanalyse der aussagekräftigste prognostische Faktor. Dies traf sowohl auf die Überlebenszeit, die Tumorrespons, als auch auf die krankheitsfreie Überlebenszeit zu (Jakijc-Razumovijc et al. 1993a). Der S-Phase-Index war nur für die Tumorrückbildung signifikant (Jakijc-Razumovijc et al. 1993b).

Den weitaus größten Beitrag zur Untersuchung von NHL mit der AgNOR-Technik leisteten Crocker et Nar (1987) und Egan et Crocker (1992). Neben einer vollständigen quantitativen Analyse schlugen sie eine qualitative Bewertung der AgNORs auf Grund der Verteilungsmuster vor. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Veröffentlichung von Goodlad et al. (1991). In einer elektronenmikroskopischen Studie der Nukleolen von NHL stellten sie große, solitäre fibrilläre Zentren in den Nukleolen von niedrigmalignen Lymphomen und viele kleine fibrilläre Zentren in den Nukleolen von hochmalignen Lymphomen fest. Da diese Ergebnisse die Voraussetzung für die qualitative Evaluierung in dieser Arbeit bilden, wird auf weitere Details in den nachfolgenden Kapiteln eingegangen.

Nur wenige Autoren vergleichen mehrere Proliferationsmarker. In einigen Veröffentlichungen (Canepa et al. 1990, Dervan et al. 1990, Plate et al. 1990c, Kakeji et al. 1991, Trere et al. 1991) wurde eine Korrelation von AgNORs und Ki-67 für verschiedene Tumoren festgestellt. Das trifft auch für einen Vergleich von AgNORs und PCNA (Skopelitou et al. 1992, Reich et al. 1993, Patt et al. 1994) zu. Dies mag mit der spezifischen Proliferationskinetik des untersuchten Tumors zusammenhängen, darf aber nicht zu einer alternativen Betrachtung der einzelnen Marker führen. So fanden Jan-Mohamed et al. (1990) eine größere AgNOR-Anzahl in Ki-67 positiven Tumorzellen aus NHL, als in Ki-67 negativen und Hall et al. (1988) sogar eine lineare Korrelation zwischen Ki-67 und AgNORs in NHL. Dagegen konnten Pich et al. (1991) keine deutliche Korrelation der zwei Marker in Nierenkarzinomen zeigen. Mourad et al. (1994) beschrieben in Mammatumoren nur zwischen Ki-67 und dem prozentualen Anteil der Zellen mit mehr als 5 AgNORs eine Korrelation, nicht jedoch mit der durchschnittlichen AgNOR-Anzahl.

Beim **Hund** ist die Anzahl von Veröffentlichungen zum Einsatz der AgNOR-Technik wesentlich geringer (siehe Tabelle 10). Johnson et al. (1995) konnten Leiomyome von Leiomyosarkomen durch die AgNOR-Anzahl abgrenzen, allerdings nicht von Hyperplasien. Der Grad der Malignität von Seminomen konnte von De Vico et al. (1994) mittels der AgNOR-Anzahl und -Fläche bestimmt werden. Weitere Untersuchungen liegen von Preziosi et al. (1995) zu perianalen Adenomen, von Roccabianca et al. (1992) zur Abgrenzung normalen lymphatischen Gewebes von Hyperplasien und von Destexhe et Vanmanshoven (1995) zu Mammatumoren vor. Prognostische Beurteilungen an Hand von Überlebensparametern wurden nur in wenigen Studien vorgenommen. So konnten Bostock et al. unter Verwendung der AgNOR-Technik 1989 Mastzelltumoren und 1992 Mammatumoren prognostisch bewerten. Harmelin et al. (1995) analysierte das Sticker-Sarkom nach den selben Gesichtspunkten.

Vergleichende Arbeiten zu den unterschiedlichen Proliferationsmarkern sind auch für den Hund kaum vorhanden. Sarli et al. (1994) untersuchten testikuläre Tumoren mit PCNA, Ki-67 und der Mitoserate. Sie konnten keine Proliferationsunterschiede zwischen Sertolizelltumoren, Leydigzelltumoren und Seminomen feststellen und fanden eine lineare Regression zwischen den einzelnen Markern. Simoes et al. (1994) verglichen die Mitoserate, die AgNOR-Anzahl und die PCNA in Mastzelltumoren miteinander. Im Gegensatz zu Sarli untersuchten sie den Zusammenhang dieser Parameter mit den verschiedenen Überlebensdaten. Während eine histomorphologische Beurteilung mit der Überlebenszeit korrelierte, waren die PCNA und die AgNORs für die Tumorrespons und die Metastasierungswahrscheinlichkeit bedeutend.

## [Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

### 4. Material und Methoden

#### 4.1. Material

Hunde

Untersucht wurden 122 Hunde mit malignem Lymphom. Das Alter der Tiere betrug durchschnittlich 7,5 Jahre und reichte von 3 bis 13 Jahren. Von den Hunden waren 57 weiblichen und 65 männlichen Geschlechts. Ihre Masse variierte zwischen 10 und 75 kg. Patienten des „Instituts der

Internen Geneeskunde" der Universität Utrecht waren 47 Hunde. Alle anderen Tiere stammten aus der Universität Cambridge, wobei 25 in der Universität behandelt wurden und 50 aus umliegenden Tierarztpraxen kamen. Von den letzteren wurden 35 nicht behandelt. Damit umfaßt diese Studie 87 behandelte und 35 unbehandelte Hunde.

Das Auftreten eines malignen Lymphoms wurde durch die histologische Untersuchung eines exstirpierten Lymphknotens diagnostiziert, der durch seine Umfangsvermehrung den Verdacht auf Vorliegen eines Tumors hervorgerufen hatte.

Zur Feststellung des klinischen Stadiums nach dem WHO-System (Owen 1980) wurden an 54 Hunden die notwendigen Laboruntersuchungen vorgenommen und Röntgenbilder angefertigt.

## Chemotherapie

Kein Hund erhielt vor der Biopsie zytostatische Medikamente. Nach Bestätigung der Diagnose durch die Histologie wurde mit Chemotherapie begonnen. Alle Tiere aus Cambridge wurden nach dem selben Protokoll behandelt. Dies traf sowohl auf alle Fälle aus der Universität als auch aus den Tierarztpraxen zu. Die Behandlung stützte sich auf Cyclophosphamid, Vincristin und Prednisolon (COP). Eine genaue Auflistung der applizierten Mengen im entsprechenden zeitlichen Rahmen gibt Tabelle 6 (siehe Anhang). Alle Hunde aus Utrecht wurden zusätzlich mit PEG-L-Asparaginase und Doxorubicin (COPA) therapiert (Protokoll siehe Anhang Tabelle 5).

Die Respons des Tumors auf die Behandlung und die Überlebensparameter wurden nach einem vorgeschriebenem Schema erfaßt (siehe 4.2.6. Statistische Auswertung). Dadurch ergab sich eine Anzahl von 74 Hunden für eine Bewertung der prognostischen Bedeutung der untersuchten Parameter auf die Überlebenszeit und eine Anzahl von 48 Hunden für die gleichen Untersuchungen bezogen auf die krankheitsfreie Überlebenszeit.

## 4.2. Methoden

Das biopsierte Material wurde unverzüglich in 10%igem Formalin fixiert und routinemäßig in Paraffin eingebettet. Von allen Proben wurden Serienschnitte mit einer Dicke von 3 µm angefertigt. Pro Tumor wurden insgesamt 7 Schnitte benötigt, die für folgende Verfahren verwendet wurden:

- HE-Färbung
- Giemsa-Färbung
- Imprägnation mit Silber (nach Ploton et al. 1986)
- Immunhistologie:
  - Anti-CD3 Antikörper
  - Anti-CD79a Antikörper
  - Anti-PC10 Antikörper
  - Anti-MIB-1 Antikörper

### 4.2.1. Färbemethoden

#### Übersichtsfärbungen

##### Hämatoxylin-Eosin Färbung:

- entparaffinierte Schnitte in Hämatoxylin färben 5 Minuten
- Spülen mit Wasser
- Differenzieren in 1%igem Salzsäure-Alkohol 3 Sekunden
- Wässern bis zur intensiven Blaufärbung mindestens 30 Minuten
- Gegenfärben in 1%iger alkoholischer Eosinlösung 3 Minuten
- Entwässern und Eindecken

##### Giemsa-Färbung:

- entparaffinierte Schnitte bei 56°C in 1%iges Salzsäure-Methanol inkubieren 30 Minuten
- Spülen mit destilliertem Wasser
- Färben in Giemsa-Lösung: 10 ml Giemsa-Stammlösung, 40 ml destilliertes Wasser 20 Minuten
- Spülen mit destilliertem Wasser
- Differenzieren in 1%igem Eisessig 2 Sekunden
- Spülen mit destilliertem Wasser
- Spülen mit 100%igem Alkohol bis keine Einfärbung mehr erfolgt
- Entwässern und Eindecken

## Silberimprägung

Die AgNOR-Reaktion wurde zuerst durch Goodpasture et Bloom (1975) beschrieben. Howell et Black (1980) wandelten diese Methode von einer 3-Schritt-Technik in eine 1-Schritt-Technik um, die durch Ploton et al. (1986) präzisiert wurde.

Folgende Methode nach Ploton et al. (1986) wurde genutzt:

- Färben der entparaffinierten Schnitte mit Silbernitratlösung 30 Minuten

Raumtemperatur: 20°C, feuchte Dunkelkammer

- Spülen mit deionisiertem Wasser
- Entwässern und Eindecken

Silbernitratlösung: vor der Färbung frisch angesetzt aus miteinander im gleichen Verhältnis (1:1) vermischten Stammlösungen:

- 0,02 g Gelatine in 1%iger Ameisensäure (1 ml)
- 0,5 g Silbernitrat in deionisiertem Wasser (1 ml)

Verwendet wurde für alle Lösungen nur deionisiertes Wasser.

Das Mitführen eines Vergleichspräparates ermöglichte eine Kontrolle der Silberreaktion. Alle Schnitte wurden gleichzeitig gefärbt.

## Immunhistologie

Zur Anwendung von CD3, CD79a, PCNA und Ki-67 war eine Vorbehandlung der Schnitte nach den von Cattoretti et al. (1993) und Singh (1994) beschriebenen Methoden notwendig. Voraussetzung ist die Verwendung spezieller Objektträger. Diese können kommerziell erworben werden (Super Frost / Plus), wobei es sich um RNase-freie, mit einer permanent positiven Ladung versehene Objektträger handelt. Eine andere Möglichkeit ist die nachträgliche Beschichtung aufgezogener Schnitte mit APES (3-Aminopropyltriethoxysilan) oder mit Chrom-Alum-Gelatine. Für die Anwendung von CD3, CD79a und PCNA verwendeten wir Objektträger von „Super Frost“. Zur Applikation von Ki-67 wurden die Schnitte zuvor mit APES behandelt:

- Entparaffinieren der Schnitte und Überführung in Azeton
- Inkubieren in Lösung aus 1 ml APES und 50 ml Azeton 20 Sekunden
- jeweils doppeltes Waschen in Azeton und destilliertem Wasser

Die weitere Vorgehensweise ist für jeden Marker gesondert angegeben:

### CD3

Verwendet wurde ein Rabbit Anti-Human T-Zell Marker, der polyklonale Antikörper Anti-CD3 (Dako, High Wycombe, UK) zur Markierung aller T-Zellen. Die Lokalisierung der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem „Vector ABC Elite Kit“ (Vectastain PK6102, Vector Laboratories, Peterborough, UK)

- Überführen der Schnitte in 10 mM HCl/Zitrat Puffer (pH 6)
- Erhitzen der Schnitte in der Pufferlösung in einer Mikrowelle mit 600 W 10 min
- Abkühlen bei Raumtemperatur 20 min
- Überführen in 100%igen Alkohol
- Blockieren der endogenen Peroxidase mit 1%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol 30 min
- Überführen in destilliertes Wasser
- Spülen mit PBS/Tween 3 x 5 min
- Präinkubieren in NGS (1:10) 15 min
- Inkubieren in Rabbit Anti-CD3 (1:600 in 10%igem NGS) 60 min
- Spülen mit PBS/Tween 5 min
- Inkubieren in Goat anti Rabbit/Biotin 1:250 (Verdünnung mit 1%igem NGS in PBS) 30 min
- Spülen mit PBS/Tween 3 x 5 min
- Inkubieren in ABC-Komplex (Stammlösungen A und B 45 min vor Gebrauch komplexieren) 30 min
- Spülen mit PBS 3 x 5 min
- Entwickeln mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Vector, SK4100) 10 min

- Spülen mit destilliertem Wasser 5 min
- Gegenfärbung mit Mayer´s Hämatoxylin 1 min
- Spülen mit Wasser 10min
- Entwässern und Eindecken

#### CD79a

Verwendet wurde ein Mouse Anti-Human B-Zell Marker, der monoklonale Antikörper Anti-CD79a (Dako, High Wycombe, UK) zur Markierung aller B-Zellen. Die Lokalisierung der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem „Vector ABC Elite Kit“ (Vectastain PK6102, Vector Laboratories, Peterborough, UK)

Die Arbeitsschritte sind die gleichen wie für CD3.

#### Ki-67 (MIB-1)

Verwendet wurde ein Mouse Anti-Ki-67 Marker, der monoklonale Antikörper MIB-1 (Immunotech S.A., Marseille, Frankreich) zur Markierung aller proliferierenden Zellen. Die Lokalisierung der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem Vector ABC-Komplex (Vector PK4000, Vector Laboratories, Peterborough, UK)

- Überführen der Schnitte in 10 mM HCl/Zitrat Puffer (pH 6)
- Kochen der Schnitte in der Pufferlösung 25 min
- langsames Abkühlen in Pufferlösung bis auf Raumtemperatur über Nacht
- Überführen in 100%igen Alkohol
- Blockieren der endogenen Peroxidase mit 1%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol 30 min
- Überführen in destilliertes Wasser
- Spülen mit PBS 3 x 5 min
- Präinkubieren in NHS (1:10) 15 min
- Inkubieren in Mouse Anti-MIB-1 (1:200 in 10%igem NHS) 60 min
- Spülen mit PBS/Tween 3 x 5 min
- Inkubieren in Horse anti Mouse/Biotin 1:125 (Verdünnung mit 1%igem NHS in PBS) 30 min
- Spülen mit PBS/Tween 3 x 5 min
- Inkubieren in ABC-Komplex (Stammlösungen A und B 45 min vor Gebrauch komplexieren) 30 min
- Spülen mit PBS 3 x 5 min
- Entwickeln mit DAB 10 min
- Spülen mit destilliertem Wasser 5 min
- Gegenfärbung mit Mayer´s Hämatoxylin 15 sek
- Spülen mit fließend Wasser 10 min
- Entwässern und Eindecken

#### PCNA (PC 10)

Verwendet wurde ein Mouse Anti-PCNA Marker, der monoklonale Antikörper PC-10 (Dako, High Wycombe, UK) zur Markierung aller Zellen in der S-Phase. Die Lokalisierung der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem „Vector ABC Elite Kit“ (Vectastain PK6102, Vector Laboratories, Peterborough, UK)

- Überführen in 100%igen Alkohol
- Blockieren der endogenen Peroxidase mit 0,6%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol 15 min
- Überführen in destilliertes Wasser
- Spülen mit PBS 3 x 5 min
- Präinkubieren in NHS (1:10) 20 min
- Inkubieren in Mouse Anti-PC 10 (1:50 in 10%igem NHS) 30 min
- Spülen mit PBS 3 x 5 min
- Inkubieren in Horse anti Mouse/Biotin 1:125 (Verdünnung mit 1%igem NHS in PBS) 30 min



- Spülen mit PBS/Tween	3 x 5 min
- Inkubieren in ABC-Komplex (Stammlösungen A und B 45 min vor Gebrauch komplexieren)	30 min
- Spülen mit PBS	3 x 5 min
- Entwickeln mit DAB	10 min
- Spülen mit destilliertem Wasser	5 min
- Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin	15 sek
- Spülen mit fließend Wasser	10 min
- Entwässern und Eindecken	

#### Verwendete Lösungen

NGS	normales Ziegenserum	
NHS	normales Pferdeserum	
PBS-Stammlösung	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	38,325 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,80 g
	destilliertes Wasser	2,5 l
	pH 7,4	
PBS-Gebrauchslösung	Stammlösung	100 ml
	destilliertes Wasser	900 ml
	NaCl	8,5 g
	pH kontrollieren	7,4
PBS/Tween-Stammlösung	NaCl	218,725 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	38,325g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,80 g
	destilliertes Wasser	2,5 l
	Tween-20	12,5 ml
PBS/Tween-Gebrauchslösung	Stammlösung	100 ml
	destilliertes Wasser	900 ml
DAB-Stammlösung	Diaminobenzidin	250 mg
	destilliertes Wasser	50 ml
DAB-Gebrauchslösung	Stammlösung	5 ml
	Tris/HCl ( pH 7,6)	45 ml
	0,3%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (43 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 4,96 ml destilliertem Wasser)	0,5 ml
1%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (35%)	1,5 ml
	Methanol (100%)	48,5 ml
Tris/HCl-Stammlösung	Tris	60,5 g
	destilliertes Wasser	500 ml
	mit konzent. HCl pH auf 7,6 einstellen	1000 ml
	Auffüllen auf	
Tris/HCl-Gebrauchslösung	Stammlösung	100 ml
	destilliertes Wasser	900 ml
	NaCl	8,5 g
	pH kontrollieren	7,6
ABC-Komplex	Lösung A	20 µl
	Lösung B	auflösen in PBS
		480 µl
		20 µl
		auflösen in PBS
		480 µl

Mayer's Hämatoxylin	Hämatoxylin	1 g
	destilliertes Wasser	1000 ml
unter Rühren und Erwärmen zugeben von:	NaJ	0,2 g
	$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	50 g
dann Abkühlen und Filtrieren	Chloralhydrat	50 g
	Zitronensäure	1 g

Das Mitführen von positiven und negativen Kontrollen war für alle immunhistochemischen Verfahren unerlässlich. Verwendet wurden Schnitte von humanem und caninem lymphatischem Gewebe.

#### 4.2.2. Erfassung der Parameter

##### Histomorphologie

Alle Schnitte wurden in einem Blindversuch sowohl an Hand der HE-Färbung, als auch der Giemsa-Färbung histomorphologisch beurteilt und einem Subtyp der Kiel-Klassifikation und der Working Formulation zugeordnet (siehe Anhang Abb. 2 bis 8 sowie Tab. 2 bis 4).

Die Ergebnisse wurden verglichen und bei Unterschieden in der Klassifikation erfolgte eine erneute histomorphologische Beurteilung, wobei diesmal beide Färbungen begutachtet wurden. Ein halbes Jahr später wurde dieser Vorgang wiederholt und der endgültige Subtyp aus den vorliegenden Resultaten ermittelt.

##### CD3 und CD79a

In Auswertung der immunhistologischen Marker CD3 und CD79a wurde in einem ähnlich angeordneten Blindversuch der Immunophänotyp der Lymphome festgestellt (siehe Anhang Abb. 9 bis 12).

Es traten weder Unterschiede innerhalb unserer Bewertung, noch im Vergleich zu den Werten aus Utrecht auf, die sich auf eine Untersuchung von Frischmaterial mit monoklonalen caninen Antikörpern stützten (Teske 1993). Für ein Lymphom konnte der Immunophänotyp nicht ermittelt werden.

Die Verknüpfung des Immunophänotyps und der histomorphologischen Beurteilung ermöglichte die Einteilung der Lymphome in die aktualisierte Kiel-Klassifikation.

##### Mitoserate

Die Mitoserate wurde an HE gefärbten Schnitten durch Erfassung der mitotischen Figuren festgestellt. Es wurden 10 Gesichtsfelder bei einer Vergrößerung von 400:1 ausgezählt. Die Mitoserate ergab sich aus dem Mittelwert der Anzahl dieser 10 Felder. Berücksichtigt wurden nur eindeutige mitotische Figuren, wie "Monaster" oder "Diaster", um eine Verfälschung der Resultate durch Einbeziehung entarteter neoplastischer Zellkerne oder pyknotischer Zellen zu verhindern. In heterogenen Tumoren wurden Areale mit der geringsten Zelldifferenzierung zur Zählung herangezogen. Nekrotische Gebiete wurden nicht bewertet.

##### PCNA

Der S-Phasen-Index ergab sich aus dem Anteil PCNA-positiver Zellen auf 100 Tumorzellen. Ausgezählt wurden 500 Zellen unter Benutzung eines Gitters. Mit diesem Gitter wurde zuerst im HE-Schnitt die Anzahl von Zellen pro Sektor bestimmt, um dann im immunhistologischen Präparat die PCNA-positiven Zellen pro Sektor zählen zu können. Dieser Schritt ist notwendig, da nicht markierte Zellen oft schwer voneinander abzugrenzen sind. Gezählt wurden nur Zellen mit stark dunkelbrauner, granulierter Markierung (siehe Anhang Abb. 13 bis 14). Vergleichszählungen von 100, 200, 300 und 500 Zellen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Bewertung. Für heterogene Tumoren und nekrotische Bezirke gilt das zuvor gesagte.

##### Ki-67

Die Wachstumsfraktion ergab sich aus dem Anteil Ki-67-positiver Zellen auf 100 Tumorzellen. Ausgezählt wurden 500 Zellen, wobei die Benutzung eines Gitters nur in Ausnahmefällen erforderlich war. Gezählt wurden nur Zellen mit tiefdunkler Markierung (siehe Anhang Abb. 15 bis 16). Vergleichszählungen von 100, 200, 300 und 500 Zellen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Bewertung. Für heterogenen Tumoren und nekrotische Bezirke gilt das zuvor gesagte.

##### AgNORs

In der vorliegenden Arbeit wurde eine qualitative Bewertung von AgNORs durchgeführt. Gestützt auf Untersuchungen von Field et al. (1984), Crocker et al. (1989) und Rüschoff et al. (1994) wurden fünf Typen auf Grund der Verteilungsmuster definiert (siehe Anhang Abb. 17 bis 21) und der untersuchte Tumor einem dieser Typen in Abhängigkeit von der Mehrzahl der auftretenden Zellen zugeordnet.

Weiterhin erfolgte eine Auszählung von 100 Zellkernen unter Ölimmersion (siehe Anhang Abb. 22 bis 23), wobei der Schnitt durchfokussiert und die einzelnen AgNORs gezählt wurden (Crocker et al. 1989).

Zusätzlich wurde die von Hufnagel et Guski (1994) vorgeschlagene Mikroskopbildanalyse zur quantitativen Bewertung der AgNOR-Parameter verwendet. Einen Überblick über den Aufbau der Anlage und die erfaßten Werte geben die Kapitel 4.2.3. und 4.2.4. (siehe Anhang Abb. 24 bis 27).

Lymphozyten konnten nicht als interne Kontrolle verwendet werden, da ihre sichere Erkennung in AgNOR-Präparaten von caninen malignen Lymphomen zweifelhaft ist. Diesem Umstand wurde durch gleichzeitiges Färben aller Schnitte und Mitführung eines zuvor bewerteten Kontrollschnittes als Vergleichswert Rechnung getragen.

### 4.2.3. Automatische Mikroskopbildanalyse

#### Bildverarbeitungssystem

Das verwendete Bildverarbeitungssystem BVS A6471 (Robotron Berlin) basiert auf einem PDP-11 (DEC)-kompatiblen Rechner, der durch zusätzliche elektronische Baugruppen erweitert wurde. Der Speicherbereich der Grafik hat eine Kapazität von 768 x 512 Bildpunkten x 8 Bit Intensität. Ein JENAVAL-Mikroskop mit aufgesetztem Verstärker und Videokamera dient der Bilderzeugung (siehe Anhang Abb. 24). Zur Bildverarbeitung wurde das interaktive automatische Bildverarbeitungssystem AMBA (Roth et Wenzelides 1989) verwendet. Nach Abtastung des Mikroskopbildes durch den Image Dissector wird dem Rechner ein Bild von 4096 x 4096 Punkten zugeführt. Diese Punkte haben eine genau festgelegte Größe, welche von der gewählten Mikroskopbildvergrößerung, in vorliegender Arbeit 4000:1, abhängt.

Die Lichtintensitäten der einzelnen Bildpunkte werden mit einer Genauigkeit von 1024 Grauwertstufen dem Rechner zugeführt. Das eingelesene Bild wird dann in ein 384 x 384 - Punkte - Bild mit 16 Grauwertstufen transformiert. Um Objekte bei der Vermessung trennen zu können, ist eine Objektsegmentierung notwendig (siehe Anhang Abb. 26). Voraussetzung hierfür ist die Transformation des Grauwertbildes in ein Binärbild. Der gute Kontrast zwischen AgNORs und Zellkernen gestattet die exakte Festlegung eines Schwellenwertes für die Binarisierung (siehe Anhang Abb. 25). Von den zur Verfügung stehenden 8 Bits werden nur 6 für die Grauwertstufen benutzt. Die oberen 2 Bits werden mit 0 belegt. Dies erlaubt es, Strukturen im Grauwertbild farbig zu markieren. Somit werden die Flächen eines Zellkerns und der dazugehörigen NORs, sowie deren Anzahl und Lage als Primärdaten erfaßt. Miteinander verclusterte AgNORs können vom System auf Grund ihrer unregelmäßigen Konturen als Konglomerate erkannt und als getrennte Objekte vermessen werden. Nur als Einzelstrukturen erkannte AgNORs werden durch Umrandung gesondert gekennzeichnet (siehe Anhang Abb. 27). Vermessen wurden 100 Zellkerne pro Präparat. Die erfaßten Parameter sind im nächsten Kapitel näher erläutert.

#### AgNOR-Parameter

Alle durch die Mikroskopbildanalyse erfaßten Parameter, die zur prognostischen Beurteilung herangezogen wurden, sind nachfolgend in Gruppen zusammengefaßt:

#### Fläche

<u>Merkmal</u>	<u>Erklärung</u>	<u>Einheit</u>
S_AREA	Summe der Anschnittfläche aller AgNORs pro Zellkern	µm <sup>2</sup>
MEANAR	Anschnittfläche der einzelnen AgNORs pro Zellkern	µm <sup>2</sup>
MAXNOR	Anschnittfläche des größten AgNORs im Zellkern	µm <sup>2</sup>
AR_RAT	Verhältnis der AgNOR-Summenfläche (S_AREA) zur Zellkernfläche	
SIZRAT	Verhältnis der AgNOR-Fläche (MEANAR) zur Zellkernfläche	

#### Anzahl

<u>Merkmal</u>	<u>Erklärung</u>	<u>Einheit</u>
NORNBC	Anzahl der AgNORs pro Zellkern	µm <sup>2</sup>

#### Lokalisation

Lagebestimmungen von AgNORs sind schwierig, und die durch Lesty et al. (1990) vorgeschlagene Messung des kürzesten und längsten Abstandes des Mittelpunkts der NORs zur Kernmembran führt zu einer komplizierten Fallunterscheidung.

Hufnagel et al. (1991) schlagen ein Modell vor, in dem sie zunächst den Schwerpunkt S des Zellkerns, der sich als Kontur im Grauwertbild darstellt, bestimmen: Die Koordinaten x und y ergeben sich aus

$$x = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{und} \quad y = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i, \quad \text{wobei} \quad \{(x_i, y_i) | i = 1, \dots, n\}$$

die geordnete Menge der Konturpunkte ist. Der Schwerpunkt der AgNORs **T** wird in ähnlicher Weise unter Benutzung der Konturpunkte der NORs berechnet. Ein durch **S** und **T** verlaufender Strahl schneidet die Kernmembran in **U**. Der Radius des NORs wird mit **r** bezeichnet (siehe Abb. V).

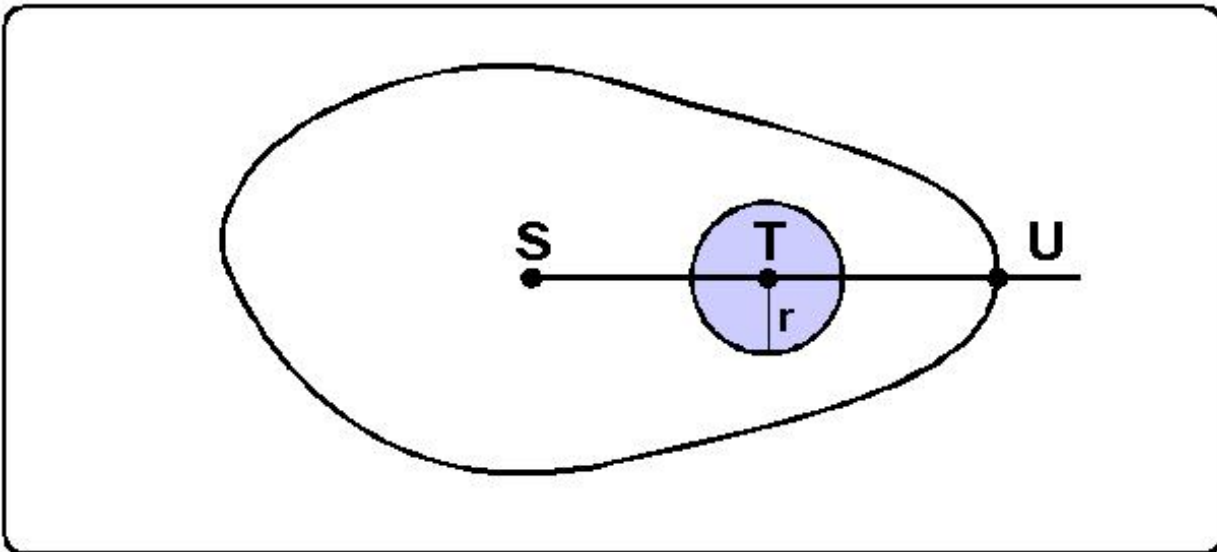


Abb. V: Modell zur Schwerpunktberechnung (nach Hufnagel et al. 1991)

Die Lage von  $T$  auf der Strecke  $\overline{SU}$  ist variabel, wobei  $K$  den peripheren Punkt markiert und die Strecke  $\overline{KU}$  dem Radius  $r$  des NORs entspricht.

Die Position des AgNORs kann damit durch das Verhältnis  $\overline{ST} / \overline{SK}$  als Zahl zwischen 0 und 1 angegeben werden (Abb. VI).

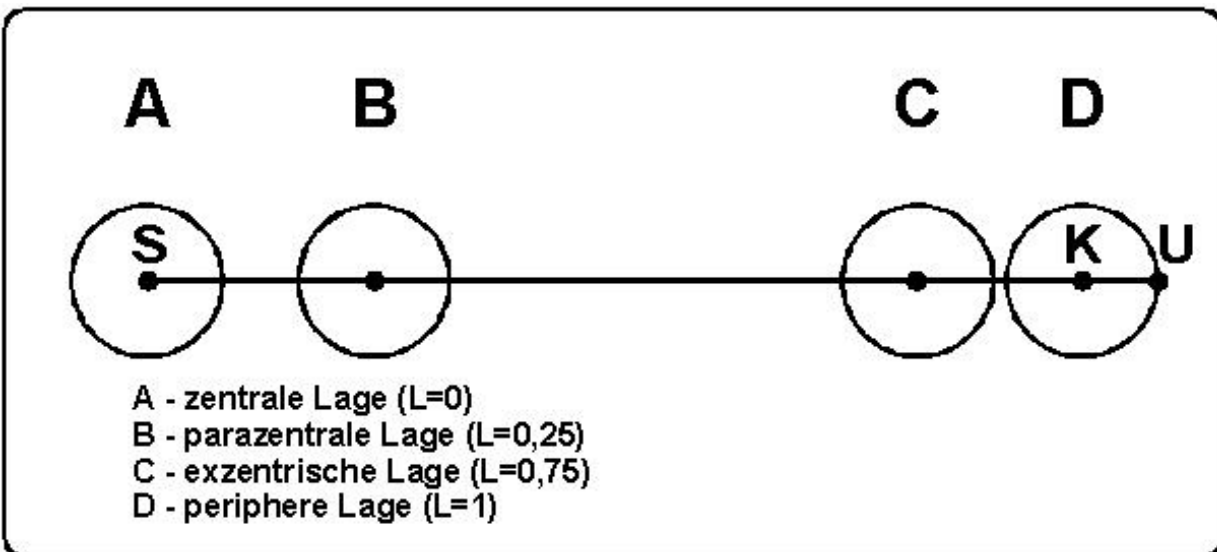


Abb. VI: Lagemöglichkeiten der AgNORs (nach Hufnagel et al. 1991)

Auch der Abstand zwischen mehreren AgNORs kann durch ein solches Verhältnis angegeben werden, wobei der Abstand zwischen zwei Schwerpunkten vermindert um die Radien der verbundenen AgNORs als Gesamtdistanz betrachtet wird.

Paßt man die jeweilige Form des Zellkerns einer Ellipse an, so kann diese in Sektoren aufgeteilt werden und der Anteil darin vorkommender AgNORs verglichen werden (Abb. VII).

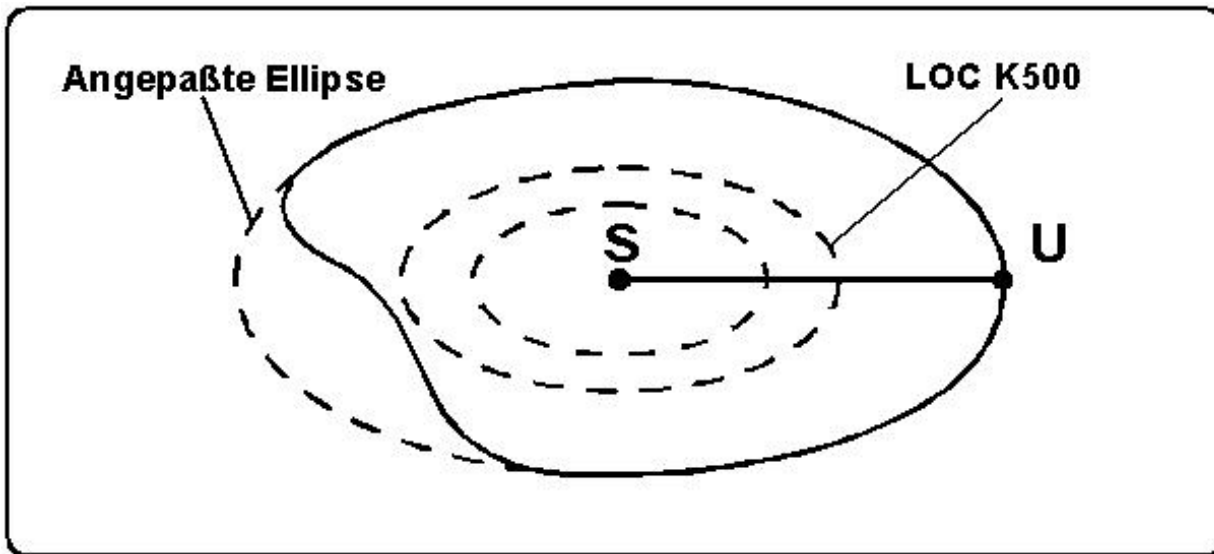


Abb. VII: Ellipsenanpassung und Sektorenaufteilung des Zellkerns (nach Hufnagel et al. 1991)

Die so ermittelten Parameter sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben:

<u>Merkmal</u>	<u>Erklärung</u>
CENTER	Anzahl der zentral im Zellkern gelegenen AgNORs
BORDER	Anzahl der randständigen AgNORs im Zellkern
LOCAT	Position der AgNORs zwischen Schwerpunkt und Kernmembran
LOC K0 ...LOC K1000	Anzahl der AgNORs in einem der Ellipsensektoren
MAXDIST	maximales Distanzmaß zweier AgNORs im Zellkern
MDIST	Abstand der AgNORs zueinander

### Reproduzierbarkeitsmessung

Eine entscheidende Frage zur Verlässlichkeit der Mikroskopbildanalyse ergibt sich aus der Reproduzierbarkeit der Methode.

Um herauszufinden, welche Merkmale mit hinreichender Genauigkeit gemessen wurden, führten wir eine Reproduzierbarkeitsmessung durch. Sechs willkürlich ausgewählte Präparate verschiedener Malignität wurden zu einem späteren Zeitpunkt erneut dreimal vermessen. Aus den Meßergebnissen eines Präparates wurden der Mittelwert und die Standardabweichung **SD** bestimmt. Als Maß der Reproduzierbarkeit **RS** eines

Falles ( $x_i$ ) wurde seine relative Streuung ermittelt:  $RS(x_i) = \frac{SD}{x} \times 1000$

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit **RM** der Gesamtheit unserer Messungen verwendeten wir folgende Formel:  $RM(x) = \frac{1}{6} \sum_{i=1}^n RS(x_i)$

Dieser Wert beschreibt die relative Differenz zwischen 2 Messungen eines Falles ( $x$ ), wenn sie unter gleichen Bedingungen und an den gleichen Objekten durchgeführt wurden (Hufnagel et al. 1994). Die Tabelle 11 (siehe Anhang) gibt einen Überblick der AgNOR-Parameter und ihrer Reproduzierbarkeit **RM**. Keiner der gemessenen Parameter streut mehr als 100 Promille. Dieses Ergebnis wurde als ausreichend für unsere Untersuchungen erachtet.

### 4.2.4. Statistische Auswertung

Bestimmung der Überlebenszeit und der Responskriterien

Die Überlebenszeit **T** ist eine nichtnegative Zufallsgröße ( $t \geq 0$ ). Sie kann durch die folgenden Kenngrößen beschrieben werden:

1. Die Überlebensfunktion **F(t)** ( $t \geq 0$ ) von **T** gibt die Wahrscheinlichkeit an, daß ein Hund zum Zeitpunkt **t** noch lebt: **F(t) = P(T ≥ t) mit (t ≥ 0)**.

Sie ist eine monoton fallende Funktion.

2. Die Ausfallrate, auch Hazardrate, **h(t)** ( $t \geq 0$ ) von **T** (Danilyan et al. 1986) charakterisiert die Wahrscheinlichkeit des Ausfalls eines erkrankten Tieres zur Zeit **t** unter der Bedingung, daß es zu diesem Zeitpunkt noch lebt: **h(t) = P(T=t) (T ≥ t) mit (t ≥ 0)**.

3. Die Wahrscheinlichkeitsfunktion  $f(t)$  ( $t \geq 0$ ) von  $T$  ist die Wahrscheinlichkeit, daß der Hund zum Zeitpunkt  $t$  ausfällt:  $f(t) = P(T=t)$  mit ( $t \geq 0$ ).

Ist eine Kenngröße bekannt, können die anderen ermittelt werden.

Die Überlebenszeiten wurden sowohl für unbehandelte als auch für behandelte Hunde erfaßt. Während für die erstere Gruppe der Zeitpunkt der Tumordiagnostik von entscheidender Bedeutung wäre, spielt er für behandelte Tiere keine Rolle, da zum Zeitpunkt der Lymphknotenextirpation mit einer Therapie begonnen wurde. Somit kann man den Behandlungsbeginn für alle behandelten Hunde in den Zeitpunkt  $t = 0$  legen. Bestimmt wurde außerdem die Reaktion des Tumors auf die Behandlung:

- vollständige Remission (CR) - Verschwinden des meßbaren Tumors,
- teilweise Remission (PR) - Abnahme des Tumolvolumens um mindestens 50%.

In beiden Fällen durften keine Metastasen oder eine Verschlechterung des Krankheitszustandes auftreten.

- keine Veränderung - Größenabnahme des Tumors um weniger als 50% und Größenzunahme von nicht mehr als 25%.
- progressive Erkrankung - weitere Größenzunahme, Metastasierung oder Verschlechterung des Krankheitszustandes.

Für Hunde mit einer vollständigen Tumorrückbildung wurde die krankheitsfreie Überlebenszeit als der Zeitraum von der Remission bis zum Rezidiv des Tumors ermittelt. War es durch den Unfalltod des Patienten oder durch andere, nicht tumorbedingte Krankheiten, Ortswechsel oder Intervention des Besitzers nicht möglich, die Studie zu beenden, so mußte die Überlebenszeit zensiert werden.

Auch die Fehlerquote für unbehandelte Hunde hält sich trotz des unsicheren Diagnosezeitpunktes in Grenzen, da, wie andere Arbeiten zeigen konnten, die Überlebenszeit insgesamt und im Vergleich zu behandelten Hunden nur sehr kurz ist, CML sich sehr aggressiv verhalten und die schnellen Vergrößerungen der peripheren Lymphknoten zur Diagnose innerhalb weniger Tage führen.

Nach durchgeführter Parameteranalyse und Zensierung von 35 unbehandelten und 87 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab sich eine Anzahl von 30 unbehandelten Hunden, welche zur prognostischen Beurteilung herangezogen werden konnten. Die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunde wurde mittels univariater Analyse beurteilt. Von allen behandelten Hunden wurde die Überlebenszeit von 74 Hunden und die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 Hunden mittels univariater Analyse beurteilt. Die multivariate Analyse wurde für die prognostische Beurteilung der Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden mit malignem Lymphom durchgeführt und für die prognostische Beurteilung der krankheitsfreien Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom. Die kleinere Anzahl ergab sich vor allem aus der Tatsache, daß das klinische Stadium nur für 54 Hunde erfaßt worden war.

Die Anzahl unbehandelter Hunde und die daraus resultierende Anzahl von Fällen in verschiedenen Parameterklassen, sowie Zensierung und insgesamt kurze Überlebenszeiten erlaubten keine sinnvolle multivariate Überlebensanalyse für unbehandelte Hunde.

#### Schätzung von Ausfallrate und Überlebensfunktion

Mit Hilfe der festgestellten Parameter kann die unbekannte Überlebensfunktion  $F(t)$  ( $t \geq 0$ ) unter Berücksichtigung der Zensierung für die krankheitsfreie Überlebenszeit und die gesamte Überlebenszeit geschätzt werden.

Als Schätzung  $\hat{F}(t)$  für  $F(t)$  wurde die Maximum-Likelihood-Methode verwendet. Dabei entsteht eine monoton fallende Treppenfunktion. Sie ist als Kaplan-Meier-Schätzung (Kaplan et Meier 1958) bekannt und stellt eine empirische Überlebensfunktion mit geschätzten Ausfallraten dar.

#### Weitere graphische Darstellungen

Durch das Statistikprogramm NCSS (Copyright Dr. J. Hintze, 329 North 1000 East Kaysville, Utah 84037) wurden alle erfaßten Parameter statistisch ausgewertet.

Die Überlebenszeiten für verschiedene Untersuchungsgruppen, die sich auf Grund der ermittelten Parameter ergeben, wurden graphisch in Form von Box Plots dargestellt. Meßwerte, die außerhalb des 10% bis 90%-Fraktilbereiches liegen, sind mit einem Kreis als Ausreißer gekennzeichnet. Die 10%- bzw. die 90%-Fraktilwerte sind durch die äußeren Balken markiert, die Boxenbegrenzungen zeigen die 25%- und die 75%-Fraktilwerte. Der Median (50% Fraktilwert) ist durch die Trennungslinie in der Box markiert. Die Berechnung der Einschnürungslinie erfolgte nach der Formel:

$$\text{Median} \pm 1,57 \times (75\% \text{ Fraktil} - 25\% \text{ Fraktil}) \times n^{0,5}.$$

Die graphische Darstellung erlaubt eine Gegenüberstellung der dargestellten Gruppen und einen Überblick über die Verteilung der Meßwerte innerhalb einer Gruppe. Überlappen sich die Box Plots verschiedener Gruppen nicht innerhalb ihrer 25%- bzw. 75%- Fraktilgrenzen, kann man auf einen signifikanten Unterschied schließen.

Für die Scatter Plots wurde zusätzlich ein Korrelationsfaktor berechnet. Es wurden sowohl der Pearson'sche Korrelationskoeffizient  $r$ , als auch Spearman's  $\rho$  festgestellt. Während ersterer für normalverteilte, lineare Regressionen verwendet wird, kann Spearman's  $\rho$  für nichtparametrische Tests eingesetzt werden. Wäre der Wert beider Koeffizienten annähernd gleich, so könnte man vom Vorliegen der Bedingungen für den für Pearson's  $r$  ausgehen. Da wir Überlebenszeiten untersucht haben, ist es günstiger mit dem Spearman'schen Korrelationskoeffizienten zu arbeiten.

#### Analyse der prognostisch bedeutenden Parameter

Zur Feststellung der prognostisch relevanten Parameter wurden eine univariate und eine multivariate Analyse durchgeführt. Da Überlebenszeiten selten normalverteilt sind, wurde ein nichtparametrischer Test verwendet (Krishnaiah et al. 1991). Benutzt wurde die "Cox proportional hazard logistic regression method" für die univariate Analyse. Diese ist Bestandteil des Statistikprogrammes EGRET (Teske 1993). Alle Parameter mit einer Wahrscheinlichkeit  $P < 0,05$  wurden als signifikant betrachtet. Die Hazard-Rate spiegelt die Ausfallrate wieder, welche sich mit steigendem

Parameter bei Werten größer 1 erhöht und bei Werten unter 1 sinkt. Bei größeren Schwankungen der Hazard-Rate ist ihr Konfidenzintervall mit angegeben.

Alle Parameter mit einer Wahrscheinlichkeit  $P < 0,3$  wurden in eine multivariate Analyse aufgenommen. Diese basiert auf der "Cox proportional hazard model regression method with a forward step selection". Für die ermittelten Werte gilt das zuvor gesagte.

Die univariate Analyse zur Ermittlung der prognostisch signifikanten Parameter für die Überlebenszeit wurde für 30 unbehandelte und 74 behandelte Hunde durchgeführt, wobei für 48 behandelte Hunde auch die krankheitsfreie Überlebenszeit untersucht wurde. Die multivariate Analyse erfaßte die prognostisch signifikanten Parameter für die Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden und für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden.

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

**5. Ergebnisse**

**5.1. Klinische Parameter**

**Alter**

Das Alter der untersuchten Hunde variierte zwischen 3 und 13 Jahren und betrug durchschnittlich 7,65 Jahre. Das jüngste männliche Tier war 5 Jahre und das älteste 12 Jahre alt, wobei das durchschnittliche Alter der männlichen Hunde 7,48 Jahre betrug. Weibliche Hunde hatten ein durchschnittliches Alter von 7,92 Jahren, ihr Alter variierte zwischen 3 und 13 Jahren. Das durchschnittliche Alter für behandelte Hunde betrug 7,6 Jahre und variierte zwischen 5 und 11 Jahren. Unbehandelte Hunde hatten ein Alter zwischen 3 und 13 Jahren mit einem durchschnittlichen Alter von 7,69 Jahren.

Für 30 unbehandelte Hunde wurde das Alter als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit mittels univariater Analyse untersucht. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $P$  betrug 0,223, und es wurde keine Signifikanz ermittelt (siehe Anhang Tabelle 32).

Für 74 der behandelten Hunde wurde das Alter als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit mittels univariater Analyse untersucht. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $P$  betrug 0,165, und es wurde keine Signifikanz ermittelt. Der  $P$ -Wert für die Analyse des Alters als prognostischer Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom betrug 0,079 (signifikanter Grenzwert  $P = 0,05$ ) und war somit nicht signifikant. Eine Hazard-Rate kleiner als 1 weist auf steigende Malignität caniner maligner Lymphome von Hunden, die im jüngeren Alter erkranken, hin. Die multivariate Analyse ergab keine Signifikanz für das Alter als prognostischer Faktor. Es wurde weder für behandelte noch für unbehandelte Hunde eine Altersprädisposition oder eine prognostische Signifikanz des Alters ermittelt (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Resultate der univariaten Analyse für das Alter als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)		Überlebenszeit (n = 74)	
	P-Wert	Hazard-Rate	P-Wert	Hazard-Rate
Alter	0,079	0,8872	0,165	0,9249

**Geschlecht**

Insgesamt wurden 65 männliche und 57 weibliche Tiere untersucht. Von den männlichen Hunden waren 19 unbehandelt und 46 wurden behandelt, und von den weiblichen Hunden waren 16 unbehandelt und 41 wurden behandelt.

Für 30 unbehandelte Hunde wurde das Geschlecht als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit mittels univariater Analyse untersucht. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $P$  betrug 0,107, und es wurde keine Signifikanz ermittelt (siehe Anhang Tabelle 32).

Das Geschlecht war für 74 behandelte Hunde kein signifikanter prognostischer Faktor für die Überlebenszeit ( $P = 0,116$ ). Für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden betrug der  $P$ -Wert für das Alter  $P = 0,436$  und war somit nicht signifikant. Die Hazard-Rate deutet ein erhöhtes Risiko für weibliche Hunde an. Dieser Wert ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P > 0,1$  jedoch nur bedingt interpretierbar (siehe Tabelle 13). Das Geschlecht hatte weder für behandelte noch für unbehandelte Hunde prognostische Signifikanz, und eine Geschlechtsprädisposition wurde nicht ermittelt.

Tabelle 13: Resultate der univariaten Analyse für das Geschlecht als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)		Überlebenszeit (n = 74)	
	P-Wert	Hazard-Rate	P-Wert	Hazard-Rate

Geschlecht				
weiblich				
männlich	0,436	0,7629	0,116	0,6409

### Masse

Die Masse der untersuchten Hunde variierte zwischen 10 kg und 75 kg. Die durchschnittliche Masse aller untersuchten Tiere betrug 31,12 kg. Männliche Tiere hatten eine Masse zwischen 10 kg und 75 kg und eine durchschnittliche Masse von 31,46 kg. Weibliche Hunde wogen zwischen 10 kg und 58 kg und hatten eine durchschnittliche Masse von 30,70 kg.

Zur Überprüfung der prognostischen Signifikanz der Masse wurden alle Hunde in Klassen eingeordnet. Die erste Klasse erfaßte alle Tiere zwischen 0 kg und 20 kg. Insgesamt 27 Hunde, davon 17 männliche Tiere, wurden in dieser Klasse erfaßt. Die zweite Klasse reichte von 21 kg bis 30 kg, und 26 Hunde hatten eine Masse entsprechend dieser Klasse, wovon 10 männlichen Geschlechts waren. Die nächsthöhere Klasse von 31 kg bis 40 kg enthielt 46 Hunde und davon 25 männliche. Die höchste Klasse erfaßte alle Hunde schwerer als 40 kg, und dies traf auf 23 Hunde, darunter 13 männliche, zu.

Für 30 unbehandelte Hunde wurde die Masse als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit mittels univariater Analyse untersucht. Die Irrtumswahrscheinlichkeit P betrug 0,501 und variierte für die verschiedenen Klassen zwischen 0,512 und 0,742. Es wurde keine Signifikanz ermittelt (siehe Anhang Tabelle 32).

Die univariate Analyse ergab einen P-Wert von  $P = 0,733$  für die Massenklassen als prognostischer Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit bezogen auf 48 behandelte Hunde und einen P-Wert von  $P = 0,549$  für die Überlebenszeit bezogen auf 74 behandelte Hunde, wobei die Irrtumswahrscheinlichkeit für die einzelnen Klassen zwischen 0,522 bzw. 0,212 und 0,938 bzw. 0,801 variierte (siehe Tabelle 14).

Für die Masse wurde weder eine prognostische Signifikanz noch eine Prädisposition für behandelte Hunde ermittelt.

Tabelle 14: Resultate der univariaten Analyse für die Masse als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)		Überlebenszeit (n = 74)	
	P-Wert	Hazard-Rate	P-Wert	Hazard-Rate
Masse	0,733		0,549	
0 - 20 kg				
21 - 30 kg	0,522	0,6856	0,212	0,5316
31 - 40 kg	0,791	1,155	0,801	0,9015
> 40 kg	0,911	0,9375	0,554	0,7593

### Klinisches Stadium

Das klinische Stadium basierend auf der WHO-Klassifikation (Owen 1980) wurde nur für behandelte Hunde bestimmt. Am häufigsten traten die Stadien IV und V auf. Tiere mit niedrig-malignem Lymphom wurden in einer Gruppe für Stadium II und III zusammengefaßt. In dieser Untersuchung trat kein Fall auf, der als Stadium I, d.h. Limitierung der Erkrankung auf einen einzelnen Lymphknoten oder auf lymphatisches Gewebe eines einzelnen Organs mit Ausnahme des Knochenmarks, klassifiziert werden konnte. Insgesamt wurden 18 Hunde dem Stadium II/III, 13 Hunde dem Stadium IV und 23 Hunde dem Stadium V zugeordnet.

Das klinische Stadium war weder für die Überlebenszeit von 54 behandelten Hunden ( $P > 0,07$ ) noch für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden ( $P > 0,5$ ) prognostisch signifikant (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Resultate der univariaten Analyse für das klinische Stadium als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)		Überlebenszeit (n = 54)	
	P-Wert	Hazard-Rate	P-Wert	Hazard-Rate



Stadium	0,435		0,076	
Stadium II + III				
Stadium IV	0,483	0,7235	0,417	0,6928
Stadium V	0,582	1,266	0,154	1,675

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 5.2. Histomorphologie

### Kiel-Klassifikation

Von 122 caninen malignen Lymphomen wurden 36 als niedrigmaligne Lymphome basierend auf der Kiel-Klassifikation beurteilt. Diese Gruppe beinhaltete 12 Lymphome des Subtypes lympho-plasmazytisches Immunozytom und 24 Lymphome des Subtypes zentroblastisch/zentrozytisches Lymphom (siehe Anhang Abb. 2 bis 4). Alle anderen 86 untersuchten caninen malignen Lymphome wurden als hochmaligne beurteilt (siehe Anhang Abb. 5 bis 8) und in folgende Subtypen untergliedert: 17 zentroblastisch/zentrozytoide Lymphome, 18 zentroblastisch/monomorphe Lymphome, 46 zentroblastisch/polymorphe Lymphome und 5 Immunoblastome. Damit macht die Gruppe der hochmalignen Lymphome und speziell des zentroblastisch/polymorphen Subtypes die Mehrheit aus.

Die Überlebenszeiten für unbehandelte Hunde mit niedrig- oder hochmalignem Lymphom korrelierend zur Kiel-Klassifikation sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) erfasst und im Diagramm 1 dargestellt. Die Boxplots für niedrig- und hochmaligne Lymphome zeigen eine vollständige Überlappung innerhalb der 5% und 95% Fraktilwerte für die Überlebenszeit. Somit ist die Kiel-Klassifikation nicht von prognostischer Bedeutung für die Überlebenszeit unbehandelter Hunde mit malignem Lymphom. Die univariate Analyse ergab eine Irrtumswahrscheinlichkeit P von 0,2667 zwischen hoch- und niedrigmalignen Lymphomen von 30 unbehandelten Hunden, und es wurde keine Signifikanz festgestellt (siehe Anhang Tabelle 32).

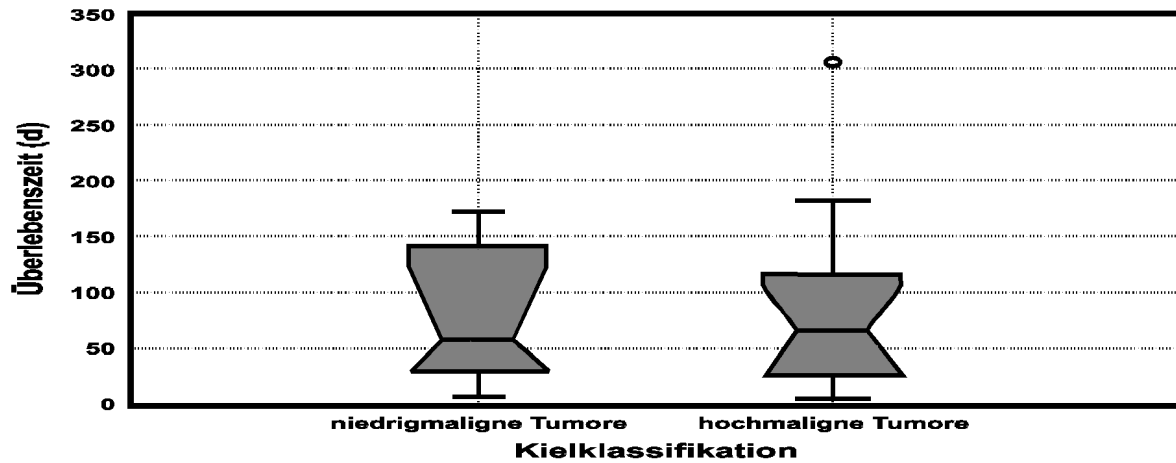


Diagramm 1: Box Plots der Überlebenszeit von unbehandelten Hunden in Relation zur Kielklassifikation

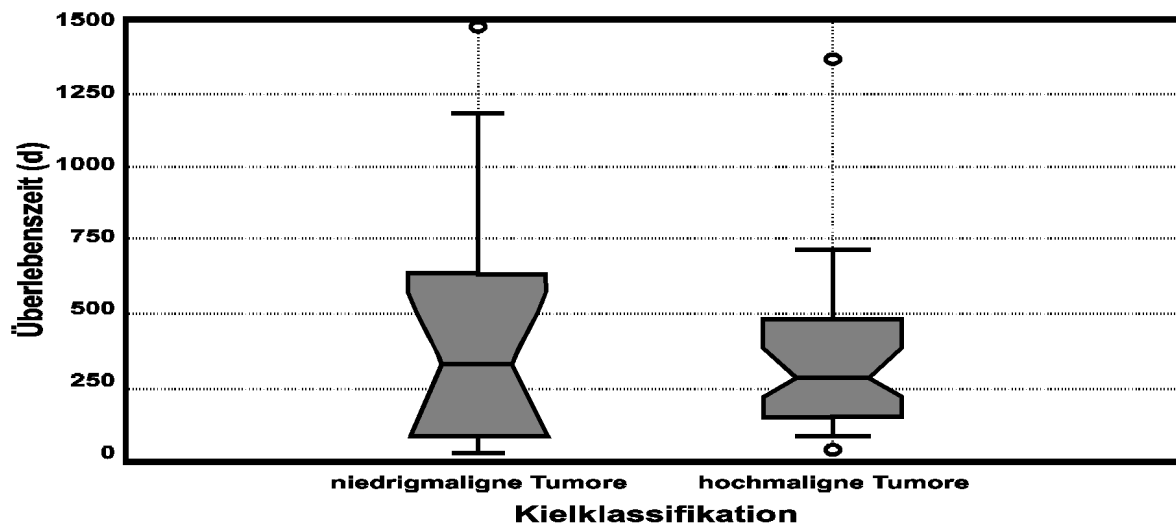
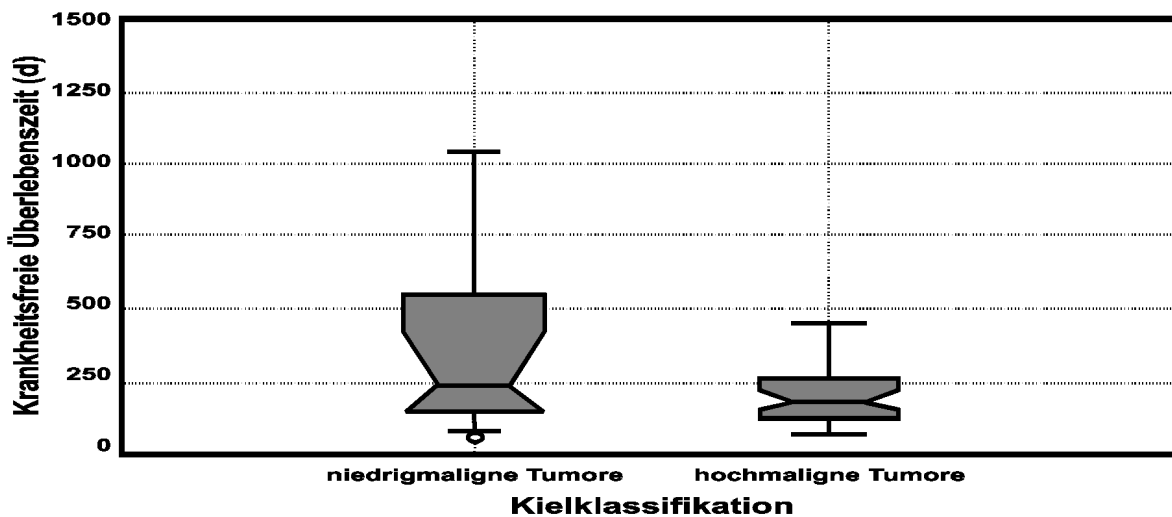


Diagramm 2: Box Plots der Überlebenszeit von behandelten Hunden in Relation zur Kielklassifikation



**Diagramm 3: Box Plots der krankheitsfreien Überlebenszeit von behandelten Hunden in Relation zur Kielklassifikation**

Für 74 behandelte Hunde mit malignem Lymphom wurden die Überlebenszeit und für 48 behandelte Hunde mit malignem Lymphom die krankheitsfreie Überlebenszeit sowohl bezogen auf den morphologischen Subtyp als auch auf den Malignitätsgrad basierend auf der Kiel-Klassifikation verglichen (siehe Anhang, Tabelle 36).

Die Boxplots in Diagramm 2 zeigen das Verhältnis der Überlebenszeiten von 74 behandelten Hunden mit hoch- und niedrigmalignen Lymphomen basierend auf der Kiel-Klassifikation. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen hoch- und niedrigmalignen Lymphomen als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit festgestellt werden. Die univariate Analyse ergab einen P-Wert  $P > 0,4$  sowohl für die Subtypen, als auch zwischen hoch- und niedrigmalignen Lymphomen von 74 Hunden (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Resultate der univariaten Analyse für die Kiel-Klassifikation als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)		Überlebenszeit (n = 74)	
	P-Wert	Hazard-Rate	P-Wert	Hazard-Rate
Kiel-Klassifikation	0,198		0,408	
niedrigmaligne				
hochmaligne	0,217	1,767	0,415	1,288

Die Boxplots in Diagramm 3 zeigen das Verhältnis der krankheitsfreien Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit hoch- und niedrigmalignem Lymphom basierend auf der Kiel-Klassifikation. Zwar liegen die krankheitsfreien Überlebenszeiten für Hunde mit hochmalignen Lymphomen innerhalb des 5 % und 95 % Fraktils insgesamt deutlich niedriger als für Hunde mit niedrigmalignen Lymphomen, doch es konnte keine prognostische Signifikanz ermittelt werden. Die univariate Analyse ergab P-Werte  $P > 0,1$  sowohl für die Subtypen, als auch zwischen hoch- und niedrigmalignen Lymphomen von 48 Hunden (siehe Tabelle 16).

#### Working Formulation

Von 122 untersuchten caninen malignen Lymphomen wurden 17 als niedriggradig maligne, 100 als mittelgradig maligne und 5 als hochgradig maligne Lymphome basierend auf der Working Formulation beurteilt. Die erste Gruppe beinhaltete ein Lymphom des Subtypes der kleinzelligen lymphozytischen Lymphome, 3 Lymphome des Subtypes der follikulären, hauptsächlich gekerbt-kleinzelligen Lymphome und 13 Lymphome des Subtypes der follikulären, gemischt klein- und großzelligen Lymphome. Als mittelgradig maligne Lymphome wurden 50 Lymphome vom Subtyp follikuläre, hauptsächlich großzelligen Lymphome, 13 Lymphome vom Subtyp diffuse, gekerbt-kleinzellige Lymphome, 6 Lymphome vom Subtyp diffuse, gemischt klein- und großzellige Lymphome und 31 Lymphome vom Subtyp diffuse großzellige (gekerbt und ungekerbt) Lymphome beurteilt. In der Gruppe der hochgradig malignen Lymphome wurden alle dem Subtyp immunoblastische Lymphome zugeordnet.

Die Überlebenszeiten für unbehandelte Hunde mit niedriggradig, mittelgradig und hochgradig malignem Lymphom basierend auf der Working Formulation sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) erfaßt. Nur 2 unbehandelte Hunde hatten hochgradig maligne Lymphome, was eine statistische Bewertung ausschloß. Diese Ergebnisse sind im Diagramm 4 dargestellt. Die Boxplots für niedriggradig und mittelgradig maligne Lymphome zeigen eine vollständige Überlappung innerhalb der 5% und 95% Fraktilswerte für die Überlebenszeit. Die Working Formulation ist nicht von prognostischer Bedeutung für die Überlebenszeit unbehandelter Hunde mit malignem Lymphom. Die univariate Analyse ergab P-Werte  $P > 0,1$  sowohl für die Subtypen, als auch zwischen niedrig- und mittelgradig malignen Lymphomen von 30 unbehandelten Hunden (siehe Anhang Tabelle 32). Der P-Wert von  $P = 0,098$  für die Überlebenszeit von hochgradig malignen Lymphomen ist statistisch irrelevant auf Grund der geringen Anzahl von Hunden mit diesem Subtyp.

Für 74 behandelte Hunde mit malignem Lymphom wurden die Überlebenszeit und für 48 behandelte Hunde mit malignem Lymphom die krankheitsfreie Überlebenszeit bezogen auf den Malignitätsgrad basierend auf der Working Formulation verglichen (siehe Anhang Tabelle 36). Nur Tumoren von 3 behandelten Hunden wurden als hochgradig maligne Lymphome beurteilt.

Die Boxplots in Diagramm 5 zeigen das Verhältnis der Überlebenszeiten zwischen 74 behandelten Hunden mit niedrig-, mittel- und hochgradig malignen Lymphomen basierend auf der Working Formulation. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen niedrig-, mittel- und hochgradig malignen Lymphomen als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit festgestellt werden. Die univariate Analyse ergab einen P-Wert  $P > 0,3$  sowohl für die Subtypen, als auch zwischen niedrig- und mittelgradig malignen Lymphomen von 74 Hunden (siehe Tabelle 17). Lymphome vom hochgradig malignen Typ konnten auf Grund der geringen Anzahl nicht bewertet werden.

Tabelle 17: Resultate der univariaten Analyse für die Working Formulation als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)		Überlebenszeit (n = 74)	
	P-Wert	Hazard-Rate	P-Wert	Hazard-Rate
Working Formulation	0,269		0,504	
geringgradig				
mittelgradig	0,311	1,990	0,320	1,518
hochgradig	0,077	9,466	0,362	2,130

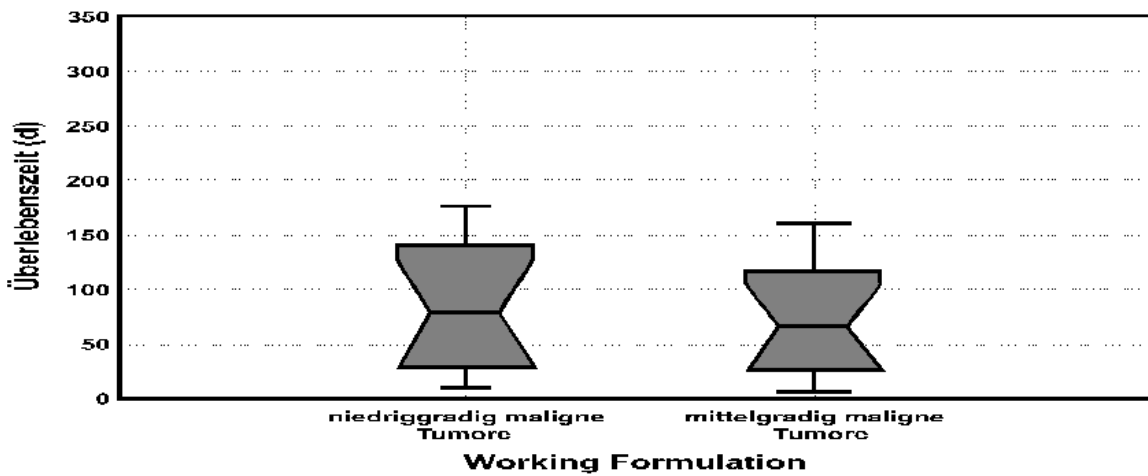


Diagramm 4: Box Plots der Überlebenszeit von unbehandelten Hunden in Relation zur Working Formulation

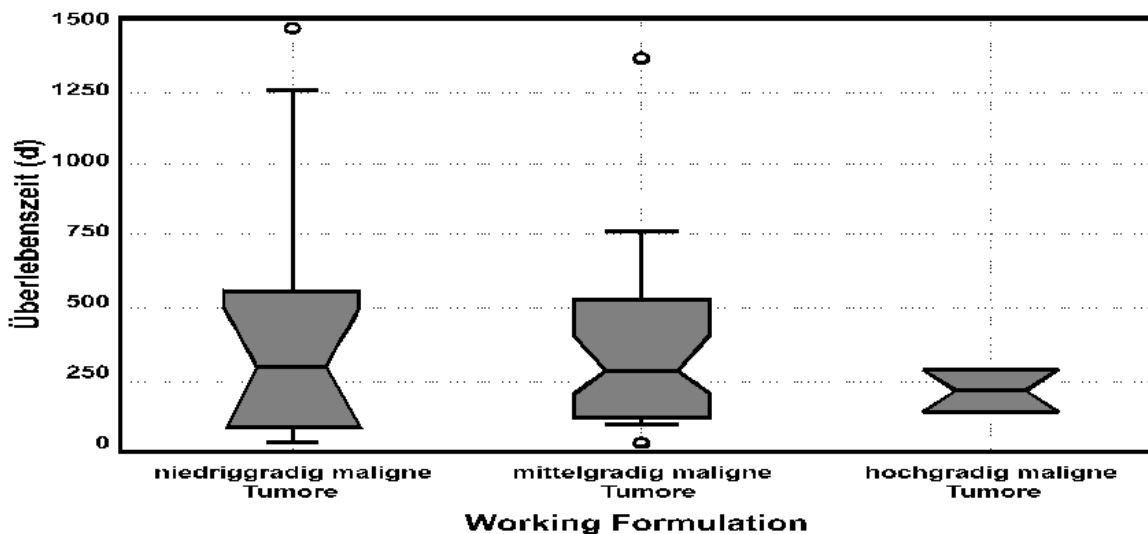


Diagramm 5: Box Plots der Überlebenszeit von behandelten Hunden in Relation zur Working Formulation

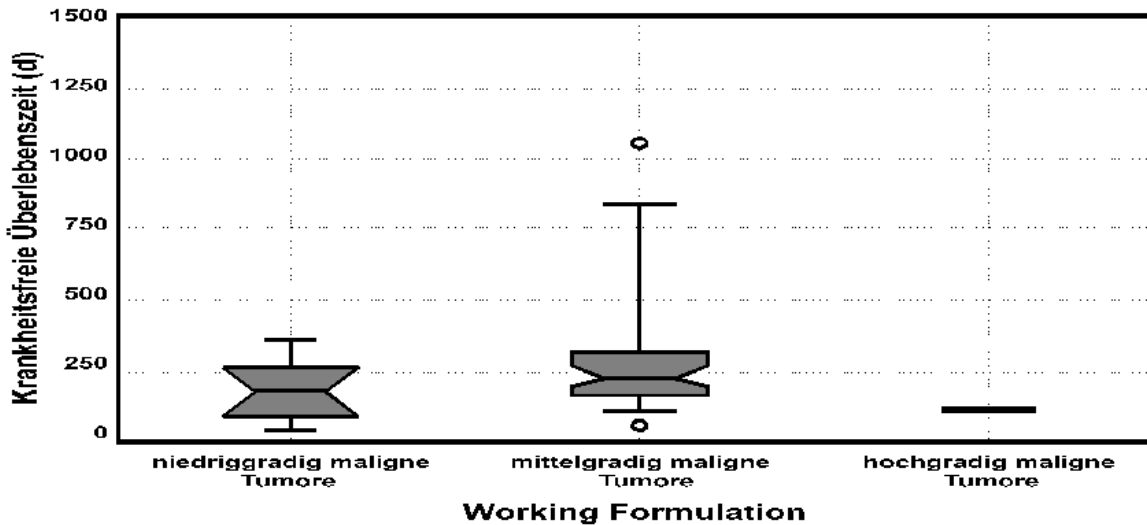


Diagramm 6: Box Plots der krankheitsfreien Überlebenszeit von behandelten Hunden in Relation zur Working Formulation

Die Boxplots in Diagramm 6 zeigen das Verhältnis der krankheitsfreien Überlebenszeit zwischen 48 behandelten Hunden mit niedrig-, mittel- und hochgradig malignem Lymphom basierend auf der Working Formulation. Zwar liegen die krankheitsfreien Überlebenszeiten für Hunde mit niedriggradig malignen Lymphomen innerhalb des 25 % und 75 % Fraktils insgesamt niedriger als für Hunde mit mittelgradig malignen Lymphomen, doch es konnte keine prognostische Signifikanz ermittelt werden.

Die univariate Analyse ergab P-Werte  $P > 0,2$  sowohl für die Subtypen, als auch zwischen niedrig- und mittelgradig malignen Lymphomen von 48 Hunden (siehe Tabelle 17). Der P-Wert von  $P = 0,077$  für die krankheitsfreie Überlebenszeit von hochgradig malignen Lymphomen ist statistisch irrelevant auf Grund der geringen Anzahl von Hunden mit diesem Subtyp.

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

### 5.3. Immunophänotyp

#### Zelltyp

Sowohl CD3 als auch CD79a erwiesen sich als hervorragende Marker für den Immunphänotyp von caninen malignen Lymphomen in formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitten nach Vorbehandlung in der Mikrowelle.

Von 122 untersuchten caninen malignen Lymphomen waren 94 Lymphome vom B-Zell-Typ und 27 vom T-Zell-Typ. Alle Lymphome wurden doppelt identifiziert. Die B-Zell-Lymphome reagierten positiv mit dem CD79a-Marker und negativ mit dem CD3-Marker. Alle als T-Zell-Lymphome klassifizierten Tumoren reagierten positiv mit CD3 (siehe Anhang Abb. 9 bis 10) und negativ mit CD79a (siehe Anhang Abb. 11 bis 12). Ein Lymphom konnte weder mit dem CD3- noch mit dem CD79a-Marker identifiziert werden. Diese Ergebnisse wurden zusammen mit den Resultaten der Kiel-Klassifikation verwendet, um die untersuchten Lymphome nach der „aktualisierten“ Kiel-Klassifikation zu bewerten. Von zuvor 36 niedrigmalignen Lymphomen wurden nur 17 als niedrigmaligne auf Grund der „aktualisierten“ Kiel-Klassifikation eingestuft.

Die Überlebenszeiten von unbehandelten Hunden in Korrelation zum Immunphänotyp sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) dargestellt. Die Anzahl von Hunden mit T-Zell-Lymphom war zu klein (2), um diesen Unterschied statistisch zu beurteilen. Die univariate Analyse für den Immunphänotyp von 30 unbehandelten Hunden ergab einen P-Wert von  $P = 0,175$ , und es wurde keine Signifikanz ermittelt. Wie zuvor erwähnt ist dieses Ergebnis auf Grund von nur zwei unbehandelten Hunden mit T-Zell-Lymphom irrelevant. (siehe Anhang Tabelle 32).

Die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit für behandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zum Immunphänotyp sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) dargestellt. Hunde mit T-Zell-Lymphom hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 433,9 Tagen und eine durchschnittliche krankheitsfreie Überlebenszeit von 269,4 Tagen. Diese Werte wurden stark durch die Überlebenszeit eines einzelnen Hundes von 1477 Tagen und durch eine krankheitsfreie Überlebenszeit von 1092 Tagen beeinflusst. In der univariaten Analyse war der Immunphänotyp weder für die krankheitsfreie Überlebenszeit ( $P > 0,9$ ) von 48 behandelten Hunden, noch für die Überlebenszeit ( $P > 0,2$ ) von 73 behandelten Hunden prognostisch signifikant (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Resultate der univariaten Analyse für den Immunphänotyp als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)	Überlebenszeit (n = 73)

	P-Wert	Hazard-Rate	P-Wert	Hazard-Rate
Immunophänotyp	0,932		0,229	
B-Zell-Typ				
T-Zell-Typ	0,932	1,032	0,239	0,6987

In der multivariaten Analyse erwies sich dagegen der Immunophänotyp als prognostisch signifikant für die Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden mit einem P-Wert von  $P = 0,027$ . Die Hazard-Rate betrug 2,997 für T-Zell-Lymphome und zeigte damit ein steigendes Überlebensrisiko für Hunde mit T-Zell-Lymphomen an (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Resultate der multivariaten Analyse für den Immunophänotyp als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Überlebenszeit (n = 53)		
	P-Wert	Hazard-Rate	95% C-Intervall
Immunophänotyp	0,027		
B-Zell-Typ			
T-Zell-Typ	0,027	2,997	1,134 - 7,919

Insgesamt kann man davon ausgehen, daß etwa 13 % aller Hunde mit malignem Lymphom immunophänotypisch dem T-Zell-Typ zuzurechnen sind und die Prognose für die Überlebenszeit behandelter Tiere mit T-Zell-Lymphom deutlich schlechter ausfällt als für Hunde mit B-Zell-Lymphomen.

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 5.4. Proliferationsmarker

### 5.4.1. PCNA

Der Antikörper PC10 (Dako) erwies sich als brauchbarer Marker für PCNA-positive Zellen in formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebsschnitten. Durch die Verwendung eines Zählgitters und die Beschränkung der Auszählung auf stark dunkelbraune, granulierte Zellen wurden der "Interobserver"- und der "Intraobserver"-Fehler auf weniger als 5 % reduziert (siehe Anhang Abb. 13 und 14).

Die PCNA-positiven Zellen hatten einen maximalen Anteil von 86 % in caninen malignen Lymphomen, und der kleinste Wert betrug 9 %. Behandelte Hunde hatten durchschnittlich 41,7% PCNA-positive Zellen und unbehandelte Hunde 46,4 % positiv markierte Zellen.

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der PCNA-Markierung für die Überlebensparameter von Hunden mit malignem Lymphom wurde der Anteil PCNA-positiver Zellen in Gruppen erfaßt. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einem Anteil PCNA-positiver Zellen bis zu 20 %, die zweite Gruppe von 21% - 40 %, die dritte Gruppe von 41% - 60% und die letzte Gruppe Lymphome mit mehr als 60 % PCNA-positiver Zellen.

Die erste Gruppe umfaßte 16 Hunde mit malignem Lymphom. Die meisten Lymphome hatten 21% - 40% PCNA-positive Zellen (39 Hunde) oder 41% - 60% PCNA-positive Zellen (43 Hunde). In der letzten Gruppe wurden 24 Hunde erfaßt.

Von 30 unbehandelten Hunden hatten 22 Tiere maligne Lymphome mit mehr als 20% PCNA-positiven Zellen und weniger als 60% PCNA-positiven Zellen. Nur 2 Hunde hatten maligne Lymphome mit weniger als 20% PCNA-positiven Zellen. Die Überlebenszeiten von unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom in Korrelation zum Anteil PCNA-positiver Zellen sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) dargestellt. Die festgestellte negative Korrelation zwischen Überlebenszeit und dem Anteil PCNA-positiver Zellen betrug für Pearson's  $r = 0,6604$  und für Spearman's  $\rho = 0,5779$  (siehe Diagramm 7).

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für PCNA als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert von  $P = 0,001$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,003$  für Hunde mit malignem Lymphomen mit 21% - 40% PCNA-positiven Zellen,  $P < 0,001$  für Hunde mit malignem Lymphomen mit 41% - 60% PCNA-positiven Zellen und  $P = 0,056$  für Hunde mit malignem Lymphom mit mehr als 60% PCNA-positiven Zellen. Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit mehr als 60% PCNA-positiven Zellen. Für Hunde mit malignem Lymphom mit weniger PCNA-positiven Zellen ergab sich eine Hazard-Rate kleiner 1, was auf ein höheres Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit niedrigem Anteil von PCNA-positiven Zellen hinweist. Allerdings erstreckten sich die Konfidenzintervalle bis 3,12 bzw. 1,21, und die geringe Anzahl (2) von Hunden mit malignem Lymphom mit weniger als 20% PCNA-positiven Zellen läßt keine realistische Bewertung dieser Ergebnisse zu.

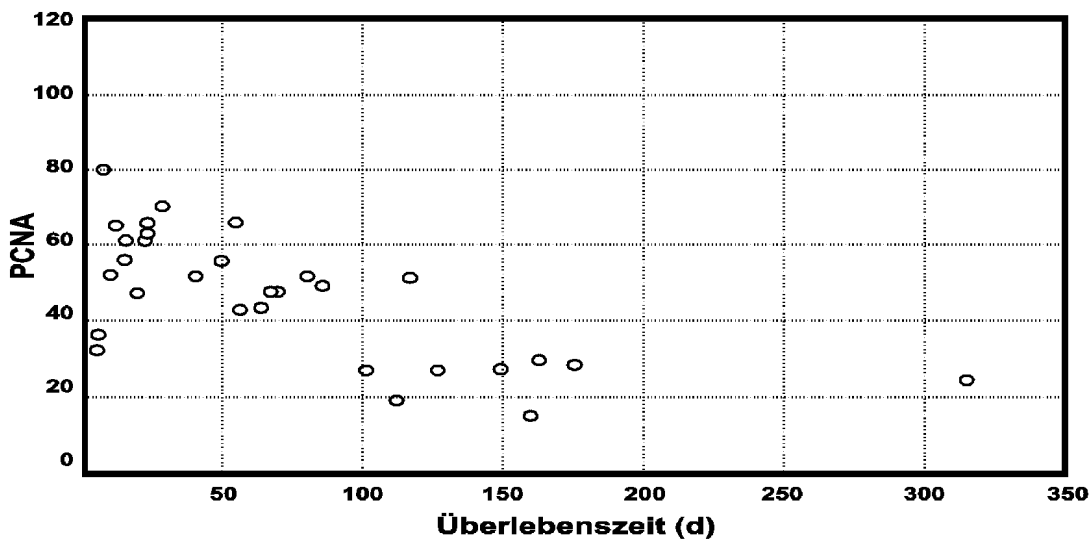


Diagramm 7: Scatter Plot des Anteils PCNA-positiver Zellen und der Überlebenszeit von unbehandelten Hunden

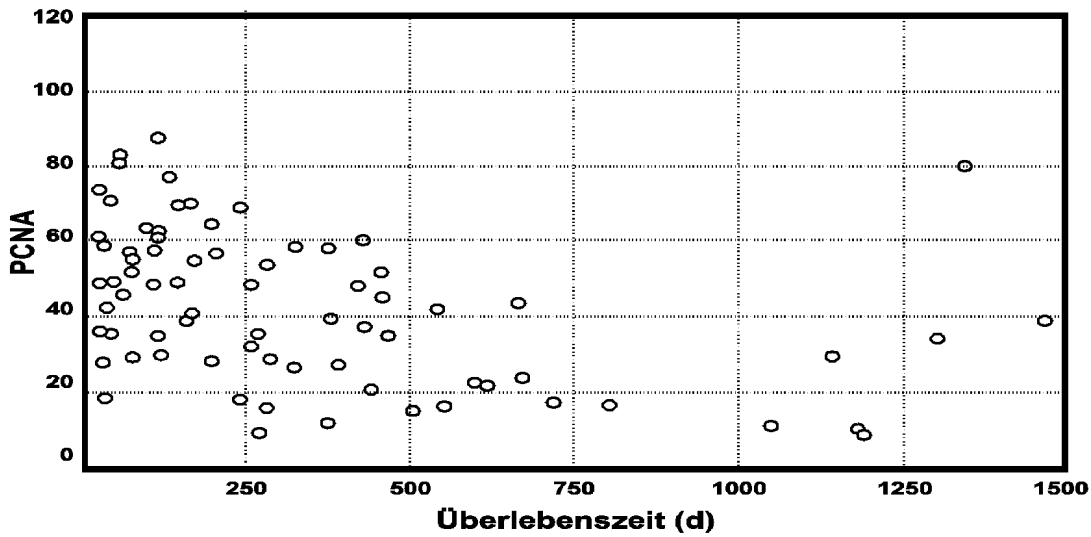


Diagramm 8: Scatter Plot des Anteils PCNA-positiver Zellen und der Überlebenszeit von behandelten Hunden

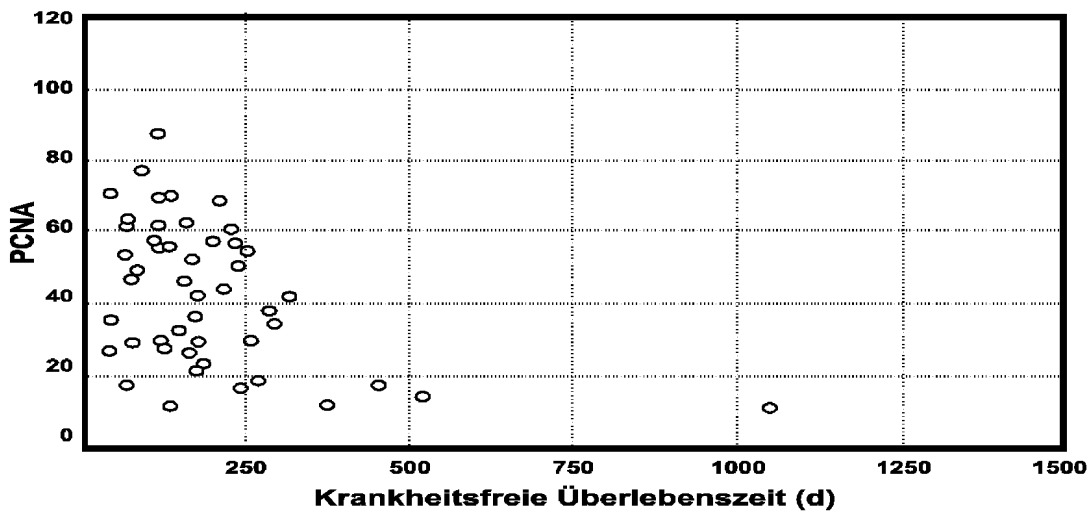


Diagramm 9: Scatter Plot des Anteils PCNA-positiver Zellen und der krankheitsfreien Überlebenszeit von behandelten Hunden

Von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom hatten 13 Hunde maligne Lymphome mit bis zu 20% PCNA-positiven Zellen und 15 Hunde maligne Lymphome mehr als 60% PCNA-positiven Zellen. Die Überlebenszeiten und krankheitsfreien Überlebenszeiten von behandelten Hunden mit malignem Lymphom in Korrelation zum Anteil PCNA-positiver Zellen sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) zusammengestellt.

In Diagramm 8 ist der Anteil PCNA-positiver Zellen in malignen Lymphomen von 74 chemotherapeutisch behandelten Hunden im Verhältnis zur Überlebenszeit dargestellt. Es konnte keine Korrelation festgestellt werden ( $r = 0,3657$ ;  $\rho = 0,4423$ ). Die univariate Analyse (siehe Tabelle 20) für PCNA als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert  $P = 0,009$  und signifikante P-Werte für Hunde mit malignem Lymphom mit 41% - 60% PCNA-positiven Zellen ( $P = 0,033$ ) und für Hunde mit mehr als 60% PCNA-positiven Zellen ( $P = 0,003$ ). Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit einem hohen Anteil PCNA-positiver Zellen. Für 39 behandelte Hunde mit malignem Lymphom mit 21% - 40% PCNA-positiven Zellen ergab sich keine prognostische Signifikanz der PCNA für die Überlebenszeit ( $P = 0,457$ ).

Tabelle 20: Resultate der univariaten Analyse für PCNA als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal		Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)			Überlebenszeit (n = 74)		
		P-Wert	Hazard-Rate	C-Intervall	P-Wert	Hazard-Rate	C-Intervall
PCNA	(%)	0,226			0,009		
	0 - 20						
	21 - 40	0,436	1,470		0,457	1,368	0,598 - 3,128
	41 - 60	0,14	2,124		0,033	2,506	1,076 - 5,840
	> 60	0,059	2,875		0,003	3,890	1,612 - 9,384

Diagramm 9 stellt den Anteil PCNA-positiver Zellen in malignen Lymphomen von 48 behandelten Hunden im Verhältnis zur krankheitsfreien Überlebenszeit dar. Es wurde keine Korrelation festgestellt ( $r = 0,1842$ ;  $\rho = 0,2314$ ). Die univariate Analyse ergab keine Signifikanz der PCNA ( $P > 0,05$ ) für die krankheitsfreie Überlebenszeit (siehe Tabelle 20).

Die multivariate Analyse konnte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Anteil PCNA-positiver Zellen in malignen Lymphomen und der Überlebenszeit/ krankheitsfreien Überlebenszeit von behandelten Hunden bestätigen.

Insgesamt erwies sich der Anteil PCNA-positiver Zellen in caninen malignen Lymphomen damit nicht als geeigneter Faktor für die prognostische Beurteilung der krankheitsfreien Überlebensparameter von behandelten Hunden. Die univariate Überlebensanalyse zeigte eine deutliche Signifikanz für die Überlebenszeit zwischen einer sehr kleinen oder großen Anzahl PCNA-positiver Zellen in malignen Lymphomen von behandelten Hunden. Dieser Zusammenhang konnte für eine kleinere Anzahl von behandelten Hunden nicht mit der multivariaten Analyse bestätigt werden.

#### 5.4.2. Ki-67

Der Antikörper MIB-1 (Immunotech S.A.) erwies sich als brauchbarer Marker für Ki-67-positive Zellen in formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebsschnitten nach Vorbehandlung in der Mikrowelle. Im Gegensatz zur PCNA war der Kontrast zwischen Ki-67-positiven und Ki-67-negativen Zellen deutlich, so daß keine Hilfsmittel zur Auszählung benötigt wurden (siehe Anhang Abb. 15 und 16).

Die Ki-67-positiven Zellen hatten einen maximalen Anteil von 82 % in caninen malignen Lymphomen, und der kleinste Wert betrug 8 %. Lymphome von behandelten Hunde hatten durchschnittlich 43,1% Ki-67-positiven Zellen und unbehandelte Hunde 50,2 % positiv markierte Zellen, wobei der kleinste Wert 18% betrug.

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der Ki-67-Markierung für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurde der Anteil Ki-67-positiver Zellen in Gruppen erfaßt. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einem Anteil Ki-67-positiver Zellen bis zu 20 %, die zweite Gruppe von 21% - 40 %, die dritte Gruppe von 41% - 60% und die letzte Gruppe Lymphome mit mehr als 60 % Ki-67-positiver Zellen.

Die erste Gruppe umfaßte 12 Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin hatten 35 Hunde maligne Lymphome mit 21% - 40% Ki-67-positiven Zellen und 41 Hunde hatten maligne Lymphome mit 41% - 60% Ki-67-positiven Zellen. In der letzten Gruppe wurden 34 Hunde erfaßt.

Von 30 unbehandelten Hunden hatten 19 Tiere maligne Lymphome mit mehr als 20% Ki-67-positiven Zellen und weniger als 60% Ki-67-positiven Zellen, und nur ein Hund hatte weniger als 20% Ki-67-positiven Zellen. Die Überlebenszeiten für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zum Anteil Ki-67-positiven Zellen sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) dargestellt. Die festgestellte negative Korrelation zwischen Überlebenszeit und dem Anteil Ki-67-positiver Zellen betrug für Pearson's  $r = 0,6219$  und für Spearman's  $\rho = 0,5317$  (siehe Diagramm 10).

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für Ki-67 als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert von  $P = 0,019$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,031$  für Hunde mit malignem Lymphom mit 21% - 40% Ki-67-positiven Zellen,  $P = 0,002$  für Hunde mit malignem Lymphom mit 41% - 60% Ki-67-positiven Zellen und  $P = 0,802$  für Hunde mit malignem Lymphom mit mehr als 60% Ki-67-positiven Zellen. Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Risiko für Hunde mit malignem Lymphom mit mehr als 60% Ki-67-positiven Zellen. Der P-Wert für diese Gruppe war nicht signifikant und somit ist die Hazard-Rate für diese Gruppe nicht beurteilbar. Für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom mit weniger Ki-67-positiven Zellen ergab sich eine Hazard-Rate kleiner 1, was auf ein höheres Überlebensrisiko für Hunde mit geringem Anteil Ki-67-positiver Zellen hinweist. Allerdings erstreckten sich die Konfidenzintervalle für die Hazard-Raten bis zu 2,54 bzw. 2,83. Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß die Gruppe von Hunden mit malignem Lymphom mit weniger als 20% Ki-67-positiven Zellen nur einen Hund enthielt und sämtliche Ergebnisse für diese Gruppe irrelevant sind. Auch die Gruppe von Hunden mit malignem Lymphom mit 21% - 40% Ki-67-positiven Zellen bestand nur aus 7 Hunden. Somit ist

eine Interpretation der Signifikanz von Ki-67 für die Prognose der Überlebenszeit nicht möglich, und eine größere Anzahl von Hunden ist nötig, um die Ergebnisse zu bestätigen.

Von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom hatten 10 Hunde maligne Lymphome mit weniger als 20% Ki-67-positiven Zellen und 14 Hunde maligne Lymphome mit mehr als 60% Ki-67-positiven Zellen. Die Überlebenszeiten und krankheitsfreien Überlebenszeiten von behandelten Hunden mit malignem Lymphom in Korrelation zum Anteil Ki-67-positiven Zellen sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) dargestellt.

In Diagramm 11 ist der Anteil Ki-67-positiver Zellen in malignen Lymphomen im Verhältnis zur Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden dargestellt. Es konnte keine Korrelation festgestellt werden ( $r = 0,2696$ ;  $\rho = 0,2644$ ).

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 21) für Ki-67 als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab signifikante P-Werte für Hunde mit malignem Lymphom mit 41% - 60% Ki-67-positiven Zellen ( $P = 0,024$ ). Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit einem hohen Anteil Ki-67-positiver Zellen. Insgesamt ergab sich keine prognostische Signifikanz des Anteils Ki-67-positiver Zellen in malignen Lymphomen für die Überlebenszeit ( $P > 0,078$ ) von behandelten Hunden.

Tabelle 21: Resultate der univariaten Analyse für Ki-67 als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)		Überlebenszeit (n = 74)	
	P-Wert	Hazard-Rate	P-Wert	Hazard-Rate
Ki-67	0,207		0,078	
0 - 20				
21 - 40	0,704	1,240	0,439	1,405
41 - 60	0,158	2,134	0,024	2,676
> 60	0,087	2,670	0,131	2,107

Diagramm 12 stellt den Anteil Ki-67-positiver Zellen in malignen Lymphomen von 48 behandelten Hunden im Verhältnis zur krankheitsfreien Überlebenszeit dar. Es wurde keine Korrelation festgestellt ( $r = 0,1704$ ;  $\rho = 0,1539$ ). Die univariate Analyse ergab keine Signifikanz des Anteils Ki-67-positiver Zellen in malignen Lymphomen ( $P > 0,08$ ) für die krankheitsfreie Überlebenszeit 48 behandelter Hunde (siehe Tabelle 21).



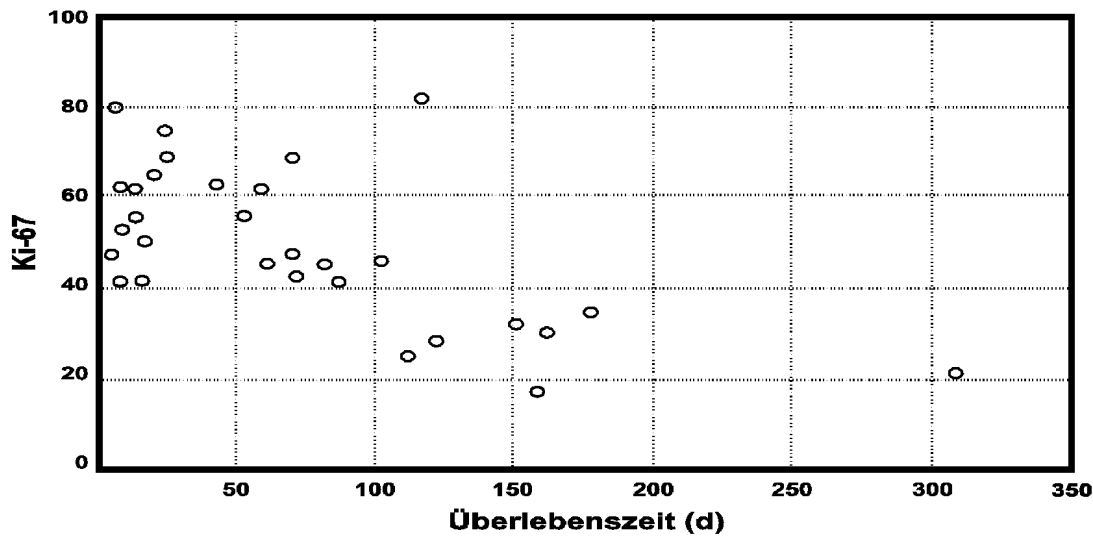


Diagramm 10: Scatter Plot des Anteils Ki-67-positiver Zellen und der Überlebenszeit von unbehandelten Hunden

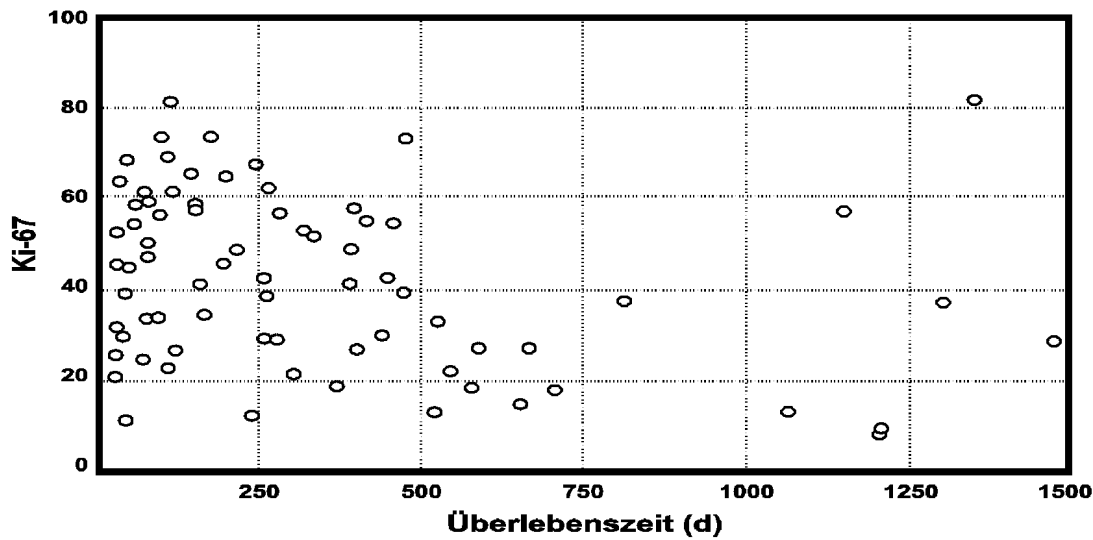


Diagramm 11: Scatter Plot des Anteils Ki-67-positiver Zellen und der Überlebenszeit von behandelten Hunden

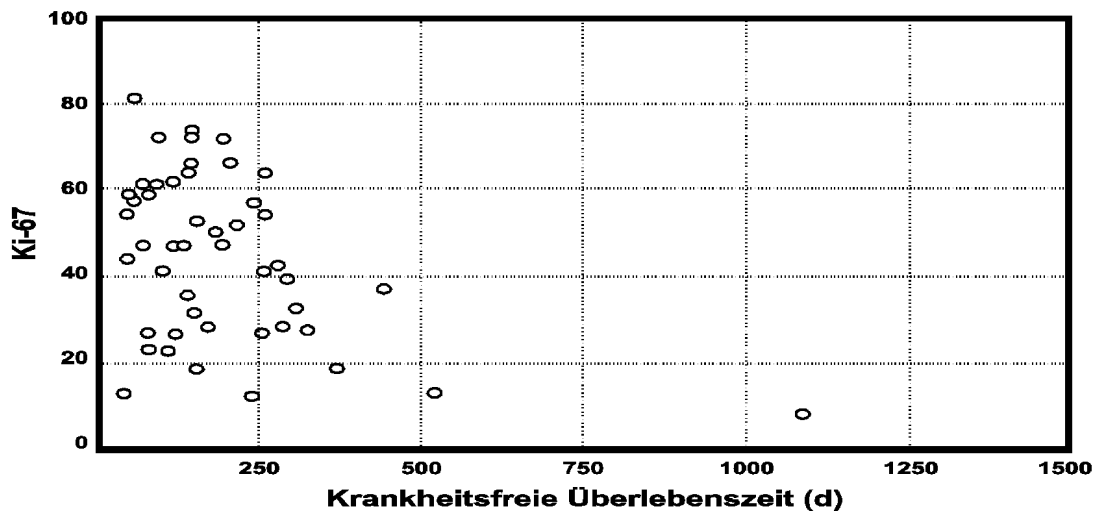


Diagramm 12: Scatter Plot des Anteils Ki-67-positiver Zellen und der krankheitsfreien Überlebenszeit von behandelten Hunden

Die multivariate Analyse konnte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Anteil Ki-67-positiver Zellen in malignen Lymphomen und der Überlebenszeit/ krankheitsfreien Überlebenszeit von behandelten Hunden bestätigen. Insgesamt erwies sich der Anteil Ki-67-positiver Zellen in caninen malignen Lymphomen damit nicht als prognostisch geeigneter Faktor für die Beurteilung der Überlebensparameter von behandelten Hunden.

### Vergleich Ki-67 und PCNA

Im Diagramm 13 ist das Verhältnis von PCNA und Ki-67 für insgesamt 105 behandelte und unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom dargestellt. Die positive Korrelation zwischen beiden Parametern betrug für Pearson's  $r = 0,5543$  und für Spearman's  $\rho = 0,5625$ .

Alle Zellen in der S-Phase werden durch die PCNA erfasst. Da mit Ki-67 alle sich im Zyklus befindlichen Zellen markiert werden, müssten auch die PCNA-positiven Zellen jeweils positiv für Ki-67 sein. Somit war eine generell höhere Anzahl Ki-67-positiver Zellen zu erwarten. Dies traf auf insgesamt 66 Lymphome zu, und in weiteren 20 Lymphomen ist der Anteil Ki-67-positiver Zellen gleich bzw. maximal 5% kleiner als der Anteil PCNA-positiver Zellen. Nur in 15 caninen malignen Lymphomen ist der Anteil PCNA-positiver Zellen deutlich höher als der Anteil Ki-67-positiver Zellen.

PCNA und Ki-67 erfassen verschiedene Proliferationsparameter und dürfen nicht direkt miteinander verglichen werden. Weder der Anteil PCNA-positiver Zellen noch der Anteil Ki-67-positiver Zellen war prognostisch signifikant für die Überlebenszeit oder die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom in der multivariaten Analyse.

### 5.4.3. Mitoserate

Die Mitoserate in caninen malignen Lymphomen betrug durchschnittlich 6,1, und es wurden zwischen 1 und 19 mitotische Figuren pro Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung erfasst. Behandelte Hunde hatten eine durchschnittliche Mitoserate von 6,5 und unbehandelte Hunde von 5,9.

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der Mitoserate für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurde die durchschnittliche Anzahl mitotischer Figuren in Gruppen erfasst. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einer Mitoserate kleiner 9, die zweite Gruppe hatte eine Mitoserate von 10 bis 12, und in der letzten Gruppe wurden Lymphome mit einer Mitoserate größer 12 erfasst.

Die erste Gruppe umfaßte 105 Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin hatten 10 Hunde maligne Lymphome mit einer Mitoserate zwischen 10 und 12, und 7 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer Mitoserate größer 12.

Von 30 unbehandelten Hunden hatten 26 Tiere maligne Lymphome mit einer Mitoserate kleiner als 9. Die Überlebenszeiten von unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom in Korrelation zur Mitoserate sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) dargestellt.

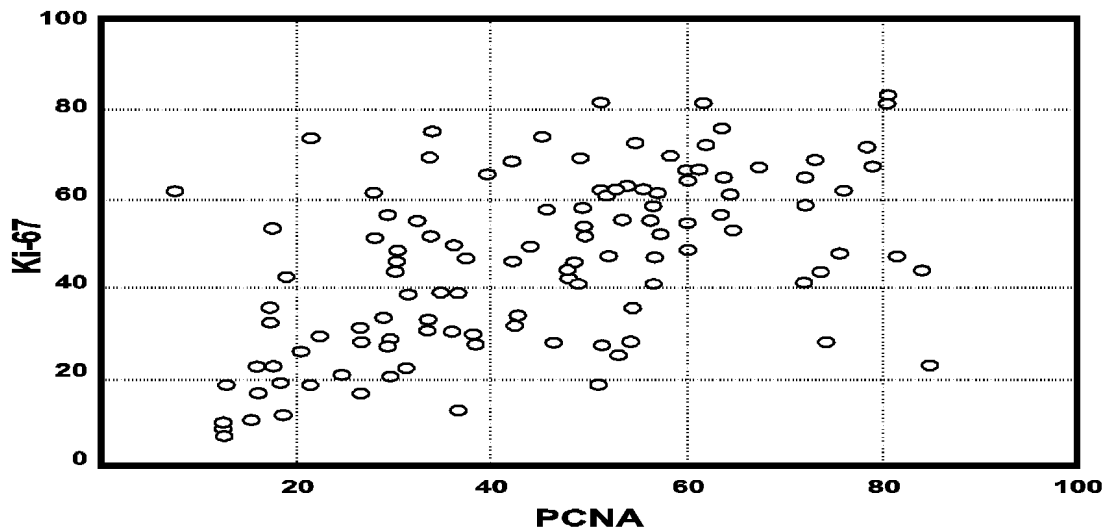
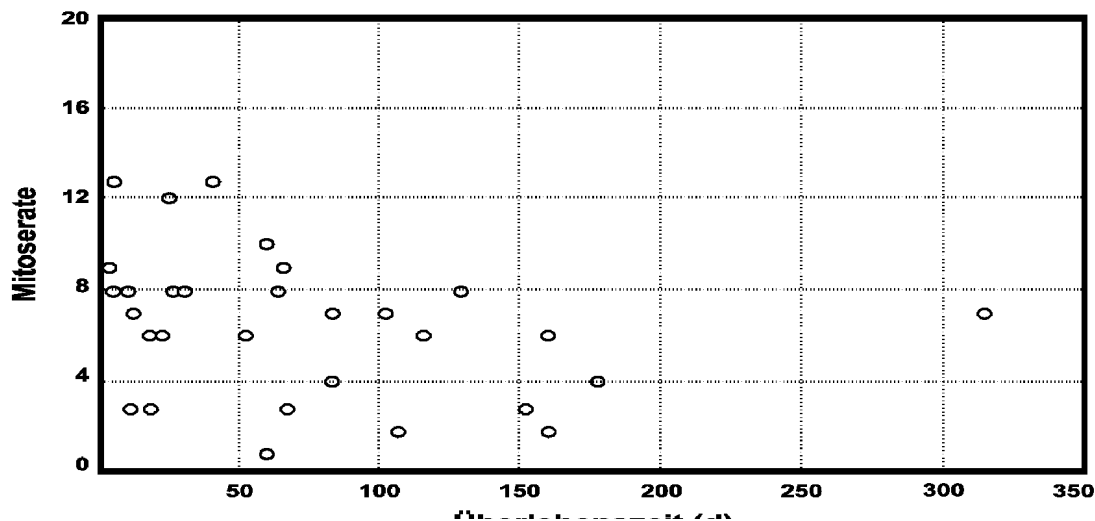
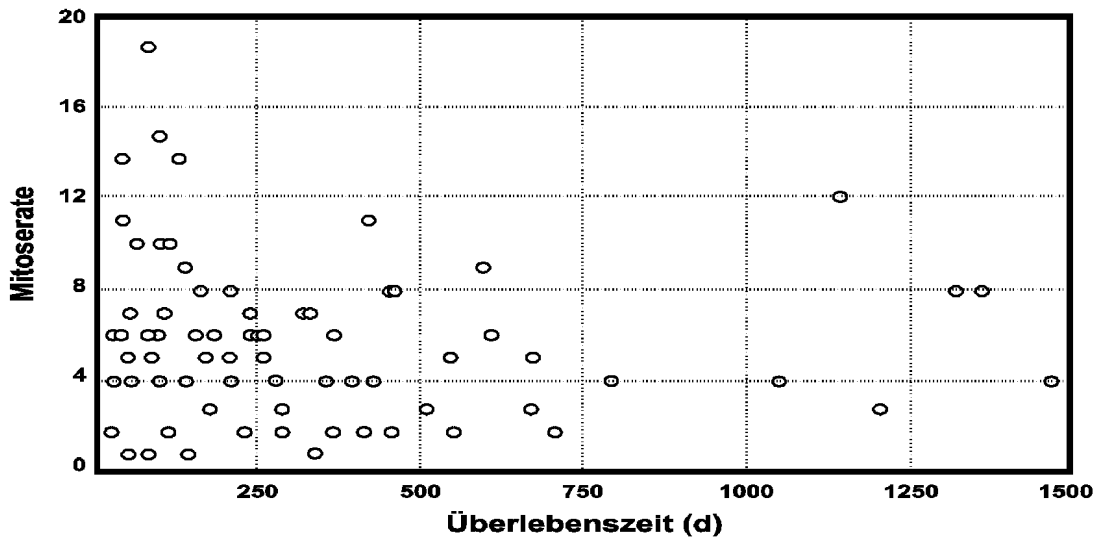


Diagramm 13: Scatter Plot des Anteils PCNA- und Ki-67-positiver Zellen



**Überlebenszeit (a)**

**Diagramm 14: Scatter Plot der Mitoserate und der Überlebenszeit von unbehandelten Hunden**



**Diagramm 15: Scatter Plot der Mitoserate und der Überlebenszeit von behandelten Hunden**

Die festgestellte negative Korrelation zwischen Überlebenszeit und der Mitoserate von caninen malignen Lymphomen betrug für Pearson's  $r = 0,3021$  und für Spearman's  $\rho = 0,374$  (siehe Diagramm 14). Die univariate Analyse ergab keine Signifikanz ( $P > 0,3$ ) der Mitoserate für die Überlebenszeit 30 unbehandelter Hunde (siehe Anhang Tabelle 32).

Die Überlebenszeiten und krankheitsfreien Überlebenszeiten von unbehandelten Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur Mitoserate sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) dargestellt.

In Diagramm 15 ist die Mitoserate in malignen Lymphomen im Verhältnis zur Überlebenszeit von behandelten Hunden dargestellt. Es konnte keine Korrelation festgestellt werden ( $r = 0,0961$ ;  $\rho = 0,1144$ ). Die univariate Analyse (siehe Tabelle 22) für die Mitoserate als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert ( $P = 0,028$ ). Für Hunde mit malignem Lymphom mit einer Mitoserate größer 12 betrug die prognostische Signifikanz  $P = 0,005$ . Die Hazard-Rate zeigte ein 6fach (6,38) erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit einer Mitoserate größer 12. Das 95%-Konfidenz-Intervall lag zwischen 1,77 und 23,04. Für 48 behandelte Hunde mit malignem Lymphom ergab die univariate Analyse eine prognostische Signifikanz für die krankheitsfreie Überlebenszeit von  $P = 0,02$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer Mitoserate größer 12. Das 95%-Konfidenz-Intervall lag zwischen 1,56 und 193,0 bei einer Hazard-Rate von 17,4. Die Anzahl von Hunden mit malignem Lymphom mit einer Mitoserate größer 12 betrug 4 Hunde von 74 für die Analyse der Überlebenszeit und 2 von 48 für die Analyse der krankheitsfreien Überlebenszeit. In der multivariaten Analyse wurde keine Signifikanz gefunden.

Tabelle 22: Resultate der univariaten Analyse für die Mitoserate als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)			Überlebenszeit (n = 74)		
	P-Wert	Hazard-Rate	C-Intervall	P-Wert	Hazard-Rate	C-Intervall
MITOSE	0,137			0,028		
0 - 9						
10 - 12	0,390	1,597	0,5497 - 4,640	0,287	1,670	0,6494 - 4,296
> 12	0,020	17,36	1,561 - 193,0	0,005	6,380	1,766 - 23,04

Die Mitoserate ist nicht prognostisch signifikant für die Überlebenszeit von unbehandelten und behandelten Hunden und für die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden. Eine Mitoserate größer 12 liegt nur in Lymphomen weniger Tiere vor und ist wahrscheinlich mit einem erhöhten Überlebensrisiko verbunden, was durch eine größere Stichprobenanzahl statistisch bestätigt werden muß.

**5.4.4. AgNORs**

5.4.4.1. Qualitative Beurteilung

AgNOR-Typ (TYPE)

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der Verteilungsmuster der AGNORs im Zellkern für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurden 5 AgNOR-Typen erfaßt (siehe Anhang, Abb. 17 bis 21). Diese Typen wurden wie folgt definiert:

Im Typ 1 sind die NORs vollkommen aggregiert und formen eine solitäre, abgerundete, argyrophile Struktur, die oft als AgNOR beschrieben wird, wobei es sich aber eigentlich um den Nukleolus als solchen handelt. Zellen dieses Typs zeigen meist 1 bis 5 solcher Strukturen und sind charakteristisch für Zellen der 1. Generation oder „ruhende“ Zellen, also Zellen niedriger Malignität.

Große, zentral gelegene Nukleolen mit einem großen, oft randständigen oder auch keinem AgNOR im Inneren sind charakteristisch für den Typ 2. Es scheint sich meist um Zellen der 1. Generation, also Zellen niedriger Malignität zu handeln.

Beim Typ 3 können AgNORs innerhalb des Nukleolus als einzelne Strukturen beobachtet werden. Dieses Verteilungsmuster weist eine große Häufigkeit auf und ist charakteristisch für proliferierende Zellen. Typ 3 ist stets von höherer Malignität als Typ 1 oder 2. Anzahl, Größe und Aggregation der im Nukleolus gelegenen AgNORs scheinen direkt mit der Malignität zu korrelieren.

Für Typ 4 ist charakteristisch, daß eine große Anzahl von AgNORs irreguläre Aggregationen formen, aber die einzelnen AgNORs sind noch deutlich zu erkennen. Im Gegensatz zu Typ 2 sind hier die Zusammenballungen granuliert und oft kleiner, dafür aber in größerer Anzahl vorhanden. Diese Strukturen können frei im Zellkern oder im Nukleolus beobachtet werden und sind stets ein Ausdruck für Zellen hoher Malignität.

Oft sehr kleine, aber in großer Anzahl vorliegende AgNORs kennzeichnen den Typ 5. Diese Strukturen sind charakteristisch für proliferierende Zellen und vor allem in Zellen späterer Generationen anzutreffen. Typ 5 repräsentiert Zellen hoher Malignität.

Der AgNOR-Typ eines Lymphoms ergab sich aus dem festgestellten AgNOR-Typ in der Mehrzahl der Zellen des untersuchten Tumors.

Der erste AgNOR-Typ umfaßte 14 Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin hatten 20 Hunde maligne Lymphome mit AGNOR-Typ 2, 43 Hunde maligne Lymphome mit AGNOR-Typ 3, 12 Hunde maligne Lymphome mit AGNOR-Typ 4 und 33 Hunde hatten maligne Lymphome mit AGNOR-Typ 5.

Von 30 unbehandelten Hunden hatten 3 Tiere maligne Lymphome mit AGNOR-Typ 1, 4 Hunde hatten maligne Lymphome mit AGNOR-Typ 2, 7 Hunde hatten maligne Lymphome mit AGNOR-Typ 3, 5 Hunde hatten maligne Lymphome mit AGNOR-Typ 4 und 11 Hunde hatten maligne Lymphome mit AGNOR-Typ 5. Die Überlebenszeiten von unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom in Korrelation zum AGNOR-Typ sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) zusammengefaßt. Diese Ergebnisse sind im Diagramm 16 dargestellt. Die Boxplots für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 4 und 5 liegen vollständig getrennt von den Boxplots für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 1 und 2 und zeigen keine Überlappung innerhalb der 5% und 95% Fraktile für die Überlebenszeit. Das Boxplot für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 3 überlappt mit allen anderen Boxplots, allerdings ergibt sich eine deutliche Trennung zwischen den 75% Fraktile für die Überlebenszeit von Hunden mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 3, 4 und 5.

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für den AGNOR-Typ als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert von  $P = 0,005$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,008$  für Hunde mit malignem Lymphom mit AGNOR-Typ 2,  $P < 0,001$  für Hunde mit malignem Lymphom mit AGNOR-Typ 3,  $P = 0,005$  für Hunde mit malignem Lymphom mit AGNOR-Typ 4 und  $P = 0,309$  für Hunde mit malignem Lymphom mit AGNOR-Typ 5. Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerem AGNOR-Typ, wobei die Hazard-Rate zwischen 0,049 und 1,949 für die verschiedenen Gruppen betrug, jedoch die Konfidenzintervalle sich zwischen 0,003 und 70,643 erstreckten. Damit war der AgNOR-Typ ein bedeutender prognostischer Parameter für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom.

Die Überlebenszeiten und krankheitsfreien Überlebenszeiten von behandelten Hunden mit malignem Lymphom in Korrelation zum AGNOR-Typ sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) zusammengefaßt.

Die Boxplots in Diagramm 17 zeigen das Verhältnis der Überlebenszeiten zwischen 74 behandelten Hunden mit Lymphomen mit unterschiedlichem AgNOR-Typ. Die Boxplots für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 4 und 5 liegen getrennt von den Boxplots für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 1, 2 und 3 und zeigen keine Überlappung innerhalb der 25% und 75% Fraktile für die Überlebenszeit bezogen auf Typ 4 und nur eine leichte Überlappung innerhalb der 25% und 75% Fraktile von Typ 3 und 5.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 23) für den AgNOR-Typ als prognostischen Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert von  $P = 0,008$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,668$  für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 2,  $P = 0,147$  für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 3,  $P = 0,007$  für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 4 und  $P = 0,007$  für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-5. Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerem AgNOR-Typ, wobei die Hazard-Rate zwischen 1,249 und 10,68 für die verschiedenen Gruppen betrug. Die Konfidenzintervalle erstreckten sich zwischen 0,4521 und 60,02.

Die Boxplots in Diagramm 18 zeigen das Verhältnis der krankheitsfreien Überlebenszeit zwischen 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom mit unterschiedlichem AgNOR-Typ. Zwar liegen die krankheitsfreien Überlebenszeiten für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 1 und 2 innerhalb des 25 % und 75 % Fraktils insgesamt niedriger als für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 4 und 5, doch es konnte keine prognostische Signifikanz ermittelt werden.

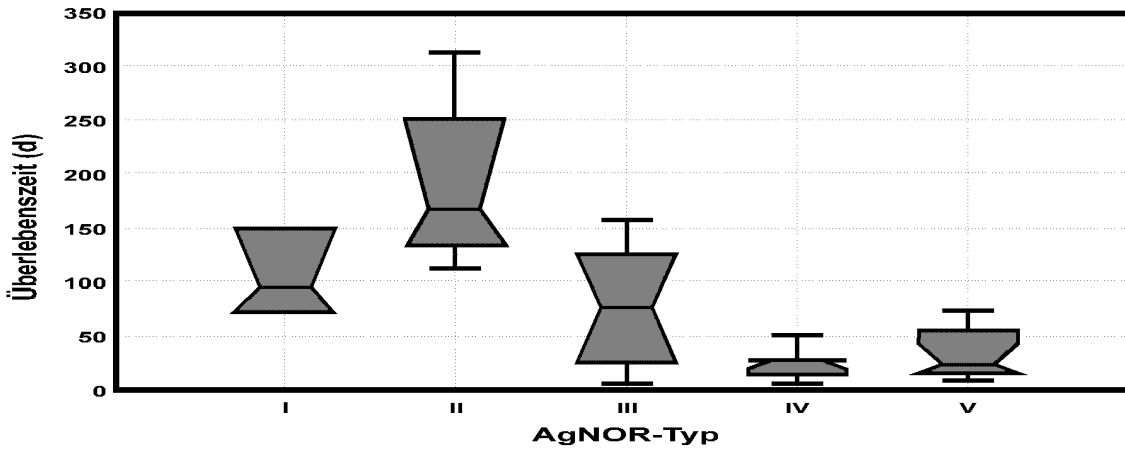


Diagramm 16: Box Plots der Überlebenszeit von unbehandelten Hunden auf Grund des AgNOR-Typs

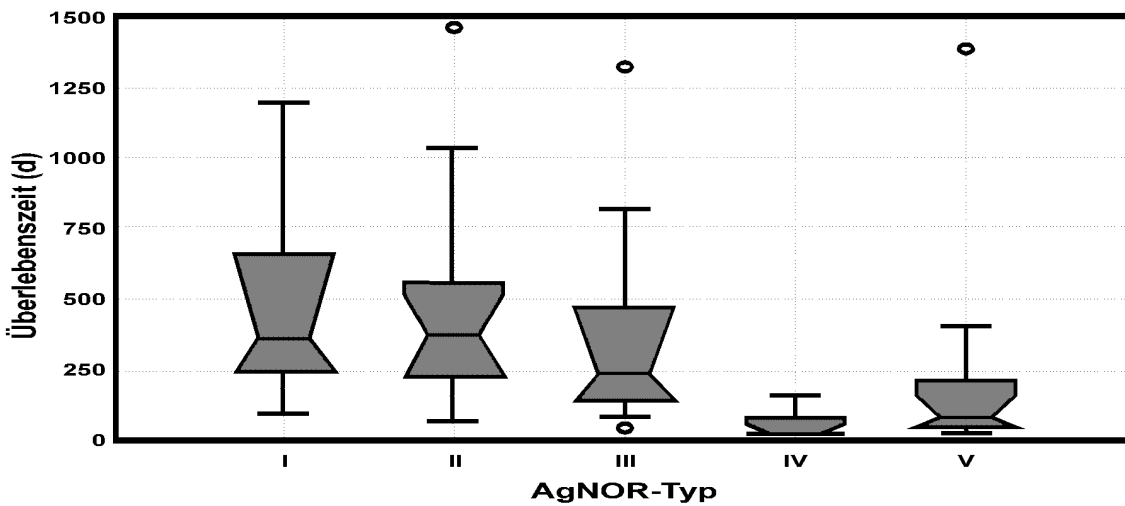


Diagramm 17: Box Plots der Überlebenszeit von behandelten Hunden auf Grund des AgNOR-Typs

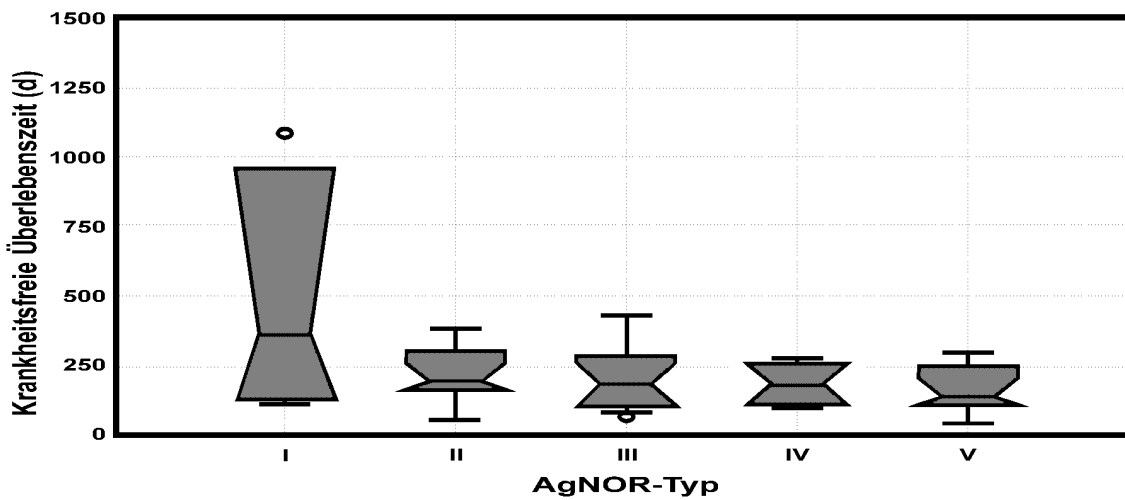


Diagramm 18: Box Plots der krankheitsfreien Überlebenszeit von behandelten Hunden auf Grund des AgNOR-Typs

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 23) für den AgNOR-Typ als prognostischen Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab nur einen signifikanten P-Wert ( $P = 0,012$ ) zwischen Hunden mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 3 und 4. Die P-Werte zwischen den anderen Gruppen variierten zwischen  $P = 0,082$  für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 5 und  $P = 0,889$  für Hunde mit malignem Lymphom mit AgNOR-Typ 2. Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerem AgNOR-Typ, wobei die Hazard-Rate zwischen 1,098 und 28,28 für die verschiedenen Gruppen betrug. Das

Konfidenzintervall für die Hazard-Rate des signifikanten P-Wertes erstreckte sich von 2,085 bis zu 383,5.

In der multivariaten Analyse erwies sich der AgNOR-Typ als prognostisch nicht signifikant für die Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden und für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden.

Diese Resultate deuten darauf hin, daß der AgNOR-Typ ein prognostisch signifikanter Parameter für die Überlebenszeit von behandelten und unbehandelten Hunden ist. Dies konnte für eine kleinere Anzahl von Hunden nicht in der multivariaten Analyse bestätigt werden.

Tabelle 23: Resultate der univariaten Analyse für den AgNOR-Typ als prognostischen Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)			Überlebenszeit (n = 74)		
	P-Wert	Hazard-Rate	C-Intervall	P-Wert	Hazard-Rate	C-Intervall
AgNOR-Typ	0,118			0,008		
1						
2	0,889	1,098	0,2964 - 4,063	0,668	1,249	0,4521 - 3,448
3	0,320	1,762	0,5762 - 5,391	0,147	1,968	0,7889 - 4,908
4	0,012	28,28	2,085 - 383,5	0,007	10,68	1,899 - 60,02
5	0,082	3,063	0,8673 - 10,82	0,007	3,889	1,462 - 10,34

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

#### 5.4.4.2. Quantitative Beurteilung

##### Erfassung der AgNOR-Anzahl

Die durchschnittliche AgNOR-Anzahl pro Zellkern bezogen auf 100 Zellen wurde sowohl durch einfaches Auszählen unter ölimmersion als auch mit Hilfe der Mikroskopbildanalyse bestimmt (siehe Anhang Abb. 24 bis 27).

Die durchschnittliche, mit der Mikroskopbildanalyse ermittelte AgNOR-Anzahl (NORNBC) lag zwischen 1,2 und 11,9 AgNORs pro Zellkern, wobei behandelte Hunde im Durchschnitt 5,86 AgNORs pro Zellkern aufwiesen und unbehandelte Hunde 5,71 AgNORs pro Zellkern (siehe Anhang Abb. 22 bis 23).

Die visuelle Methode ergab eine durchschnittliche AgNOR-Anzahl zwischen 1,5 und 10,4 pro Zellkern. Behandelte Hunde hatten durchschnittlich 5,63 AgNORs pro Zellkern und unbehandelte Hunde 6,00 AgNORs pro Zellkern.

Diagramm 19 zeigt das Verhältnis der visuell und mit der Mikroskopbildanalyse ermittelten durchschnittlichen AgNOR-Anzahl pro Zellkern von 122 Hunden in einem Scatter Plot. Die festgestellte positive Korrelation betrug für Pearson's  $r = 0,8568$  und für Spearman's  $\rho = 0,8859$ . Der festgestellte Unterschied zwischen der visuell ermittelten AgNOR-Anzahl pro Zellkern und den Werten der Mikroskopbildanalyse ergibt sich zum großen Teil aus methodischen Verschiedenheiten. Die Mikroskopbildanalyse erfaßt nur AgNORs in einer Ebene, während beim einfachen Auszählen der Schnitt durchfokussiert wurde. Weiterhin werden in der Mikroskopbildanalyse irreguläre Cluster als Mehrfachstrukturen erkannt.

Generell ergab sich nur ein geringfügiger Unterschied zwischen der visuell und der mit Computer ermittelten AgNOR-Anzahl pro Zellkern. Auf Grund dieser hohen positiven Korrelation wurde für Vergleiche zwischen der durchschnittlichen AgNOR-Anzahl pro Zellkern und anderen AgNOR-Parametern, sowie anderen Proliferationsmarkern und bei der Analyse der prognostischen Bedeutung der durchschnittlichen AgNOR-Anzahl pro Zellkern für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit von unbehandelten und behandelten Hunden mit malignem Lymphom nur die mit Computer erfaßte durchschnittlichen AgNOR-Anzahl (NORNBC) pro Zellkern berücksichtigt.

##### AgNORs und PCNA

Im Diagramm 20 sind die durchschnittliche AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC) und der Anteil PCNA-positiver Zellen im Verhältnis zueinander dargestellt. Es konnte keine Korrelation festgestellt werden (Pearson's  $r=0,4816$  und Spearman's  $\rho=0,5408$ ). Die durchschnittliche AgNOR-Anzahl pro Zellkern ist abhängig von der Zellzyklusphase und der Zellaktivierung. Der Anteil PCNA-positiver Zellen dagegen ist nur von der Zellzyklusphase abhängig. Dieser Zusammenhang wird deutlich durch die Anzahl von Hunden mit Lymphomen mit niedrigem Anteil PCNA-positiver Zellen und hoher durchschnittlicher AgNOR-Anzahl.

##### AgNORs und Ki-67

Im Diagramm 21 sind die durchschnittliche AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC) und der Anteil Ki-67-positiver Zellen im Verhältnis zueinander dargestellt. Es konnte keine Korrelation festgestellt werden (Pearson's  $r=0,5421$  und Spearman's  $\rho=0,5710$ ). Ki-67 charakterisiert die Wachstumsfraktion. Im Scatter plot wird deutlich, daß bei einem Anteil Ki-67-positiver Zellen von mehr als 60% die durchschnittliche AgNOR-Anzahl

pro Zellkern sich ebenfalls erhöht.

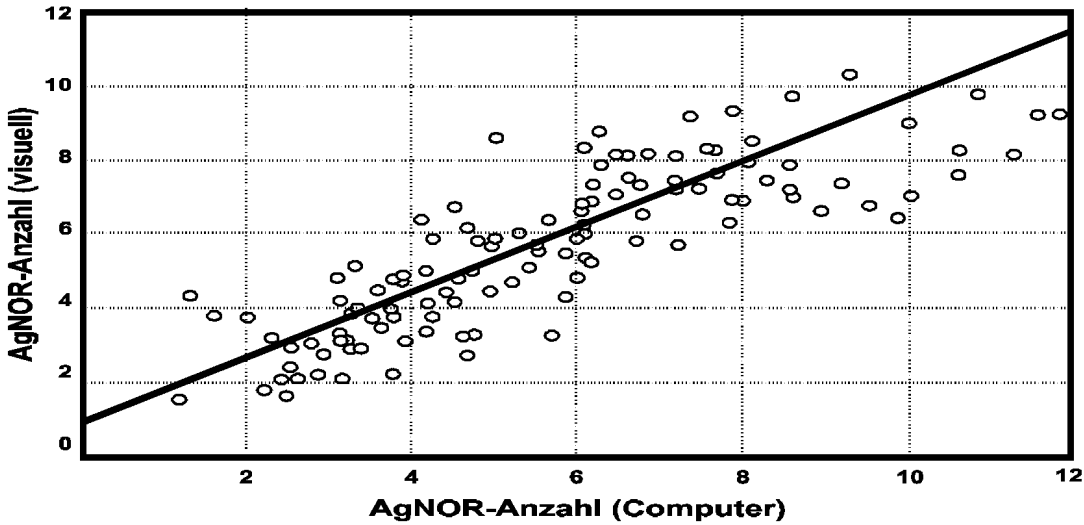


Diagramm 19: Scatter Plot der per Computer ermittelten und der visuell erfaßten AgNOR-Anzahl

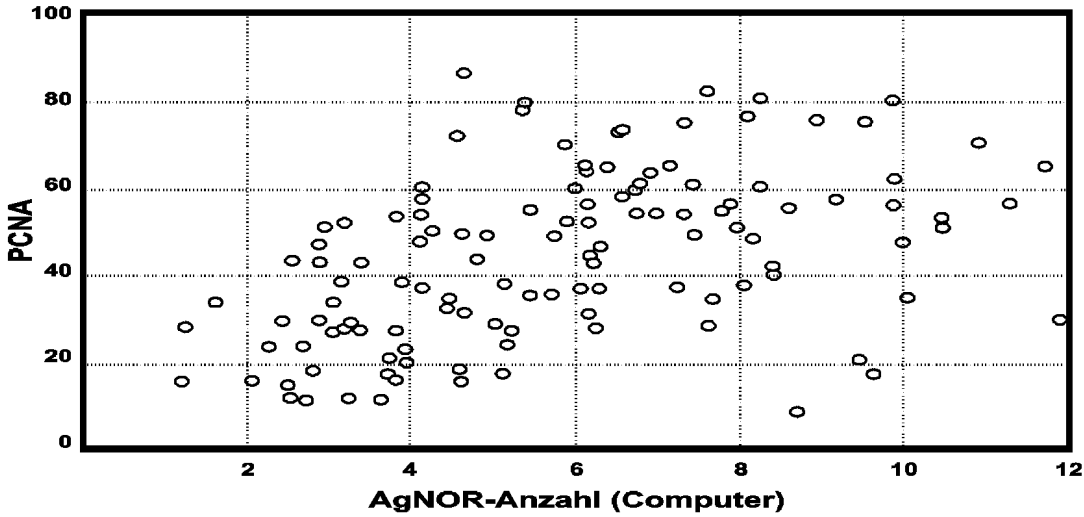


Diagramm 20: Scatter Plot des Anteils PCNA-positiver Zellen und der AgNOR-Anzahl

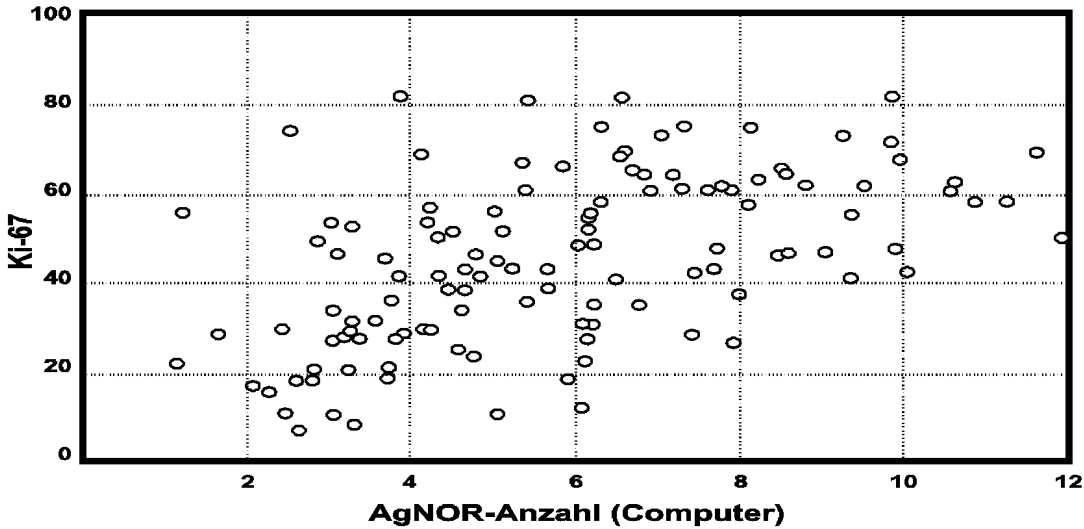


Diagramm 21: Scatter Plot des Anteils Ki-67-positiver Zellen und der AgNOR-Anzahl

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der NORNBC für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurde die durchschnittliche AgNOR-Anzahl pro Zellkern in Gruppen erfasst. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einer durchschnittliche AgNOR-Anzahl bis zu 3,0, die zweite Gruppe Lymphome mit einer durchschnittliche AgNOR-Anzahl von 3,0 bis 6,0 und die letzte Gruppe Lymphome mit einer durchschnittliche AgNOR-Anzahl größer 6,0.

Die erste Gruppe umfasste 13 Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin hatten 51 Hunde maligne Lymphome mit einer NORNBC zwischen 3,0 und 6,0 und 58 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer NORNBC größer 6,0.

Von 30 unbehandelten Hunden hatten 3 Tiere maligne Lymphome mit einer NORNBC kleiner 3,0, 16 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer NORNBC zwischen 3,0 und 6,0 und 11 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer NORNBC größer 6,0. Die Überlebenszeiten von unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom in Korrelation zur NORNBC sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) erfasst. Die festgestellte negative Korrelation zwischen der Überlebenszeit und NORNBC für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom betrug für Pearson's  $r = 0,7680$  und für Spearman's  $\rho = 0,7490$  (siehe Diagramm 22).

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für NORNBC als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert von  $P < 0,001$  für Hunde mit malignem Lymphom zwischen allen NORNBC Gruppen. Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer NORNBC, wobei die Hazard-Rate 0,181 bzw. 0,889 betrug, die Konfidenzintervalle sich jedoch zwischen 0,024 und 1,344 bzw. 0,288 und 3,466 erstreckten. Damit war die NORNBC ein bedeutender prognostischer Parameter für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom.

Die Überlebenszeiten und die krankheitsfreien Überlebenszeiten für behandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur NORNBC sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) erfasst. In Diagramm 23 ist die NORNBC von malignen Lymphomen im Verhältnis zur Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden dargestellt. Es wurde eine keine Korrelation für Pearson's  $r = 0,3970$  und für Spearman's  $\rho = 0,5633$  festgestellt.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 24) für NORNBC als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert  $P < 0,001$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,625$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer NORNBC zwischen 3,0 und 6,0 und  $P < 0,001$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer NORNBC größer 6,0. Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer NORNBC, wobei die Hazard-Rate 1,227 bzw. 5,611 mit sich erhöhender NORNBC betrug und die Konfidenzintervalle sich von 0,539 bzw. 2,364 bis zu 2,792 bzw. 13,32 erstreckten.

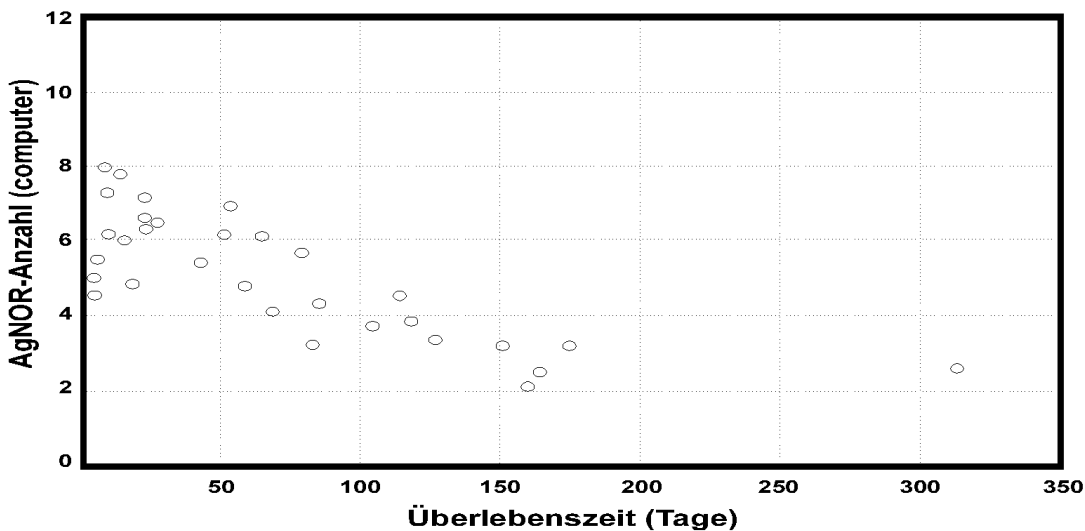


Diagramm 22: Korrelation zwischen der AgNOR-Anzahl und der Überlebenszeit von unbehandelten Hunden

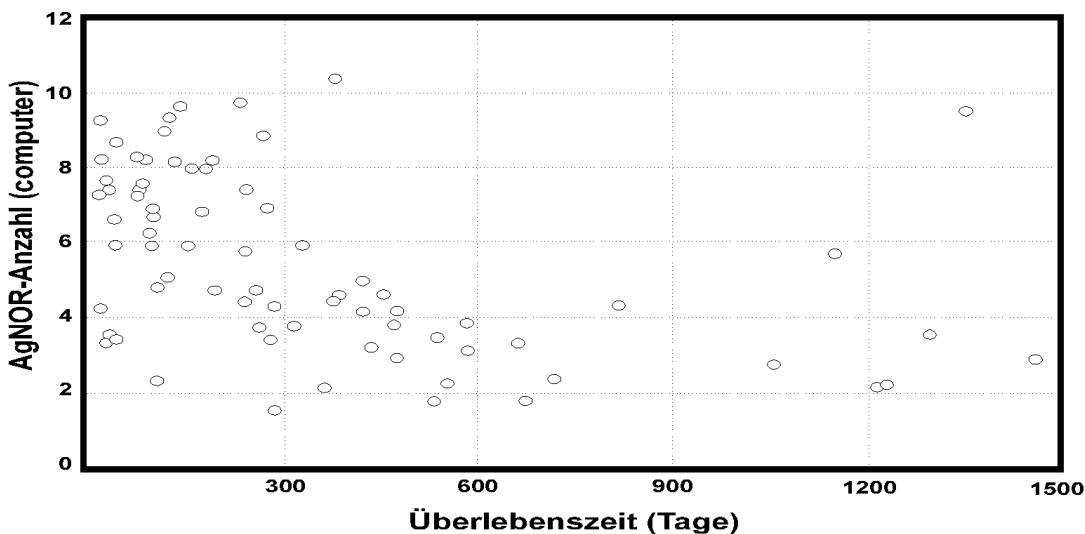


Diagramm 23: Korrelation zwischen der AgNOR-Anzahl und der Überlebenszeit von behandelten Hunden



### Überlebenszeit von behandelten Hunden

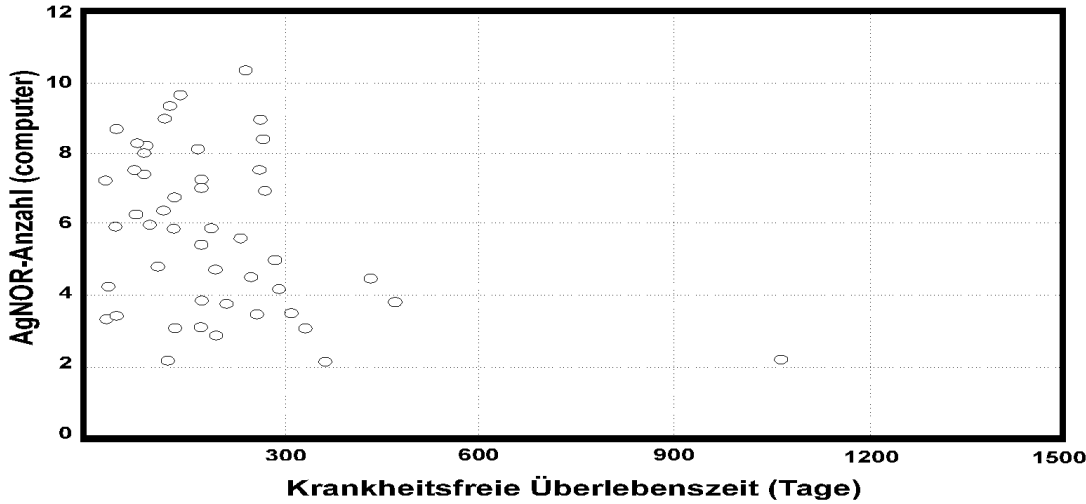


Diagramm 24: Korrelation zwischen der AgNOR-Anzahl und der krankheitsfreien Überlebenszeit von behandelten Hunden

In Diagramm 24 ist die NORNBC von malignen Lymphomen im Verhältnis zur krankheitsfreien Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden dargestellt. Es wurde eine keine Korrelation für Pearson's  $r = 0,2763$  und für Spearman's  $\rho = 0,4006$  festgestellt.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 24) für NORNBC als prognostischer Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert  $P < 0,001$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,399$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer NORNBC zwischen 3,0 und 6,0 und  $P = 0,008$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer NORNBC größer 6,0. Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer NORNBC, wobei die Hazard-Rate 1,543 bzw. 5,078 mit sich erhöhender NORNBC betrug und die Konfidenzintervalle sich von 0,508 bzw. 1,531 bis zu 4,686 bzw. 16,84 erstreckten.

Tabelle 24: Resultate der univariaten Analyse für die AgNOR-Anzahl als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)			Überlebenszeit (n = 74)		
	P-Wert	Hazard-Rate	C-Intervall	P-Wert	Hazard-Rate	C-Intervall
NORNBC	< 0,001			< 0,001		
0 - 3,00						
3,01 - 6,00	0,399	1,772	0,4685 - 6,705	0,182	1,877	0,7437 - 4,737
> 6,00	0,008	6,647	1,628 - 27,14	< 0,001	9,340	3,367 - 25,91
AgNOR-Anzahl	0,005			< 0,001		
0 - 300						
301 - 600	0,444	1,543	0,5081 - 4,686	0,625	1,227	0,5394 - 2,792
> 600	0,008	5,078	1,531 - 16,84	< 0,001	5,611	2,364 - 13,32

In der multivariaten Analyse erwies sich die NORNBC als prognostisch nicht signifikant für die Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden.

Dagegen erwies sich die NORNBC in der multivariaten Analyse als prognostisch signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit einem P-Wert  $P = 0,001$  (siehe Tabelle 25). Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,002$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer NORNBC zwischen 3,0 und 6,0 und  $P < 0,001$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer NORNBC größer 6,0. Die Hazard-Rate zeigte ein stark erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer NORNBC, wobei die Hazard-Rate 26,09 bzw. 63,80 mit sich erhöhender NORNBC betrug und die Konfidenzintervalle sich von 3,285 bzw. 5,782 bis zu 207,2 bzw. 704,0 erstreckten.

Diese Resultate demonstrieren deutlich, daß die NORNBC ein prognostisch signifikanter Parameter für die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden ist. Größerer Untersuchungszahlen sind notwendig, um die Bedeutung der AgNOR-Anzahl für die Überlebenszeit von behandelten und unbehandelten Hunden beweisen zu können.

Tabelle 25: Resultate der multivariaten Analyse für die AgNOR-Anzahl als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)		
	P-Wert	Hazard-Rate	95% C-Intervall
NORNBC	0,001		
0 - 3,00			
3,01 - 6,00	0,002	26,09	3,285 - 207,2
> 600	< 0,001	63,80	5,782 - 704,0

Die Ergebnisse für die visuell ermittelte durchschnittliche AgNOR-Anzahl pro Zellkern sind ähnlich den Ergebnissen für die NORNBC.

#### Erfassung der AgNOR-Fläche

Die AgNOR-Fläche wurde mittels Mikroskopbildanalyse (siehe Anhang Abb. 24 bis 27) durch folgende Parameter erfaßt:

MEANAR beschreibt die durchschnittliche Anschnittsfläche der einzelnen AgNORs pro Zellkern für 100 Zellen. S\_AREA charakterisiert die Summe der Anschnittsfläche aller AgNORs pro Zellkern für 100 Zellen und MAXNOR die Anschnittsfläche des größten AgNORs im Zellkern für 100 Zellen. AR\_RAT beschreibt das Verhältnis der AgNOR-Summenfläche (S\_AREA) zur Zellkernfläche für 100 Zellen und SIZRAT das Verhältnis der AgNOR-Fläche (MEANAR) zur Zellkernfläche für 100 Zellen.

#### MEANAR

Die maximale MEANAR betrug  $2,43 \mu\text{m}^2$  und die minimale MEANAR  $0,11 \mu\text{m}^2$  in 122 untersuchten caninen malignen Lymphomen. Behandelte Hunde hatten eine durchschnittliche AgNOR-Fläche von  $0,77 \mu\text{m}^2$  und unbehandelte Hunde von  $0,78 \mu\text{m}^2$ .

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der MEANAR für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurde die durchschnittliche Anschnittsfläche der einzelnen AgNORs pro Zellkern in Gruppen erfaßt. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einer MEANAR kleiner  $0,5 \mu\text{m}^2$ , die zweite Gruppe Lymphome mit einer MEANAR zwischen  $0,5 \mu\text{m}^2$  und  $1,0 \mu\text{m}^2$  und die letzte Gruppe Lymphome mit einer MEANAR größer  $1,0 \mu\text{m}^2$ .

Die erste Gruppe umfaßte 53 Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin hatten 36 Hunde maligne Lymphome mit einer MEANAR zwischen  $0,5 \mu\text{m}^2$  und  $1,0 \mu\text{m}^2$  und 33 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer MEANAR größer  $1,0 \mu\text{m}^2$ .

Von 30 unbehandelten Hunden hatten 10 Tiere maligne Lymphome mit einer MEANAR kleiner  $0,5 \mu\text{m}^2$ , 10 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer MEANAR zwischen  $0,5 \mu\text{m}^2$  und  $1,0 \mu\text{m}^2$  und 10 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer MEANAR größer  $1,0 \mu\text{m}^2$ . Die Überlebenszeiten für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur MEANAR sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) erfaßt. Die festgestellte positive Korrelation zwischen Überlebenszeit und der MEANAR für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphoma betrug für Pearson's  $r = 0,7400$  und für Spearman's  $\rho = 0,6583$  (siehe Diagramm 25).

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für MEANAR als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert von  $P = 0,024$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,013$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MEANAR zwischen  $0,5 \mu\text{m}^2$  und  $1,0 \mu\text{m}^2$  und  $P = 0,013$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MEANAR größer  $1,0 \mu\text{m}^2$ . Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer MEANAR, wobei die Hazard-Rate  $0,037$  bzw.  $0,039$  betrug und die Konfidenzintervalle sich zwischen  $0,008$  und  $0,16$  erstreckten. Damit war die MEANAR ein bedeutender prognostischer Parameter für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom.

Die Überlebenszeiten und krankheitsfreien Überlebenszeiten für behandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur MEANAR sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) erfaßt. In Diagramm 26 ist die MEANAR in  $\mu\text{m}^2$  von malignen Lymphomen im Verhältnis zur Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden dargestellt. Es wurde eine positive Korrelation für Pearson's  $r = 0,7793$  und für Spearman's  $\rho = 0,7154$  festgestellt.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 26) für MEANAR als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert  $P < 0,001$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,022$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MEANAR zwischen  $0,5 \mu\text{m}^2$  und  $1,0 \mu\text{m}^2$  und  $P < 0,001$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MEANAR größer  $1,0 \mu\text{m}^2$ . Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer MEANAR, wobei die Hazard-Rate  $0,406$  bzw.  $0,031$  mit sich erhöhender MEANAR betrug und die Konfidenzintervalle sich von  $0,187$  bzw.  $0,009$  bis zu  $0,880$  bzw.  $0,109$  erstreckten.

In Diagramm 27 ist die MEANAR in  $\mu\text{m}^2$  von malignen Lymphomen im Verhältnis zur krankheitsfreien Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden dargestellt. Es wurde eine positive Korrelation für Pearson's  $r = 0,6509$  und für Spearman's  $\rho = 0,6278$  festgestellt.

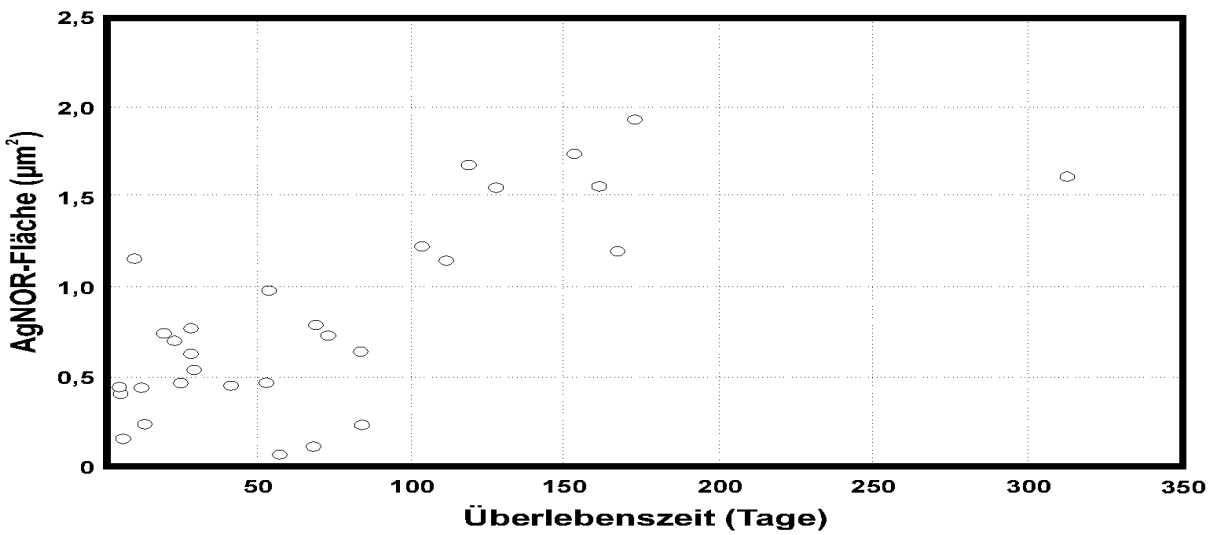


Diagramm 25: Korrelation zwischen der AgNOR-Fläche und der Überlebenszeit von unbehandelten Hunden

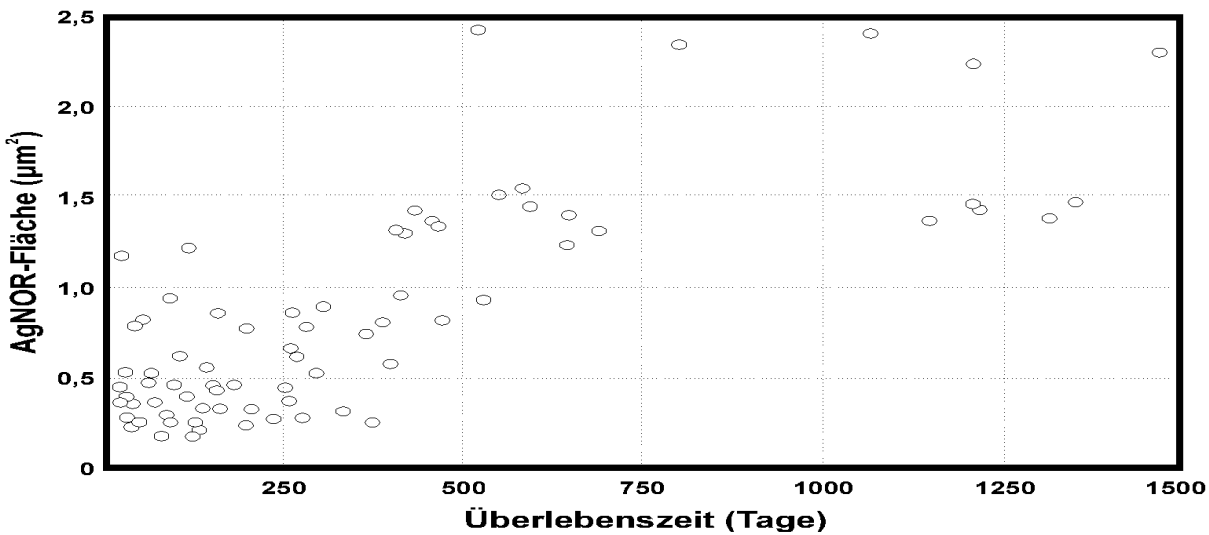


Diagramm 26: Korrelation zwischen der AgNOR-Fläche und der Überlebenszeit von behandelten Hunden

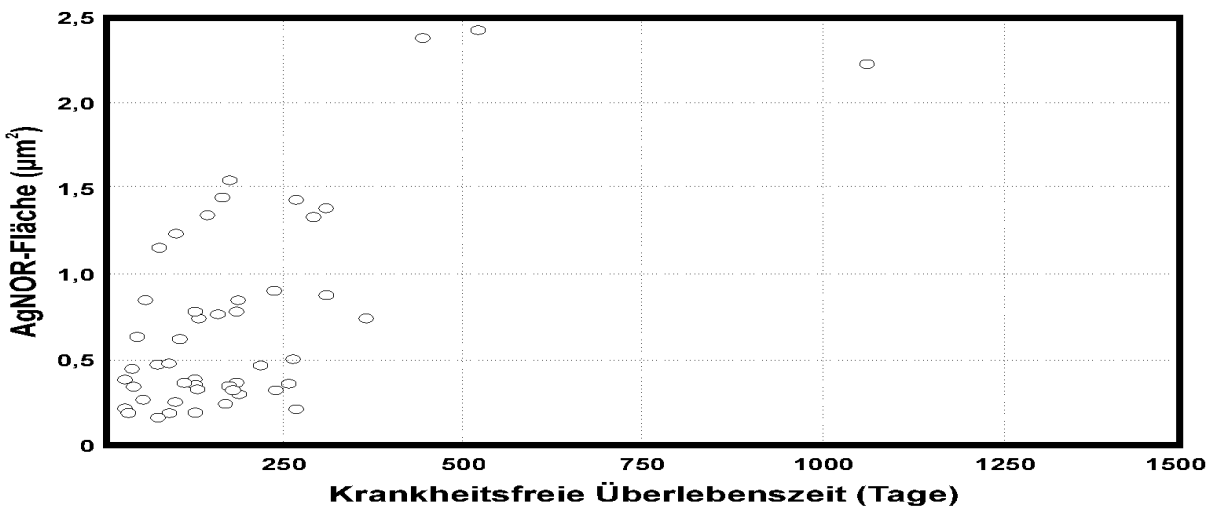


Diagramm 27: Korrelation zwischen der AgNOR-Fläche und der krankheitsfreien Überlebenszeit von behandelten Hunden

Tabelle 26: Resultate der univariaten Analyse für die AgNOR-Flächenparameter als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)			Überlebenszeit (n = 74)		
	P-Wert	Hazard-Rate	C-Intervall	P-Wert	Hazard-Rate	C-Intervall
S_AREA	0,075			0,074		
0 - 2,0000						
2,0001 - 3,0000	0,793	1,240		0,189	1,987	
3,0001 - 4,0000	0,586	1,564		0,349	1,632	
4,0001 - 5,0000	0,658	1,438		0,471	1,583	
> 5,0000	0,177	0,175		0,321	0,4579	
MEANAR	< 0,001			< 0,001		
0 - 0,5000						
0,5001 - 1,0000	0,014	0,2647	0,0916 - 0,7646	0,022	0,4060	0,1873 - 0,8802
> 1,0000	< 0,001	0,0760	0,0255 - 0,2267	< 0,001	0,0314	0,0090 - 0,1092
MAXNOR	0,002			< 0,001		
0 - 1,0000						
1,0001 - 1,5000	0,574	0,7783	0,3248 - 1,865	0,095	0,5625	0,2865 - 1,105
1,5001 - 2,0000	0,004	0,1797	0,0563 - 0,5732	< 0,001	0,1784	0,0714 - 0,4454
> 2,0000	0,003	0,1360	0,0357 - 0,5171	< 0,001	0,1161	0,0404 - 0,3334
AR-RAT	0,138			0,103		
0 - 110						
> 110	0,153	5,849		0,096	2,415	
SIZRAT	0,959			0,271		
0 - 10						
11 - 20	0,731	1,152		0,244	1,455	
21 - 30	0,733	0,8070		0,49	0,6879	
> 30	0,913	0,8650		0,322	0,5164	

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 26) für MEANAR als prognostischer Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert  $P < 0,001$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,014$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MEANAR zwischen  $0,5 \mu\text{m}^2$  und  $1,0 \mu\text{m}^2$  und  $P < 0,001$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MEANAR größer  $1,0 \mu\text{m}^2$ . Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer MEANAR, wobei die Hazard-Rate 0,265 bzw. 0,076 mit sich erhöhender MEANAR betrug und die Konfidenzintervalle sich von 0,092 bzw. 0,025 bis zu 0,765 bzw. 0,227 erstreckten.

In der multivariaten Analyse erwies sich die MEANAR als prognostisch signifikant für die Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden mit einem P-Wert  $P < 0,001$  (siehe Tabelle 27). Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen ebenfalls  $P < 0,001$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MEANAR zwischen  $0,5 \mu\text{m}^2$  und  $1,0 \mu\text{m}^2$  und für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MEANAR größer  $1,0 \mu\text{m}^2$ . Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer MEANAR, wobei die Hazard-Rate 0,105 bzw. 0,006 mit sich erhöhender MEANAR betrug und die Konfidenzintervalle sich von 0,028 bzw. 0,001 bis zu 0,385 bzw. 0,045 erstreckten.

Tabelle 27: Resultate der multivariaten Analyse für die AgNOR-Flächenparameter als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Überlebenszeit (n = 53)		
	P-Wert	Hazard-Rate	95% C-Intervall
S_AREA	0,003		
0 - 2,0000			
2,0001 - 3,0000	0,121	0,1994	0,0260 - 1,529
3,0001 - 4,0000	0,382	0,4430	0,0714 - 2,748
4,0001 - 5,0000	0,383	2,513	0,3169 - 19,92
> 5,0000	0,016	0,0414	0,0031 - 0,5480
MEANAR	< 0,001		
0 - 0,5000			
0,5001 - 1,0000	< 0,001	0,1053	0,0287 - 0,3859
> 1,0000	< 0,001	0,0058	0,0007 - 0,0453
AR-RAT	0,008		
0 - 110			
> 110	0,008	37,45	2,529 - 554,6

Weiterhin erwies sich die MEANAR in der multivariaten Analyse als prognostisch signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit einem P-Wert  $P = 0,003$  (siehe Tabelle 28). Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P < 0,001$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MEANAR zwischen  $0,5 \mu\text{m}^2$  und  $1,0 \mu\text{m}^2$  und  $P = 0,588$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MEANAR größer  $1,0 \mu\text{m}^2$ . Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer MEANAR, wobei die Hazard-Rate  $0,072$  bzw.  $0,519$  mit sich erhöhender MEANAR betrug und die Konfidenzintervalle sich von  $0,016$  bzw.  $0,048$  bis zu  $0,323$  bzw.  $5,564$  erstreckten. Allerdings war der P-Wert für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MEANAR größer  $1,0 \mu\text{m}^2$  nicht signifikant, so daß die Hazard-Rate für diese Gruppe nicht interpretiert werden kann.

Tabelle 28: Resultate der multivariaten Analyse für die AgNOR-Flächenparameter als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)		
	P-Wert	Hazard-Rate	95% C-Intervall
S_AREA	< 0,001		
0 - 2,0000			
2,0001 - 3,0000	0,002	0,0363	0,0046 - 0,2894
3,0001 - 4,0000	0,070	0,1699	0,0250 - 1,155
4,0001 - 5,0000	0,521	0,5246	0,0732 - 3,759
> 5,0000	0,001	0,0030	0,0001 - 0,1044
MEANAR	0,003		
0 - 0,5000			
0,5001 - 1,0000	< 0,001	0,0725	0,0163 - 0,3228

	> 1,0000	0,588	0,5192	0,0484 - 5,564
MAXNOR		0,010		
	0 - 1,0000			
	1,0001 - 1,5000	0,156	2,456	0,7095 - 8,500
	1,5001 - 2,0000	0,027	0,0569	0,0045 - 0,781
	> 2,0000	0,397	0,3414	0,0283 - 4,112

Diese Resultate demonstrieren deutlich, daß die MEANAR ein prognostisch signifikanter Parameter für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten und unbehandelten Hunden ist.

## S\_AREA

Die maximale S\_AREA betrug 8,07  $\mu\text{m}^2$  und die minimale S\_AREA 0,67  $\mu\text{m}^2$  in 122 untersuchten caninen malignen Lymphomen. Behandelte Hunde hatten eine durchschnittliche AgNOR-Fläche von 3,77  $\mu\text{m}^2$  und unbehandelte Hunde von 3,26  $\mu\text{m}^2$ .

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der S\_AREA für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurde durchschnittliche AgNOR-Summenfläche pro Zellkern in Gruppen erfaßt. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einer S\_AREA kleiner 2,0  $\mu\text{m}^2$ , die zweite Gruppe Lymphome mit einer S\_AREA zwischen 2,0  $\mu\text{m}^2$  und 3,0  $\mu\text{m}^2$ , die dritte Gruppe Lymphome mit einer S\_AREA zwischen 3,0  $\mu\text{m}^2$  und 4,0  $\mu\text{m}^2$ , die vierte Gruppe Lymphome mit einer S\_AREA zwischen 4,0  $\mu\text{m}^2$  und 5,0  $\mu\text{m}^2$  und die letzte Gruppe Lymphome mit einer S\_AREA größer 5,0  $\mu\text{m}^2$ .

Die erste Gruppe umfaßte 13 Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin hatten 36 Hunde maligne Lymphome mit einer S\_AREA zwischen 2,0  $\mu\text{m}^2$  und 3,0  $\mu\text{m}^2$ , 44 Hunde maligne Lymphome mit einer S\_AREA zwischen 3,0  $\mu\text{m}^2$  und 4,0  $\mu\text{m}^2$ , 15 Hunde maligne Lymphome mit einer S\_AREA zwischen 4,0  $\mu\text{m}^2$  und 5,0  $\mu\text{m}^2$  und 14 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer S\_AREA größer 5,0  $\mu\text{m}^2$ .

Von 30 unbehandelten Hunden hatten 3 Tiere maligne Lymphome mit einer S\_AREA kleiner 2,0  $\mu\text{m}^2$ , 5 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer S\_AREA zwischen 2,0  $\mu\text{m}^2$  und 3,0  $\mu\text{m}^2$ , 12 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer S\_AREA zwischen 3,0  $\mu\text{m}^2$  und 4,0  $\mu\text{m}^2$ , 6 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer S\_AREA zwischen 4,0  $\mu\text{m}^2$  und 5,0  $\mu\text{m}^2$  und 4 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer S\_AREA größer 5,0  $\mu\text{m}^2$ . Die Überlebenszeiten für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur S\_AREA sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für S\_AREA als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,123$ ). Die P-Werte zwischen den Gruppen variierten zwischen  $P = 0,106$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer S\_AREA größer 5,0  $\mu\text{m}^2$  und  $P = 0,854$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer S\_AREA zwischen 3,0  $\mu\text{m}^2$  und 4,0  $\mu\text{m}^2$ . Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer S\_AREA, wobei die Hazard-Rate zwischen 2,813 und 26,089 für die verschiedenen Gruppen betrug. Allerdings sind diese Werte irrelevant, da die S\_AREA nicht signifikant für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom war.

Die Überlebenszeiten und die krankheitsfreien Überlebenszeiten für behandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur S\_AREA sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 26) für S\_AREA als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,074$ ). Die P-Werte zwischen den Gruppen variierten zwischen  $P = 0,189$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer S\_AREA zwischen 2,0  $\mu\text{m}^2$  und 3,0  $\mu\text{m}^2$  und  $P = 0,471$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer S\_AREA zwischen 4,0  $\mu\text{m}^2$  und 5,0  $\mu\text{m}^2$ . Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer S\_AREA, wobei die Hazard-Rate zwischen 0,458 und 1,987 für die verschiedenen Gruppen betrug. Allerdings sind diese Werte irrelevant, da die S\_AREA nicht signifikant für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom war.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 26) für S\_AREA als prognostischer Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,075$ ). Die P-Werte zwischen den Gruppen variierten zwischen  $P = 0,177$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer S\_AREA größer 5,0  $\mu\text{m}^2$  und  $P = 0,793$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer S\_AREA zwischen 2,0  $\mu\text{m}^2$  und 3,0  $\mu\text{m}^2$ . Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer S\_AREA, wobei die Hazard-Rate zwischen 0,175 und 1,564 für die verschiedenen Gruppen betrug. Allerdings sind diese Werte irrelevant, da die S\_AREA nicht signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom war.

In der multivariaten Analyse erwies sich die S\_AREA als prognostisch signifikant für die Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden mit einem P-Wert  $P = 0,003$  (siehe Tabelle 27). Der P-Wert für Hunde mit malignem Lymphom mit einer S\_AREA größer 5,0  $\mu\text{m}^2$  betrug  $P = 0,016$ . Die P-Werte zwischen den anderen Gruppen waren nicht signifikant und betragen zwischen  $P = 0,121$  und  $P = 0,383$ . Die Hazard-Rate variierte zwischen 0,199 und 0,041 für die signifikanten Gruppen und zwischen 0,443 und 2,513 für die anderen Gruppen. Die Konfidenzintervalle erstreckten sich von 0,026 bzw. 0,003 bis zu 1,529 bzw. 0,548 für die signifikanten Gruppen.

Weiterhin erwies sich die S\_AREA in der multivariaten Analyse als prognostisch signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit einem P-Wert  $P < 0,001$  (siehe Tabelle 28). Die signifikanten P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,002$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer S\_AREA zwischen 2,0  $\mu\text{m}^2$  und 3,0  $\mu\text{m}^2$  und  $P = 0,001$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer S\_AREA größer 5,0  $\mu\text{m}^2$ . Die anderen Gruppen hatten keine signifikanten P-Werte ( $P > 0,07$ ). Die Hazard-Rate zeigte ein leicht erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer S\_AREA, wobei die Hazard-Rate 0,036 bzw. 0,003 mit sich erhöhender S\_AREA für signifikante Gruppen betrug und die Konfidenzintervalle sich von 0,005 bzw. 0,001 bis zu 0,289 bzw. 0,104 erstreckten. Da die P-Werte für Hunde mit malignem Lymphom mit einer S\_AREA zwischen 3,0  $\mu\text{m}^2$  und 4,0  $\mu\text{m}^2$  und zwischen 4,0  $\mu\text{m}^2$  und 5,0  $\mu\text{m}^2$  nicht signifikant waren, konnte die Hazard-Rate für diese Gruppen nicht interpretiert werden.

Diese Resultate deuten darauf hin, daß eine kleine und große S\_AREA ein prognostisch signifikanter Parameter für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden ist.

## MAXNOR

Die maximale MAXNOR betrug 3,069  $\mu\text{m}^2$  und die minimale MAXNOR 0,430  $\mu\text{m}^2$  in 122 untersuchten caninen malignen Lymphomen. Behandelte Hunde hatten eine durchschnittliche MAXNOR von 1,351  $\mu\text{m}^2$  und unbehandelte Hunde von 1,953  $\mu\text{m}^2$ .

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der MAXNOR für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurde die Anschnittsfläche des größten AgNORs im Zellkern in Gruppen erfaßt. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einer MAXNOR kleiner 1,0  $\mu\text{m}^2$ , die zweite Gruppe Lymphome mit einer MAXNOR zwischen 1,0  $\mu\text{m}^2$  und 1,5  $\mu\text{m}^2$ , die dritte Gruppe Lymphome mit einer MAXNOR zwischen 1,5  $\mu\text{m}^2$  und 2,0  $\mu\text{m}^2$  und die letzte Gruppe Lymphome mit einer MAXNOR größer 2,0  $\mu\text{m}^2$ .

Die erste Gruppe umfaßte 30 Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin hatten 34 Hunde maligne Lymphome mit einer MAXNOR zwischen 1,0  $\mu\text{m}^2$  und 1,5  $\mu\text{m}^2$ , 30 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer MAXNOR zwischen 1,5  $\mu\text{m}^2$  und 2,0  $\mu\text{m}^2$  und 28 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer MAXNOR größer 2,0  $\mu\text{m}^2$ .

Die Überlebenszeiten für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur MAXNOR sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für MAXNOR als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab nur einen signifikanten P-Wert von  $P = 0,026$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR zwischen 1,5  $\mu\text{m}^2$  und 2,0  $\mu\text{m}^2$ . Die P-Werte zwischen den anderen Gruppen waren nicht signifikant und betragen  $P = 0,116$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR kleiner 1,0  $\mu\text{m}^2$ ,  $P = 0,206$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR zwischen 1,0  $\mu\text{m}^2$  und 1,5  $\mu\text{m}^2$  und  $P = 0,104$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR größer 2,0  $\mu\text{m}^2$ . Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer MAXNOR, wobei die Hazard-Rate zwischen 2,372 und 5,077 betrug und die Konfidenzintervalle sich zwischen 0,462 und 35,846 erstreckten. Allerdings waren die P-Werte für die meisten Gruppen nicht signifikant und somit kann die Hazard-Rate nicht interpretiert werden.

Die Überlebenszeiten und die krankheitsfreien Überlebenszeiten für behandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur MAXNOR sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 26) für MAXNOR als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert  $P < 0,001$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,095$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR zwischen 1,0  $\mu\text{m}^2$  und 1,5  $\mu\text{m}^2$  und  $P < 0,001$  für alle anderen Gruppen. Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer MAXNOR, wobei die sich die Hazard-Rate von 0,116 auf 0,562 mit kleiner werdender MAXNOR erhöhte und die Konfidenzintervalle sich von Werten zwischen 0,040 und 0,333 für eine MAXNOR größer 2,0  $\mu\text{m}^2$  bis zu Werten zwischen 0,286 und 1,105 für eine MAXNOR zwischen 1,0  $\mu\text{m}^2$  und 1,5  $\mu\text{m}^2$  erstreckten.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 26) für MAXNOR als prognostischer Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert  $P = 0,002$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,004$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR zwischen 1,5  $\mu\text{m}^2$  und 2,0  $\mu\text{m}^2$  und  $P = 0,003$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR größer 2,0  $\mu\text{m}^2$ . Der P-Wert für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR zwischen 1,0  $\mu\text{m}^2$  und 1,5  $\mu\text{m}^2$  war nicht signifikant ( $P = 0,574$ ). Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer MAXNOR, wobei die Hazard-Rate von 0,136 auf 0,1790 mit kleinerer MAXNOR anstieg und die Konfidenzintervalle sich von 0,036 bzw. 0,056 bis zu 0,517 bzw. 0,573 erstreckten. Die Hazard-Rate für die Gruppe von behandelten Hunden mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR zwischen 1,0  $\mu\text{m}^2$  und 1,5  $\mu\text{m}^2$  kann nicht bewertet werden, da der P-Wert nicht signifikant war.

In der multivariaten Analyse erwies sich die MAXNOR als prognostisch nicht signifikant für die Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden.

Dagegen zeigte sich die MAXNOR in der multivariaten Analyse als prognostisch signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit einem P-Wert  $P = 0,010$  (siehe Tabelle 28). Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,156$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR zwischen 1,0  $\mu\text{m}^2$  und 1,5  $\mu\text{m}^2$ ,  $P = 0,027$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR zwischen 1,5  $\mu\text{m}^2$  und 2,0  $\mu\text{m}^2$  und  $P = 0,397$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR größer 2,0  $\mu\text{m}^2$ . Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer MAXNOR, wobei die Hazard-Rate 0,057 für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR zwischen 1,5  $\mu\text{m}^2$  und 2,0  $\mu\text{m}^2$  betrug und das Konfidenzintervall sich von 0,005 bis zu 0,781 erstreckte. Die P-Werte für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXNOR zwischen 1,0  $\mu\text{m}^2$  und 1,5  $\mu\text{m}^2$  und mit einer MAXNOR größer 2,0  $\mu\text{m}^2$  waren nicht signifikant, so daß die Hazard-Rate für diese Gruppen nicht interpretiert werden kann.

Diese Resultate demonstrieren deutlich, daß MAXNOR ein prognostisch signifikanter Parameter für die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden ist. Eine größere Anzahl von untersuchten Fällen wäre nötig, um die Ergebnisse für die Überlebenszeit von behandelten und unbehandelten Hunden bewerten zu können.

## AR\_RAT

Die maximale AR\_RAT betrug 190 und die minimale AR\_RAT 25 in 122 untersuchten caninen malignen Lymphomen. Behandelte Hunde hatten eine durchschnittliche AR\_RAT von 78 und unbehandelte Hunde von 116,7.

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der AR\_RAT für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurde das Verhältnis der AgNOR Summenfläche (S\_AREA) zur Zellkernfläche in Gruppen erfaßt. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einer AR\_RAT kleiner 110 und die zweite Gruppe Lymphome mit einer AR\_RAT größer 110.

Die erste Gruppe umfaßte 97 Hunde mit malignem Lymphom und die zweite Gruppe 25 Hunde mit malignem Lymphom.

Von 30 unbehandelten Hunden hatten 13 Tiere maligne Lymphome mit einer AR\_RAT kleiner 110 und 17 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer AR\_RAT größer 110. Die Überlebenszeiten für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur AR\_RAT sind in Tabelle 35

(siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für die AR\_RAT als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,232$ ). Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit kleinerer AR\_RAT, wobei die Hazard-Rate 0,600 betrug. Allerdings ist dieser Wert bedeutungslos, da die AR\_RAT nicht signifikant für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom war.

Die Überlebenszeiten und die krankheitsfreien Überlebenszeiten für behandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur AR\_RAT sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 26) für AR\_RAT als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,103$ ). Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer AR\_RAT, wobei die Hazard-Rate 2,415 betrug. Allerdings ist dieser Wert bedeutungslos, da die AR\_RAT nicht signifikant für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom war.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 26) für AR\_RAT als prognostischer Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,138$ ). Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer AR\_RAT, wobei die Hazard-Rate 5,849 betrug. Allerdings ist dieser Wert bedeutungslos, da die AR\_RAT nicht signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom war.

In der multivariaten Analyse erwies sich die AR\_RAT als prognostisch signifikant für die Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden mit einem P-Wert  $P < 0,008$ . Die Hazard-Rate zeigte ein stark erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer AR\_RAT, wobei die Hazard-Rate 37,45 betrug und das Konfidenzintervall sich von 2,524 bis zu 554,6 erstreckte.

Die AR\_RAT war nicht prognostisch signifikant in der multivariaten Analyse für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden.

Die AR\_RAT ist ein prognostisch signifikanter Parameter für die Überlebenszeit von behandelten Hunden. Weitergehende Studien sind notwendig, um diese Aussage zu bekräftigen.

## SIZRAT

Die maximale SIZRAT betrug 121 und die minimale SIZRAT 5 in 122 untersuchten caninen malignen Lymphomen. Behandelte Hunde hatten eine durchschnittliche SIZRAT von 15,5 und unbehandelte Hunde von 33,5.

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der SIZRAT für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurde das Verhältnis der AgNOR-Fläche (MEANAR) zur Zellkernfläche in Gruppen erfaßt. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einer SIZRAT kleiner 10, die zweite Gruppe Lymphome mit einer SIZRAT zwischen 10 und 20, die dritte Gruppe Lymphome mit einer SIZRAT zwischen 20 und 30 und die letzte Gruppe Lymphome mit einer SIZRAT größer 30.

Die erste Gruppe umfaßte 41 Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin hatten 32 Hunde maligne Lymphome mit einer SIZRAT zwischen 10 und 20, 23 Hunde maligne Lymphome mit einer SIZRAT zwischen 20 und 30 und 26 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer SIZRAT größer 30.

Von 30 unbehandelten Hunden hatte kein Tier ein malignes Lymphom mit einer SIZRAT kleiner 10, 2 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer SIZRAT zwischen 10 und 20, 10 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer SIZRAT zwischen 20 und 30 und 18 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer SIZRAT größer 30. Die Überlebenszeiten für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur SIZRAT sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für SIZRAT als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,204$ ). Die P-Werte zwischen den Gruppen betrugen  $P = 0,183$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer SIZRAT zwischen 20 und 30 und  $P = 0,133$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer SIZRAT größer 30. Die Hazard-Rate hatte Werte von 2,988 bzw. 1,954, was auf ein erhöhtes Überlebensrisiko mit größerer SIZRAT hindeutet. Allerdings sind diese Werte nicht interpretierbar, da die SIZRAT nicht signifikant für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom war.

Die Überlebenszeiten und die krankheitsfreien Überlebenszeiten für behandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur SIZRAT sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 26) für SIZRAT als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,271$ ). Die P-Werte zwischen den Gruppen variierten von  $P = 0,224$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer SIZRAT zwischen 10 und 20 und  $P = 0,49$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer SIZRAT zwischen 20 und 30. Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer SIZRAT, wobei die Hazard-Rate zwischen 1,455 und 0,516 variierte. Allerdings sind diese Werte nicht interpretierbar, da die SIZRAT nicht signifikant für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom war.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 26) für SIZRAT als prognostischer Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,959$ ). Die P-Werte zwischen den Gruppen variierten von  $P = 0,731$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer SIZRAT zwischen 10 und 20 und  $P = 0,931$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer SIZRAT größer 30. Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer SIZRAT, wobei die Hazard-Rate zwischen 0,807 und 1,152 variierte. Diese Werte sind nicht interpretierbar, da die SIZRAT nicht signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom war.

In der multivariaten Analyse erwies sich die SIZRAT als prognostisch nicht signifikant für die Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden.

Diese Resultate demonstrieren deutlich, daß die SIZRAT kein prognostisch signifikanter Parameter für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten und unbehandelten Hunden ist.



Erfassung der AgNOR-Lokalisation

Die Lokalisation der AgNORs wurde mittels Mikroskopbildanalyse (siehe Anhang Abb. 24 bis 27) durch folgende Parameter erfaßt:

CENTER beschreibt die Anzahl der zentral im Zellkern gelegenen AgNORs pro Zellkern für 100 Zellen. BORDER charakterisiert die Anzahl der randständig gelegenen AgNORs pro Zellkern für 100 Zellen. LOCAT beschreibt die Position der AgNORs zwischen Schwerpunkt und Kernmembran für 100 Zellen und MAXDIST das maximale Distanzmaß zweier AgNORs im Zellkern für 100 Zellen.

CENTER

Die maximale CENTER betrug 1,34 und die minimale CENTER 0,24 in 122 untersuchten caninen malignen Lymphomen. Behandelte Hunde hatten eine durchschnittliche Anzahl von zentral im Zellkern gelegenen AgNORs von 0,62 und unbehandelte Hunde von 0,51.

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der CENTER für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurde die Anzahl der zentral im Zellkern gelegenen AgNORs in Gruppen erfaßt. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einer CENTER kleiner 0,4, die zweite Gruppe Lymphome mit einer CENTER zwischen 0,4 und 0,6, die dritte Gruppe Lymphome mit einer CENTER zwischen 0,6 und 0,8 und die letzte Gruppe Lymphome mit einer CENTER größer 0,8.

Die erste Gruppe umfaßte 22 Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin hatten 53 Hunde maligne Lymphome mit einer CENTER zwischen 0,4 und 0,6, 30 Hunde maligne Lymphome mit einer CENTER zwischen 0,6 und 0,8 und 17 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer CENTER größer 0,8.

Von 30 unbehandelten Hunden hatten 13 Tiere maligne Lymphome mit einer CENTER kleiner 0,4, 14 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer CENTER zwischen 0,4 und 0,6 und 3 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer CENTER zwischen 0,6 und 0,8. Keiner dieser unbehandelten Hunde hatte ein malignes Lymphom mit einer CENTER größer 0,8. Die Überlebenszeiten für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur CENTER sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für CENTER als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert (P = 0,981). Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen P = 0,897 für Hunde mit malignem Lymphom mit einer CENTER zwischen 0,4 und 0,6 und P = 0,847 für Hunde mit malignem Lymphom mit einer CENTER zwischen 0,6 und 0,8. Die Hazard-Rate betrug 0,9174 bzw. 0,878. Damit ergab sich keine Signifikanz der CENTER für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom.

Die Überlebenszeiten und die krankheitsfreien Überlebenszeiten für behandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur CENTER sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 29) für CENTER als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert (P = 0,437). Die P-Werte zwischen den Gruppen variierten zwischen P = 0,271 für Hunde mit malignem Lymphom mit einer CENTER größer 0,8 und P = 0,812 für Hunde mit malignem Lymphom mit einer CENTER zwischen 0,6 und 0,8. Die Hazard-Rate variierte zwischen 0,518 und 0,882. Diese Werte sind nicht interpretierbar, da die CENTER nicht signifikant für die Überlebenszeit von 74 Hunden war.

Tabelle 29: Resultate der univariaten Analyse für die AgNOR-Verteilung als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)			Überlebenszeit (n = 74)		
	P-Wert	Hazard-Rate	C-Intervall	P-Wert	Hazard-Rate	C-Intervall
CENTER	0,490			0,437		
0 - 0,40						
0,41 - 0,60	0,551	0,6546		0,273	0,5937	
0,61 - 0,80	0,917	1,084		0,812	0,8822	
> 0,80	0,452	0,5163		0,271	0,5180	
BORDER	0,217			0,327		
0 - 0,75						
0,76 - 1,50	0,069	2,666		0,156	1,750	
1,51 - 2,25	0,222	1,891		0,128	1,707	
> 2,25	0,103	2,776		0,191	2,031	
LOCAT	0,210			0,019		

	0 - 0,475				
	0,476 - 0,550	0,708	1,278	0,289	1,713
	> 0,550	0,126	2,209	0,017	3,017
MAXDIST		0,302		0,224	
	0 - 0,425				
	0,426 - 0,500	0,155	2,718	0,135	2,108
	0,501 - 0,575	0,093	3,068	0,056	2,506
	> 0,575	0,149	2,743	0,139	2,140

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 29) für CENTER als prognostischer Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,490$ ). Die P-Werte zwischen den Gruppen variierten zwischen  $P = 0,452$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer CENTER größer 0,8 und  $P = 0,917$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer CENTER zwischen 0,6 und 0,8. Die Hazard-Rate variierte zwischen 0,516 und 1,084. Diese Werte sind nicht interpretierbar, da die CENTER nicht signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 Hunden war.

Diese Resultate demonstrieren deutlich, daß die CENTER kein prognostisch signifikanter Parameter für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten und unbehandelten Hunden ist.

## BORDER

Die maximale BORDER betrug 2,82 und die minimale BORDER 0,16 in 122 untersuchten caninen malignen Lymphomen. Behandelte Hunde hatten eine durchschnittliche Anzahl von randständig gelegenen AgNORs von 1,49 und unbehandelte Hunde von 1,60.

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der BORDER für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurde die Anzahl von randständig gelegenen AgNORs pro Zellkern in Gruppen erfaßt. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einer BORDER kleiner 0,75, die zweite Gruppe Lymphome mit einer BORDER zwischen 0,75 und 1,5, die dritte Gruppe Lymphome mit einer BORDER zwischen 1,5 und 2,25 und die letzte Gruppe Lymphome mit einer BORDER größer 2,25

Die erste Gruppe umfaßte 18 Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin hatten 38 Hunde maligne Lymphome mit einer BORDER zwischen 0,75 und 1,5, 53 Hunde maligne Lymphome mit einer BORDER zwischen 1,5 und 2,25 und 13 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer BORDER größer 2,25.

Von 30 unbehandelten Hunden hatte kein Tier ein malignes Lymphom mit einer BORDER kleiner 0,75, 15 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer BORDER zwischen 0,75 und 1,5, 14 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer BORDER zwischen 1,5 und 2,25 und 1 Hund hatte ein malignes Lymphom mit einer BORDER größer 2,25. Die Überlebenszeiten für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur BORDER sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für BORDER als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert von  $P = 0,023$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,167$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer BORDER zwischen 1,5 und 2,25 und  $P = 0,815$  für einen Hund mit malignem Lymphom mit einer BORDER größer 2,25. Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer BORDER, wobei die Hazard-Rate 0,216 bzw. 0,779 betrug. Die Werte für den einzelnen Hund können nicht bewertet werden. Eine Signifikanz der BORDER für die Überlebenszeit von unbehandelten Hunden muß durch weitergehende Studien bestätigt werden.

Die Überlebenszeiten und die krankheitsfreien Überlebenszeiten für behandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur BORDER sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 29) für BORDER als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,327$ ). Die P-Werte zwischen den Gruppen variierten zwischen  $P = 0,128$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer BORDER zwischen 1,5 und 2,25 und  $P = 0,191$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer BORDER größer 2,25. Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer BORDER, wobei die Hazard-Rate zwischen 1,750 und 2,031 variierte. Allerdings sind diese Werte nicht interpretierbar, da die BORDER nicht signifikant für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom war.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 29) für BORDER als prognostischer Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,217$ ). Die P-Werte zwischen den Gruppen variierten zwischen  $P = 0,069$  für Hunde mit malignem Lymphom einer BORDER zwischen 0,75 und 1,5 und  $P = 0,222$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer BORDER zwischen 1,5 und 2,25. Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer BORDER, wobei die Hazard-Rate zwischen 1,891 und 2,776 variierte. Allerdings sind diese Werte nicht interpretierbar, da die BORDER nicht signifikant für die Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom war.

In der multivariaten Analyse erwies sich die BORDER als prognostisch nicht signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden.

Diese Resultate zeigen, daß die BORDER kein prognostisch signifikanter Parameter für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden ist.

## LOCAT

Die maximale LOCAT betrug 0,68 und die minimale LOCAT 0,38 in 122 untersuchten caninen malignen Lymphomen. Behandelte Hunde hatten eine durchschnittliche LOCAT von 0,56 und unbehandelte Hunde von 0,59.

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der LOCAT für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurde die Position der AgNORs zwischen Kernmembran und Schwerpunkt in Gruppen erfaßt. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einer LOCAT kleiner 0,475, die zweite Gruppe Lymphome mit einer LOCAT zwischen 0,475 und 0,55 und die letzte Gruppe Lymphome mit einer LOCAT größer 0,55.

Die erste Gruppe umfaßte 12 Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin hatten 26 Hunde maligne Lymphome mit einer LOCAT zwischen 0,475 und 0,55 und 84 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer LOCAT größer 0,55.

Von 30 unbehandelten Hunden hatte kein Tier ein malignes Lymphom mit einer LOCAT kleiner 0,475, 7 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer LOCAT zwischen 0,475 und 0,55 und 23 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer LOCAT größer 0,55. Die Überlebenszeiten für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur LOCAT sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für die LOCAT als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert von  $P = 0,047$ . Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer LOCAT, wobei die Hazard-Rate 0,388 betrug und das Konfidenzintervall sich zwischen 0,1524 und 0,989 erstreckte. Damit ist eine LOCAT ein prognostischer Parameter für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom. Die niedrige Signifikanz verlangt eine weitergehende Untersuchung.

Die Überlebenszeiten und die krankheitsfreien Überlebenszeiten für behandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur LOCAT sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 29) für die LOCAT als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert  $P = 0,019$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,289$  für Hunde mit malignem Lymphom einer LOCAT zwischen 0,475 und 0,55 und  $P = 0,017$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer LOCAT größer 0,55. Die Hazard-Rate zeigte ein deutlich erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer LOCAT, wobei die Hazard-Rate 1,713 bzw. 3,071 mit sich erhöhender LOCAT betrug und die Konfidenzintervalle sich von 0,633 bzw. 1,222 bis zu 4,640 bzw. 7,451 erstreckten.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 29) für die LOCAT als prognostischer Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,210$ ). Die P-Werte zwischen den Gruppen variierten zwischen  $P = 0,126$  für Hunde mit malignem Lymphom einer LOCAT größer 0,55 und  $P = 0,708$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer LOCAT zwischen 0,475 und 0,55. Die Hazard-Rate variierte zwischen 1,278 und 2,209, was auf ein erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom größerer LOCAT hindeutet. Allerdings sind diese Werte nicht interpretierbar, da die LOCAT nicht signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom war.

In der multivariaten Analyse erwies sich die LOCAT als prognostisch nicht signifikant für die Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden und für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden

Diese Resultate deuten an, daß die LOCAT eine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit von behandelten Hunden hat. Weitergehende Untersuchungen sind notwendig, um diese Resultate zu bestätigen.

## MAXDIST

Die maximale MAXDIST betrug 0,657 und die minimale MAXDIST 0,248 in 122 untersuchten caninen malignen Lymphomen. Behandelte Hunde hatten eine durchschnittliche MAXDIST von 0,516 und unbehandelte Hunde von 0,563.

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung der MAXDIST für die Überlebensparameter von unbehandelten und behandelten Hunden wurde das maximale Distanzmaß zweier AgNORs im Zellkern in Gruppen erfaßt. Die erste Gruppe enthielt Lymphome mit einer MAXDIST kleiner 0,425, die zweite Gruppe Lymphome mit einer MAXDIST zwischen 0,425 und 0,5, die dritte Gruppe Lymphome mit einer MAXDIST zwischen 0,5 und 0,575 und die letzte Gruppe Lymphome mit einer MAXDIST größer 0,575.

Die erste Gruppe umfaßte 10 Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin hatten 22 Hunde maligne Lymphome mit einer MAXDIST zwischen 0,425 und 0,5, 60 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer MAXDIST zwischen 0,5 und 0,575, und 30 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer MAXDIST größer 0,575.

Von 30 unbehandelten Hunden hatte kein Tier ein malignes Lymphom mit einer MAXDIST kleiner 0,425, 3 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer MAXDIST zwischen 0,425 und 0,5, 15 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer MAXDIST zwischen 0,5 und 0,575, und 12 Hunde hatten maligne Lymphome mit einer MAXDIST größer 0,575. Die Überlebenszeiten für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur MAXDIST sind in Tabelle 35 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Anhang Tabelle 32) für MAXDIST als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab einen signifikanten P-Wert von  $P = 0,025$ . Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P = 0,079$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXDIST zwischen 0,5 und 0,575 und  $P = 0,010$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXDIST größer 0,575. Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer MAXDIST, wobei die Hazard-Rate 2,784 bzw. 3,030 betrug und die Konfidenzintervalle sich zwischen 1,048 und 7,344 bzw. 0,8 und 11,476 erstreckten. Damit ist die MAXDIST ein signifikanter prognostischer Parameter für die Überlebenszeit von 30 unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom.

Die Überlebenszeiten und die krankheitsfreien Überlebenszeiten für behandelte Hunde mit malignem Lymphom in Korrelation zur MAXDIST sind in Tabelle 36 (siehe Anhang) erfaßt.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 29) für MAXDIST als prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,224$ ) für Hunde mit malignem Lymphom. Die P-Werte zwischen den Gruppen variierten zwischen  $P = 0,005$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXDIST zwischen 0,5 und 0,575 und  $P = 0,139$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXDIST größer 0,575. Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer MAXDIST, wobei die Hazard-Rate zwischen 2,108 und 2,506 variierte. Diese Werte sind nicht beurteilbar, da die MAXDIST nicht signifikant für die

Überlebenszeit von 74 behandelten Hunden war.

Die univariate Analyse (siehe Tabelle 29) für MAXDIST als prognostischer Faktor für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab keinen signifikanten P-Wert ( $P = 0,302$ ). Die P-Werte zwischen den Gruppen variierten von  $P = 0,093$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXDIST zwischen 0,5 und 0,575 und  $P = 0,155$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXDIST zwischen 0,425 und 0,5. Die Hazard-Rate zeigte ein erhöhtes krankheitsfreies Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer MAXDIST, wobei die Hazard-Rate zwischen 2,718 und 3,068 variierte. Diese Werte sind nicht beurteilbar, da die MAXDIST nicht signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden war.

In der multivariaten Analyse erwies sich die MAXDIST als prognostisch signifikant für die Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden mit einem P-Wert  $P = 0,009$  (siehe Tabelle 30). Die P-Werte zwischen den Gruppen betragen  $P < 0,001$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXDIST zwischen 0,425 und 0,5,  $P = 0,005$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXDIST zwischen 0,5 und 0,575 und  $P = 0,039$  für Hunde mit malignem Lymphom mit einer MAXDIST größer 0,575. Die Hazard-Rate zeigte ein stark erhöhtes Überlebensrisiko für Hunde mit malignem Lymphom mit größerer MAXDIST, wobei die Hazard-Rate zwischen 6,278 und 13,16 variierte und die Konfidenzintervalle sich von 1,100 bis zu 58,74 erstreckten.

Die MAXDIST erwies sich in der multivariaten Analyse als prognostisch nicht signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit von 48 behandelten Hunden.

Die MAXDIST ist ein prognostisch signifikanter Parameter für die Überlebenszeit von behandelten und unbehandelten Hunden.

Tabelle 30: Resultate der multivariaten Analyse für die AgNOR-Verteilung als prognostischer Faktor für behandelte Hunde mit malignem Lymphom

Merkmal	Überlebenszeit (n = 53)		
	P-Wert	Hazard-Rate	95% C-Intervall
MAXDIST	0,009		
0 - 0,425			
0,426 - 0,500	< 0,001	13,16	2,950 - 58,74
0,501 - 0,575	0,005	10,64	2,012 - 56,32
> 0,575	0,039	6,278	1,100 - 35,82

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 5.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Überlebenszeit behandelter Hunde war signifikant länger als die Überlebenszeit un behandelter Hunde, und auch die krankheitsfreie Überlebenszeit behandelter Hunde war signifikant länger als die Überlebenszeit un behandelter Hunde (siehe Diagramm 28 bis 29).

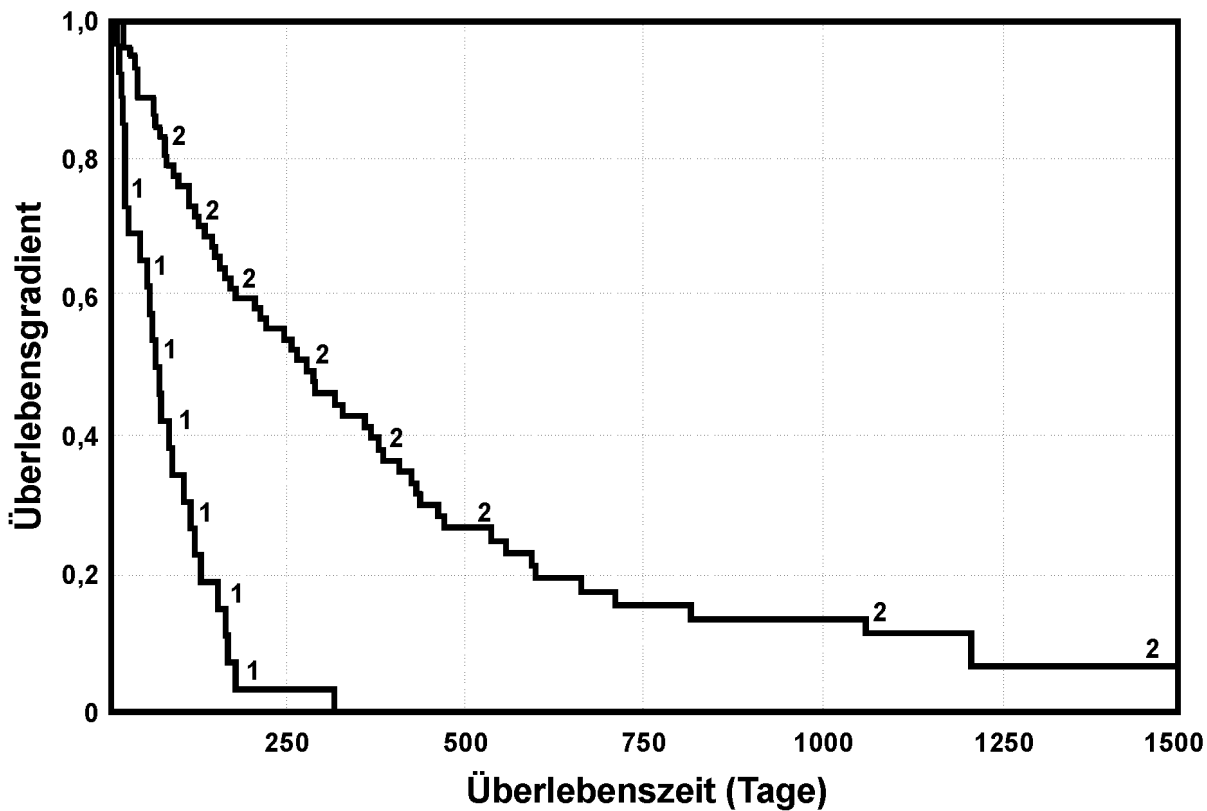


Diagramm 28: Kaplan-Meyer-Kurve der Überlebenszeit behandelter (2) und unbehandelter (1) Hunde

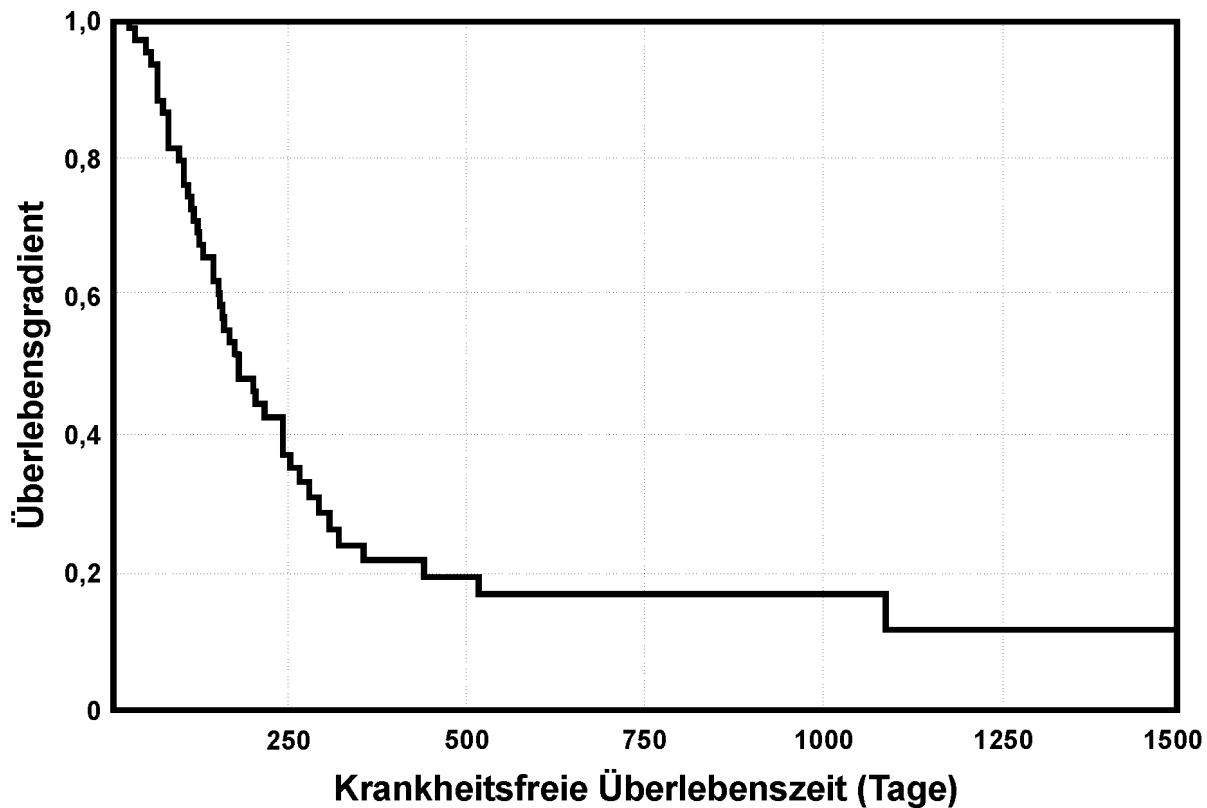


Diagramm 29: Kaplan-Meyer-Kurve der krankheitsfreien Überlebenszeit behandelter Hunde

Für 30 unbehandelte Hunde ergaben sich folgende Ergebnisse in der univariaten Analyse:

1. Das Alter, das Geschlecht, die Masse, das klinische Stadium, der histomorphologische Malignitätsgrad (Kiel-Klassifikation, Working Formulation) und die Mitoserate hatten keine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit.

2. Die durchschnittliche AgNOR-Anzahl (**NORNBC**) pro Zellkern ( $P < 0,001$ ), die durchschnittliche AgNOR-Fläche (**MEANAR**) pro Zellkern ( $P = 0,02$ ), die Lokalisation von AgNORs (**LOCAT**) im Zellkern ( $P = 0,048$ ), die Anzahl der randständigen AgNORs (**BORDER**) im Zellkern ( $P = 0,027$ ) und der **AgNOR-Typ** ( $P = 0,004$ ) waren die wichtigsten prognostischen Parameter mit signifikanten Unterschieden zwischen allen Gruppen. Dies traf auf die visuell ermittelte AgNOR-Anzahl ( $P = 0,004$ ) und die mit der Mikroskopbildanalyse ermittelte AgNOR-Anzahl (NORNBC) zu.

3. Weitere Parameter waren prognostisch signifikant für die Überlebenszeit von einzelnen Gruppen von unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom:

1. Der Anteil **PCNA**-positiver Zellen ( $P = 0,001$ ), wobei dies nur für Lymphome mit einem Anteil PCNA-positiver Zellen weniger als 20%, zwischen 20% und 40% und zwischen 40% und 60% galt.
2. Der Anteil **Ki-67**-positiver Zellen ( $P = 0,001$ ), wobei dies nur für Lymphome mit einem Anteil Ki-67-positiver Zellen weniger als 20%, zwischen 20% und 40% und zwischen 40% und 60% galt.
3. Die maximale Distanz (**MAXDIST**) zwischen zwei AgNORs im Zellkern ( $P = 0,025$ ) mit einer signifikanten Differenz für Lymphome mit einer Distanz zwischen 0,425 und 0,5 und Lymphome mit einer Distanz größer 0,575.
4. Die maximale AgNOR-Fläche (**MAXNOR**) pro Zellkern hatte nur einen signifikanten Wert ( $P = 0,026$ ) für Lymphome mit Flächen kleiner  $1,0 \mu\text{m}^2$  und zwischen  $1,5 \mu\text{m}^2$  und  $2,0 \mu\text{m}^2$ . Allerdings hatte nur ein Hund ein malignes Lymphom mit einer MAXNOR kleiner  $1,0 \mu\text{m}^2$ .

4. Alle anderen untersuchten AgNOR-Parameter hatten keine prognostische Signifikanz.

Für 74 behandelte Hunde ergaben sich folgende Ergebnisse bei der Analyse prognostischer Faktoren für die Überlebenszeit mittels uni- und multivariater Analyse:

1. Das Alter, das Geschlecht, die Masse, das klinische Stadium und der histomorphologische Malignitätsgrad (Kiel-Klassifikation, Working Formulation) hatten keine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit.
2. Der **Immunophänotyp** ( $P = 0,027$ ), die durchschnittliche AgNOR-Fläche (**MEANAR**) pro Zellkern ( $P < 0,001$ ), die maximale Distanz (**MAXDIST**) zwischen zwei AgNORs im Zellkern ( $P = 0,009$ ) und das Verhältnis der AgNOR-Summenfläche zur Zellkernfläche (**AR\_RAT**) mit  $P = 0,008$  waren die wichtigsten prognostischen Parameter für die Überlebenszeit mit signifikanten Unterschieden zwischen allen Gruppen basierend auf den Resultaten der multivariaten Analyse. Die unterschiedlichen Überlebenskurven für Hunde mit malignem Lymphom mit verschiedenem MEANAR sind im Diagramm 31 dargestellt.

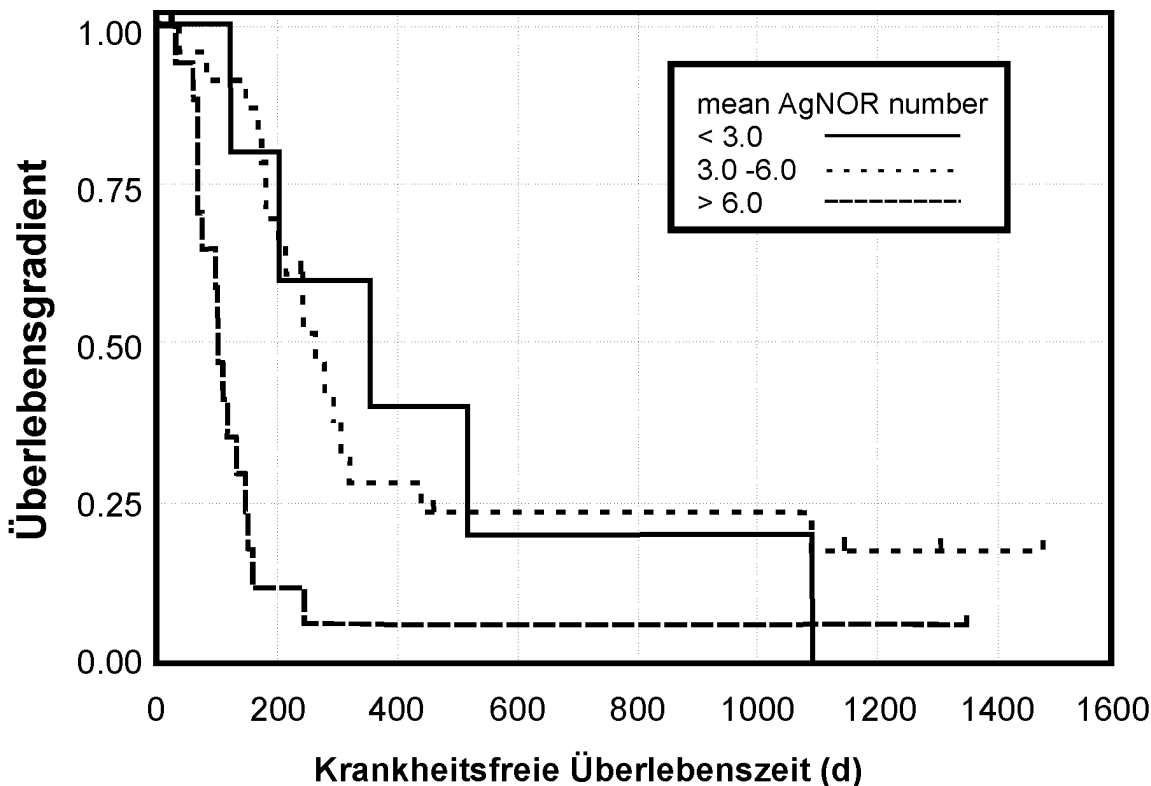


Diagramm 30: Kaplan-Meier-Kurve der krankheitsfreien Überlebenszeit behandelter Hunde bezogen auf die mittlere AgNOR-Anzahl



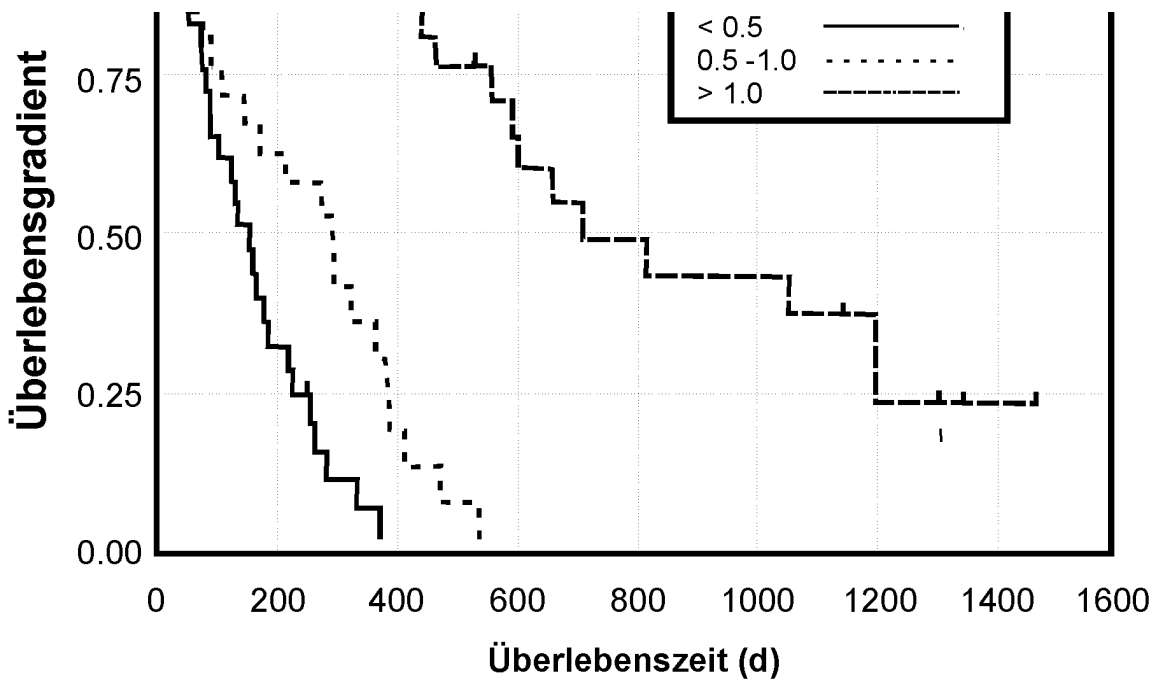


Diagramm 31: Kaplan-Meier-Kurve der Überlebenszeit behandelter Hunde bezogen auf die mittlere AgNOR-Fläche

3. Die AgNOR-Summenfläche (**S\_AREA**) pro Zellkern ( $P = 0,003$ ) mit einem signifikanten Unterschied zwischen Lymphomen mit einer S\_AREA kleiner  $2,0 \mu\text{m}^2$  und größer  $5,0 \mu\text{m}^2$  war ein weiterer prognostischer Parameter für die Überlebenszeit von einzelnen Gruppen von behandelten Hunden mit malignem Lymphom in der multivariaten Analyse.

4. Folgende Parameter erwiesen sich nur als signifikant für die Überlebenszeit in der univariaten Analyse:

1. Die **Mitoserate** ( $P = 0,028$ ) mit einer signifikanten Differenz zwischen Lymphomen mit einer Mitoserate kleiner 9 und größer 12 ( $P = 0,005$ ).
2. Der Anteil **PCNA**-positiver Zellen ( $P = 0,009$ ) mit einer signifikanten Differenz zwischen Lymphomen mit einem Anteil PCNA-positiver Zellen kleiner 20% und einem Anteil PCNA-positiver Zellen zwischen 40% und 60% bzw. größer 60%.
3. Der Anteil **Ki-67**-positiver Zellen ( $P = 0,087$ ) hatte nur einen signifikanten Wert für Lymphome mit einem Anteil Ki-67-positiver Zellen kleiner 20% und zwischen 40% und 60%.
4. Die durchschnittliche AgNOR-Anzahl (**NORNBC**) pro Zellkern ( $P < 0,001$ ) mit einer signifikanten Differenz zwischen Lymphomen mit einer NORNBC kleiner 3,0 und größer 6,0. Dies traf sowohl auf die visuell ermittelte AgNOR-Anzahl ( $P < 0,001$ ) als auch auf die mit der Mikroskopbildanalyse ermittelte AgNOR-Anzahl (NORNBC) zu.
5. Die maximale AgNOR-Fläche (**MAXNOR**) pro Zellkern ( $P < 0,001$ ) mit signifikanten Unterschieden zwischen Lymphomen mit einer MAXNOR kleiner  $1,0 \mu\text{m}^2$  und zwischen  $1,5 \mu\text{m}^2$  und  $2,0 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0,001$ ) bzw. größer  $2,0 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0,001$ ).
6. Die Lokalisation von AgNORs (**LOCAT**) im Zellkern ( $P = 0,019$ ) mit einer signifikanten Differenz zwischen Lymphomen mit einer LOCAT kleiner 0,475 und größer 0,55 ( $P = 0,017$ ).
7. Der **AgNOR-Typ** ( $P = 0,008$ ) mit einer signifikanten Differenz zwischen Lymphomen mit AgNOR-Typ 1 und Lymphomen mit AgNOR-Typ 4 ( $P = 0,007$ ) bzw. 5 ( $P = 0,007$ ).

5. Alle anderen untersuchten AgNOR-Parameter hatten keine prognostische Signifikanz für die Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom.

Für 48 behandelte Hunde ergaben sich folgende Ergebnisse bei der Analyse prognostischer Faktoren für die krankheitsfreie Überlebenszeit mittels uni- und multivariater Analyse:

1. Das Alter, das Geschlecht, die Masse, das klinische Stadium und der histomorphologische Malignitätsgrad (Kiel-Klassifikation, Working Formulation) hatten keine prognostische Bedeutung für die krankheitsfreie Überlebenszeit.
2. Die durchschnittliche AgNOR-Anzahl (**NORNBC**) pro Zellkern ( $P < 0,001$ ) war der wichtigste prognostische Parameter für die krankheitsfreie Überlebenszeit mit signifikanten Unterschieden zwischen allen Gruppen basierend auf den Resultaten der multivariaten Analyse. Die unterschiedlichen Überlebenskurven für Hunde mit malignem Lymphom mit verschiedenem NORNBC sind im Diagramm 30 dargestellt.
3. Weitere Parameter waren prognostisch signifikant basierend auf der multivariaten Analyse für die krankheitsfreie Überlebenszeit von einzelnen Gruppen von behandelten Hunden mit malignem Lymphom:
  1. Die durchschnittliche AgNOR-Fläche (**MEANAR**) pro Zellkern ( $P = 0,005$ ) mit einer signifikanten Differenz zwischen Lymphomen mit einer MEANAR kleiner  $0,5 \mu\text{m}^2$  und zwischen  $0,5 \mu\text{m}^2$  und  $1,0 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0,001$ ).
  2. Die AgNOR-Summenfläche (**S\_AREA**) pro Zellkern ( $P < 0,001$ ) mit signifikanten Unterschieden zwischen Lymphomen mit

einer S\_AREA kleiner  $2,0 \mu\text{m}^2$  und zwischen  $2,0 \mu\text{m}^2$  und  $3,0 \mu\text{m}^2$  ( $P = 0,002$ ) bzw. größer  $5,0 \mu\text{m}^2$  ( $P = 0,001$ ).

3. Die maximale AgNOR-Fläche (**MAXNOR**) pro Zellkern ( $P = 0,01$ ) mit einer signifikanten Differenz zwischen Lymphomen mit einer MAXNOR kleiner  $1,0 \mu\text{m}^2$  und einer MAXNOR zwischen  $1,5 \mu\text{m}^2$  und  $2,0 \mu\text{m}^2$  ( $P = 0,027$ ).

1. Folgende Parameter erwiesen sich als signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit in der univariaten Analyse:

1. Die durchschnittliche AgNOR-Fläche (**MEANAR**) pro Zellkern ( $P < 0,001$ ) mit signifikanten Unterschieden zwischen allen Gruppen im Gegensatz zu den Ergebnissen in der multivariaten Analyse.

2. Die durchschnittliche AgNOR-Anzahl (**NORNBC**) pro Zellkern ( $P < 0,001$ ) im Gegensatz zur multivariaten Analyse nur mit signifikantem Unterschied zwischen Lymphomen mit einer NORNBC kleiner 3,0 und größer 6,0 ( $P = 0,008$ ). Derselbe Unterschied bestand auch für die visuell bestimmte durchschnittliche AgNOR-Anzahl ( $P = 0,005$ ).

3. Die maximale AgNOR-Fläche (**MAXNOR**) pro Zellkern ( $P = 0,002$ ) mit vergleichbaren signifikanten Unterschieden wie in der multivariaten Analyse zwischen Lymphomen mit einer MAXNOR kleiner  $1,0 \mu\text{m}^2$  und einer MAXNOR zwischen  $1,5 \mu\text{m}^2$  und  $2,0 \mu\text{m}^2$  ( $P = 0,004$ ) bzw. größer  $2,0 \mu\text{m}^2$  ( $P = 0,003$ ).

4. Der **AgNOR-Typ** hatte nur einen signifikanten Wert ( $P = 0,012$ ) zwischen Lymphomen mit AgNOR-Typ 1 und 4.

5. Die **Mitoserate** hatte nur einen signifikanten Wert ( $P = 0,02$ ) zwischen Lymphomen mit einer Mitoserate kleiner 9 und größer 12.

2. Alle anderen untersuchten AgNOR-Parameter hatten keine prognostische Signifikanz für die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom.

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 6. Diskussion und Schlußfolgerungen

### 6.1. Prognostisch verwertbare Parameter

Canine maligne Lymphome wurden von verschiedenen Autoren in der Vergangenheit prognostisch bewertet (Squire et al. 1973, Carter et al. 1987, Greenlee et al. 1990, Capurro et al. 1992, McEwen et al. 1992, Teske et al. 1993d u.a.). Viele Studien wurden in ihrer Aussage durch eine inadäquate Anzahl von untersuchten Hunden, unvollständige Daten durch retrospektive Studien, verschiedene Therapietypen und den Mangel einer multivariaten Statistik beeinträchtigt.

Durch die Verwendung neuer histomorphologischer Klassifikationen, hauptsächlich durch Adaptation humaner Lymphom-Klassifikation (Carter et al. 1986, Baron et al. 1990, Greenlee et al. 1990) und den Nachweis ihrer Reproduzierbarkeit (Parodi et al. 1988), die Anwendung von kommerziell vertriebenen Antikörpern zur Bestimmung des Immunophänotyps von caninen Lymphomen (Ferrer et al. 1992, Moore et al. 1992) und den Einsatz von Proliferationsmarkern wie AgNORs (Bostock et al. 1989), PCNA (Simoes et al. 1994) und Ki-67 (Sarli et al. 1994) an caninen Tumoren haben sich neue Perspektiven ergeben.

In dieser Arbeit wurden eine univariate und eine multivariate Überlebensanalyse durchgeführt, um die prognostisch bedeutsamen Faktoren für die Therapie von caninen malignen Lymphomen aus einer Vielzahl von untersuchten Parametern zu ermitteln. Diese Parameter umfaßten ebenso klinische Werte wie histomorphologische Klassifikationen und verschiedene Proliferationsmarker einschließlich AgNORs. Als Vergleich wurde eine Gruppe von unbehandelten Hunden untersucht.

#### 6.1.1. Klinische Parameter

In dieser Arbeit wurde für das Alter, das Geschlecht, die Masse und das klinische Stadium keine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit von unbehandelten Hunden und für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom nachgewiesen.

Das Alter der untersuchten 122 Hunde variierte zwischen 3 und 13 Jahren und betrug durchschnittlich 7,6 Jahre. Diese Werte waren ähnlich für männliche und weibliche untersuchte Hunde. Das Alter hatte keine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit oder die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten und unbehandelten Hunden. Diese Resultate gleichen den Angaben früherer Studien (Bäckgren 1965, Dorn et al. 1967, Madewell 1986). Capurro et al. (1992) beschrieben die größte Erkrankungshäufigkeit für ein Alter von 6,6 bis 7,7 Jahren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

Weder die Masse noch das Geschlecht hatten eine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeiten behandelter und unbehandelter Hunde. Diese Werte bestätigen die Untersuchungen anderer Autoren (Carter et al. 1987, Hahn et al. 1992). Die Masse variierte zwischen 10 kg und 75 kg für die untersuchten 122 Hunde, wobei 36 Hunde eine Masse zwischen 31 kg und 40 kg hatten. Eine geschlechtsgebundene Disposition wurde von den meisten Autoren nicht festgestellt (Jarret et al. 1966, Gendron-Fitzpatrick 1986). Auch in dieser Arbeit konnte keine prognostische Signifikanz für das Geschlecht ermittelt werden. Nur in wenigen Untersuchungen wurde eine weibliche Dominanz beschrieben (Cohen et al. 1961, Van Pelt et Connor 1968). Diese Ergebnisse wurden in allen Arbeiten jüngerer Datums mit umfangreicher Überlebensstatistik (Greenlee et al. 1990, Hahn et al. 1992, Teske et al. 1993d) nicht bestätigt. In einer Arbeit von McEwen et al. (1987a) wurde eine kürzere Überlebenszeit für männliche als für weibliche Hunde beschrieben. Als mögliche Ursache wurden die Suppression von Immunglobulinen durch Androgene und die Promotion von T-Zell-Suppressor-Zellen vorgeschlagen (McEwen et al. 1987a). Beim Menschen wurden bei 52% der Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie östrogenrezeptoren nachgewiesen und bei 26% Progesteronrezeptoren. Dies könnte ebenfalls als Erklärung dienen. Allerdings wurden in caninen malignen Lymphomen noch keine östrogen- oder Progesteronrezeptoren nachgewiesen (Teske et al. 1993a, Vicini et al. 1991).

Das klinische Stadium gehört zu den wahrscheinlich am meisten diskutierten prognostischen Parametern. Insgesamt 47 der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hunde stammten aus Utrecht und waren Bestandteil früherer Untersuchungen von Teske et al. (1993d). Aus Cambridge waren 25 Hunde mit einem klinischen Stadium bewertet worden. Von diesen Hunden waren 20 chemotherapeutisch behandelt worden. Zur univariaten



und multivariaten Analyse standen für diese Arbeit letztlich insgesamt 54 Hunde mit einem klinischen Stadium zur Verfügung. Für diese Anzahl konnte keine prognostische Signifikanz des klinischen Stadiums für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit ermittelt werden. Eingeschränkt wird die Wertigkeit des klinischen Stadiums ohnehin durch den Umstand, daß die Mehrzahl der caninen malignen Lymphome den Stadien III, IV oder V zuzuordnen ist (Withrow et McEwen 1989). Die korrekte Einteilung extranodulärer Lymphome nach diesem Schema wird überdies bezweifelt (Couto 1985). Die meisten Untersuchungen konnten keine prognostische Signifikanz des klinischen Stadiums für die Überlebenszeit oder die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden nachweisen (Squire et al. 1973, Greenlee et al. 1990, McEwen et al. 1992). In einigen Arbeiten wurde eine bessere Prognose für Hunde mit malignem Lymphom im Stadium III gegenüber Stadien IV oder V gefunden (Cotter 1983, Carter et al. 1987). Teske et al. (1993d) führten eine univariate und multivariate Überlebensanalyse an 138 Hunden durch, wobei die multivariate Analyse 58 bzw. 46 Hunde für verschiedene Überlebensparameter umfaßte. Insgesamt 47 dieser untersuchten Hunde waren auch Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Das klinische Stadium wurde von Teske et al. (1993d) als ein signifikanter prognostischer Parameter in der univariaten Analyse sowohl für die Überlebenszeit als auch für die krankheitsfreie Überlebenszeit ermittelt. In der multivariaten Analyse ergab sich für Hunde mit malignem Lymphom im Stadium V eine deutlich schlechtere Prognose als für Hunde mit malignem Lymphom im Stadium III oder IV. Der Unterschied zwischen diesen Ergebnissen und den Resultaten dieser Arbeit mag sich aus der geringeren Anzahl von Hunden in dieser Arbeit ergeben. Der Einfluß eines unterschiedlichen Behandlungsprotokolls für eine kleine Gruppe von nur 7 Hunden mag zu einer Verzerrung der Ergebnisse geführt haben.

Die Beurteilung des klinischen Stadiums von Hunden mit malignem Lymphom muß kritisch betrachtet werden. Die limitierte Anzahl von Klassen für Hunde mit malignem Lymphom und die oft fehlenden Voraussetzungen einer exakten Beurteilung dieser Klassen auf Grund fehlender Knochenmarkbiopsate läßt das klinische Stadium als nur wenig geeigneten prognostischen Faktor erscheinen. Trotz allem sollte eine gründliche Untersuchung und der Versuch einer exakten Beurteilung des klinischen Stadiums der Behandlung caniner maligner Lymphome vorausgehen. Dies gewährleistet zumindest die Möglichkeit der Beurteilung des Krankheitsverlaufs während der Behandlung.

### 6.1.2. Histomorphologie

Weder für die Kiel-Klassifikation noch die Working Formulation ergab sich in dieser Arbeit eine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit von unbehandelten Hunden und für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom. Dagegen kommt dem Immunophänotyp eine entscheidende Bedeutung als prognostischer Marker für die Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom zu.

Die Kiel-Klassifikation und die Working Formulation konnten an Standardmaterial (formalinfixiert, Paraffineinbettung) zur Klassifikation caniner maligner Lymphome genutzt werden, wenn die Schnittdicke klein (3µm) gehalten wurde. Die Ergebnisse der zwei Blindversuche mit einem halben Jahr Abstand deckten sich mit nur wenigen Ausnahmen von Unterschieden in der Subklassifikation. Ein weiterer Vergleich war möglich zwischen der Klassifikation in dieser Arbeit und einer zuvor erfolgten Klassifikation in Utrecht. Die 47 aus Utrecht stammenden Lymphome wurden schon 2 Jahre zuvor von einer Gruppe von Veterinär- und Humanpathologen beurteilt (Teske 1993). Die Klassifizierung wurde an zytologischen Präparaten von Feinnadel-Aspiraten und an Semidünnschnitten in Plastikeinbettung vorgenommen. Ein Vergleich der Ergebnisse mit dieser Arbeit ergab eine Übereinstimmung von 42 Subtypen und 5 unterschiedlich bewertete Lymphome. Davon gehörten 4 der anders beurteilten Tumoren dem niedrigmalignen Typ und 1 Lymphom dem hochmalignen Typ an. Unterschiede bestanden nur in den Subtypen, eine Einordnung in eine andere Malignitätsgruppe kam nicht vor. Insgesamt waren 3 der niedrigmalignen Lymphome auch innerhalb der Utrechter Arbeitsgruppe unterschiedlich beurteilt worden. Das Endergebnis stützte sich auf die zytologische Bewertung. Da die Semidünnschnitte denselben Subtyp wie die eigenen Untersuchungen ergaben, erfolgte eine Festlegung des Typs nach den eigenen Resultaten. Das vierte niedrigmaligne Lymphom war auf Grund einer zu geringen Materialmenge anders bewertet worden. Hier wurde die Utrechter Klassifikation übernommen. Für das hochmaligne Lymphom bestanden unterschiedliche Auffassungen zum Grad der Polymorphie. Auch hier wurde der in Utrecht ermittelte Subtyp als endgültige Entscheidung übernommen.

Somit konnte die Eignung der Kiel-Klassifikation und der Working Formulation zur Beurteilung caniner maligner Lymphome in dieser Arbeit bestätigt werden, was sich mit den Ergebnissen von Parodi et al. (1988) deckt.

In den meisten Arbeiten anderer Autoren waren weder die Kiel-Klassifikation noch die Working Formulation von prognostischer Bedeutung (Weller et al. 1980a, Gray et al. 1984, Carter 1988, Greenlee et al. 1990). Nur in einer Untersuchung von Teske et al. (1993d) ergab sich eine prognostische Bedeutung beider Klassifikationen für unterschiedliche Überlebensparameter von Hunden mit malignem Lymphom. Hunde mit hochgradig malignem Lymphom der Kiel-Klassifikation zufolge hatten eine deutlich schlechtere Prognose für die krankheitsfreie Überlebenszeit als Hunde mit niedriggradig malignem Lymphom. Die Working Formulation ergab eine schlechtere Prognose für Hunde mit hochmalignem Lymphom für die gesamte Überlebenszeit. Diese Studie war die einzige Arbeit, in der eine multivariate Analyse durchgeführt wurde.

Im Gegensatz dazu ergab sich auch mit einer multivariaten Analyse in der vorliegenden Arbeit keine prognostische Bedeutung der Kiel-Klassifikation und der Working Formulation für die Überlebenszeit oder die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten oder unbehandelten Hunden. Ein Problem der Bewertung mag das unterschiedliche chemotherapeutische Behandlungsprotokoll zwischen Hunden aus Cambridge und Utrecht darstellen. Die Anzahl von unbehandelten Hunden war zu klein, um einen signifikanten Unterschied zu ermitteln. Abschließend sei noch einmal darauf hingewiesen, daß die Working Formulation als Übersetzung verschiedener humaner Lymphomklassifikationen entwickelt wurde und ihre prognostische Bedeutung sich aus den Überlebenszeiten der Patientengruppen mit dem jeweiligen Lymphomtyp ergibt. Eine Übertragung der prognostischen Wertigkeit einer morphologisch deskriptiven Klassifikation vom Menschen auf den Hund sollte mit äußerster Vorsicht vorgenommen werden.

In der Humanmedizin wird eine schlechtere Prognose für Patienten mit hochgradig malignen non-Hodgkin's Lymphomen auf Grund der Kiel-Klassifikation und der Working Formulation generell akzeptiert (Lennert et Feller 1990). Allerdings muß darauf verwiesen werden, daß mit dem Einsatz von Chemotherapeutika der „3. Generation“ dieser Unterschied nicht mehr auftritt (Winokur 1987).

Trotz allem sollte eine histopathologische Beurteilung caniner maligner Lymphome die Grundlage einer jeden chemotherapeutischen Behandlung bilden. Nur so ist es möglich, etwaige Unterschiede zwischen verschiedenen Subtypen in der Wirkung der Therapie zu vergleichen und auszuwerten. Da sich die Überlebenszeiten mit unterschiedlichen Behandlungsprotokollen verändern, ist eine histomorphologische Beurteilung caniner maligner Lymphome sinnvoll, da sie eine Systematisierung caniner maligner Lymphome erlaubt. Eine Untersuchung einer möglichen Veränderung der Zytomorphologie maligner Lymphome während der Behandlung sollte durchgeführt werden. Dies könnte dazu dienen, zukünftige Behandlungsprotokolle auf den Subtyp des behandelten Lymphoms für maximale Behandlungserfolge abzustimmen.

Ein Problem der histomorphologischen Beurteilung caniner maligner Lymphome ist eine Trennung zwischen T- und B-Zell-Lymphomen. Im

Gegensatz zum non-Hodgkin's Lymphom des Menschen ist eine Beurteilung des Immunphänotyps an Hand der Histomorphologie nicht möglich (Parodi et al. 1988). Die Einführung polyklonaler caniner T-Zell-Marker (CD3, Ferrer et al. 1992) und monoklonaler caniner T-Zell-Marker (CD4 und CD8, Moore et al. 1992) erlaubt jedoch eine gesicherte Bestimmung des Immunphänotypes. Allerdings ließ sich ursprünglich nur CD3 an formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material verwenden. Der monoklonale Antikörper CD79a (Vectastain) wurde zur Markierung caniner B-Zellen in formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitten verwendet. Die Methodik wurde im Birmingham Heartland Hospital erprobt und die Ergebnisse waren ausgezeichnet. Es gab weder Probleme mit falsch negativen noch mit falsch positiven Resultaten. Somit standen ein B- und ein T-Zell-Marker für Routinematerial zur Verfügung.

In dieser Arbeit betrug der Anteil von T-Zell-Lymphomen 22,3%. Bemerkenswert ist, daß 19 canine maligne Lymphome, welche als niedrigmaligne Lymphome vom B-Zell-Typ nach der Kiel-Klassifikation beurteilt worden waren, auf Grund des Immunphänotypes als T-Zell-Lymphome, und damit als hochmaligne Lymphome, eingestuft werden mußten. Diese Ergebnisse sind ähnlich den Werten von Teske et al. (1993e), der einen Anteil von 30% T-Zell-Lymphomen beschreibt, darunter viele zuvor als zentroblastisch/zentrozytischen oder zentroblastisch/zentrozytoiden B-Zell-Subtyp nach der Kiel-Klassifikation beurteilte Lymphome.

Der Immunphänotyp ergab in der multivariaten Überlebensanalyse einen signifikanten P-Wert ( $P = 0,027$ ) für die Überlebenszeit von 53 behandelten Hunden. Die Hazard-Rate zeigte eine deutlich schlechtere Prognose für die Überlebenszeit von Hunden mit T-Zell-Lymphomen als mit B-Zell-Lymphomen. Diese Resultate ähneln den Ergebnissen von Greenlee et al. (1990) und Teske et al. (1993e) für canine maligne Lymphome und den Ergebnissen von Lippmann et al. (1988) für humane non-Hodgkin's Lymphome. Für die krankheitsfreie Überlebenszeit ergab sich keine Signifikanz des Immunphänotypes. In der univariaten Überlebensanalyse ergab sich keine Signifikanz des Immunphänotypes für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit.

Eine Begründung für das Fehlen einer Signifikanz der histomorphologischen Klassifikation in der univariaten Analyse mag sich aus der Tatsache ergeben, daß die Mehrheit der T-Zell-Lymphome histologisch den niedriggradig malignen Lymphomen zugeordnet worden war. Dies mag auch der Grund einer fehlenden Signifikanz der Histomorphologie für die Überlebenszeit in anderen Arbeiten sein, die sich nur einer univariaten Analyse bedienen (Carter et al. 1987, Greenlee et al. 1990). Eine Möglichkeit, dies zu umgehen, wäre die Benutzung der „erweiterten“ (updated) Kiel-Klassifikation. Darauf wurde in dieser Arbeit verzichtet, weil in dieser Klassifikation der Grad der Malignität auf zwei Faktoren (Histomorphologie und Immunphänotyp) beruht. Zur akkuraten Beurteilung prognostischer Faktoren für Überlebensparameter wäre dies eine denkbar ungünstige Konstellation. Ein Problem würde vor allem die Anzahl „niedrigmaligner“ T-Zell-Lymphome (Kiel-Klassifikation) darstellen. Eine Klassifikation dieser Lymphome wurde auch beim Menschen in Frage gestellt (Noorduyn et al. 1990, Hastrup et al. 1991). Zu diesem Punkt ist zu bemerken, daß es wahrscheinlich sinnvoll ist, alle T-Zell-Lymphome als hochmaligne Lymphome zu betrachten, wie es sich aus der multivariaten Überlebensanalyse ergibt. Dies wurde ebenfalls für non-Hodgkin's Lymphome des Menschen vorgeschlagen (Noorduyn et al. 1990). Die Beurteilung der verbleibenden B-Zell-Lymphome mit der Kiel-Klassifikation ergab in einer Arbeit von Teske et al. (1993d) signifikante Werte. Dieser Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weitergehend untersucht. Eine solche Unterteilung mag der Hauptgrund für die unterschiedliche Bewertung der Histomorphologie zwischen den eigenen Ergebnissen und denen von Teske et al. (1993d) sein.

### 6.1.3. Proliferationsmarker

#### Mitoserate

Eine hohe Mitoserate ist eine Indikation für eine schlechtere Prognose.

Die Mitoserate gilt in der Histopathologie als ein wichtiges Kriterium zur Malignitätsbestimmung. Dabei variiert ihre Bedeutung für verschiedene Tumoren. In caninen malignen Lymphomen liegt in der Mehrzahl eine mittlere bis hohe Mitoserate vor. Damit trifft auf die prognostische Bedeutung der Mitoserate ähnliches zu, wie auf das klinische Stadium. Da die Mehrheit aller caninen malignen Lymphome als hochmaligne Tumore beurteilt worden war und eine Mitoserate zwischen 4 und 8 aufwies, ergaben sich nur wenig Möglichkeiten einer Einteilung von Klassen von caninen malignen Lymphomen mit verschiedenen Mitoseraten. Insgesamt hatten nur 17 Hunde von 122 eine Mitoserate größer 9. Trotzdem ergab sich für diese Gruppe eine deutlich schlechtere Prognose für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit behandelter Hunde in der univariaten Analyse. Die multivariate Analyse enthielt zu wenig Hunde mit einer hohen Mitoserate, um eine signifikante Aussage zu erlauben.

In früheren Arbeiten an caninen malignen Lymphomen (Carter et al. 1987, Greenlee et al. 1990) wurde eine hohe Mitoserate als prognostisch negativ gewertet. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß eine Mitoserate größer 9 indikativ für eine schlechtere Prognose ist. Neben der geringen Relevanz dieser Methode ergibt sich das Problem einer standardisierten Auswertung. Eine Mitoserate pro Gesichtsfeld ändert sich nicht nur mit der Vergrößerung, sondern auch mit dem gewählten Mikroskop. Hinzu kommt die Möglichkeit der Erfassung pyknotischer und/oder atypischer Zellkerne als falsch positiv. Somit sollte die Bedeutung der Mitoserate nicht überbewertet und nur hohe Werte als indikativ für eine schlechtere Prognose betrachtet werden. Da die Mitoserate leicht an H&E gefärbten Schnitten zu ermitteln ist, kann ihre Bestimmung routinemäßig während der Diagnosestellung erfolgen.

#### PCNA

Die Bestimmung des Anteils PCNA-positiver Zellen ergab in der vorliegenden Arbeit keinen prognostisch bedeutsamen Parameter.

Eine Standardisierung der Markierung von PCNA in formalinfixiertem, paraffineingebettetem caninem Gewebe ist unerlässlich und bildet die Voraussetzung einer reproduzierbaren Anwendung dieses Markers. Die lange Halbwertszeit von PCNA (Gerdes et al. 1984) und die erhöhte PCNA-Aktivität während zellulärer Reparaturen in der G<sub>0</sub>-Phase (Oates et al. 1994) führen leicht zur falsch-positiven Markierung von Zellen, die sich weder in der S-Phase befinden noch überhaupt zur Wachstumsfraktion gehören. Dies würde die Anzahl von Lymphomen mit einem höheren Anteil von PCNA-positiven als Ki-67-positiven Zellen erklären.

Es liegen keine Vergleichswerte zur Bedeutung der PCNA für canine maligne Lymphome vor. Die einzigen Untersuchungen an caninen Tumoren wurden an Mammatumoren (Canese et al. 1994), Mastzelltumoren (Simoës et al. 1994) und testikulären Tumoren (Sarli et al. 1994) durchgeführt. Während PCNA von prognostischer Bedeutung für Mastzell- (Simoës et al. 1994) und Mammatumoren (Canese et al. 1994) war, konnte keine prognostische Signifikanz für testikuläre Tumore festgestellt werden (Sarli et al. 1994).

Auch in dieser Arbeit konnte eine prognostische Signifikanz nicht durch die multivariate Analyse bestätigt werden. Zwar ergab die univariate Überlebensanalyse signifikante Unterschiede in der Überlebenszeit zwischen behandelten Hunden mit malignem Lymphom mit niedrigem und

hohem Anteil PCNA-positiver Zellen, doch die Probleme in der Auswertung und die große Gruppe von Hunden mit malignem Lymphom mit mittlerem Anteil PCNA-positiver Zellen lassen eine Anwendung von PCNA in der Routinediagnostik als wenig sinnvoll erscheinen.

Eine schlechtere Prognose für Hunde mit malignem Lymphom mit hohem Anteil PCNA-positiver Zellen in der univariaten Analyse könnte einen Anhaltspunkt für die Bedeutung der Ermittlung des Phasen-Indexes in einer prognostischen Untersuchung darstellen. Ein hoher Anteil PCNA-positiver Zellen läßt auf einen hohen Anteil von neoplastischen Zellen in der S-Phase schließen. Dieser Zusammenhang läßt weniger den Schluß auf eine hohe Proliferationsaktivität als vielmehr auf das Auftreten karyologischer Abnormitäten zu. Mit fortschreitender genetischer Forschung und Bestimmung der auftretenden neoplastischen Klone könnte sich die PCNA als ein wichtiger prognostischer Faktor erweisen. Eine Selektierung von Hunden mit malignem Lymphom mit einem hohen Anteil PCNA-positiver Zellen für weitergehende Untersuchungen, wie z. B. Ploidie-Bestimmung, sollte für zukünftige Studien in Erwägung gezogen werden. Derzeit bietet die Erfassung des Anteils PCNA-positiver Zellen gegenüber der Mitoserate keinen Vorteil für die prognostische Bewertung caniner maligner Lymphome. Deshalb erscheint der Einsatz eines zusätzlichen immunhistologischen Proliferationsmarkers als wenig sinnvoll für die Routinediagnostik.

## Ki-67

In der vorliegenden Arbeit wurde keine prognostische Bedeutung für Ki-67 ermittelt. Zwar ergaben sich höhere Anteile Ki-67-positiver Zellen in hochmalignen Lymphomen, doch konnte dieser Zusammenhang statistisch nicht bestätigt werden.

Eine Standardisierung von Ki-67 war einfacher durchzuführen als für PCNA. Dies begründete sich hauptsächlich auf den Umstand, daß Ki-67 eine deutlich kürzere Halbwertszeit als PCNA aufweist und sich ein gleichbleibender Bereich eindeutig positiver Zellen mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen von MIB-1 ergibt. Im Gegensatz zu einer Arbeit an caninen testikulären Tumoren (Sarli et al. 1994) wurde nur eine geringgradig lineare Korrelation zwischen PCNA und Ki-67 festgestellt. Dieses Ergebnis läßt sich aus der Tatsache erklären, daß Ki-67 die gesamte Wachstumsfraktion erfaßt, wogegen PCNA nur Zellen in der S-Phase markiert. Die zuvor erwähnte lange Halbwertszeit von PCNA und die Aktivierung von  $\delta$ -Polymerase während Zellreparaturen führen zu teilweise höheren PCNA-positiven Zellanteilen gegenüber Ki-67-positiven Zellanteilen. Diese Überlappung kann zu einer deutlichen Verzerrung des Verhältnisses zwischen PCNA und Ki-67 führen.

Ki-67 wurde nur an caninen testikulären Tumoren auf seine prognostische Bedeutung untersucht und es wurde keine Signifikanz ermittelt (Sarli et al. 1994). In humanen non-Hodgkin's Lymphomen wurde die prognostische Bedeutung von Ki-67 in mehreren Arbeiten untersucht (Crocker et al. 1988a, Hall et al. 1988, Jan-Mohammed et al. 1990). Zwar konnte eine höhere Anzahl Ki-67-positiver Zellen in hochmalignen Lymphomen ermittelt werden, doch stellten alle Arbeiten die höhere prognostische Bedeutung von AgNORs gegenüber Ki-67 heraus. Eine Weiterführung der Methodik ergab sich aus der Doppelmarkierung von Ki-67 und AgNORs, wobei alle Ki-67-positiven Zellen eine höhere AgNOR-Anzahl aufwiesen als Ki-67-negative Zellen. Ein solcher Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Wie schon zuvor erwähnt, ist die Anwendung und die standardisierte Auswertung von Ki-67 relativ einfach. Ein negativer Faktor ist das arbeitsaufwendige Auszählen der Ki-67-positiven Zellen. Hinzu kommt ein relativ hoher Preis des Antikörpers. Zwar mag eine zukünftige Studie einen prognostischen Nutzen einer kombinierten Ki-67 Färbung nachweisen, dies würde jedoch nur mit erheblich gesteigertem Arbeitsaufwand und einem komplizierteren Protokoll möglich sein. Da Ki-67 alle im Zellzyklus befindlichen Zellen markiert, würde sich eine Aussage zur Malignität und damit zur Prognose nur dann ergeben, wenn die Malignität caniner Lymphome hauptsächlich von dem Anteil proliferierender Zellen abhängt. Schon ein hyperplastischer Lymphknoten wäre anhand dieser Daten schwer von einem Lymphom zu unterscheiden. Es ist wesentlich wahrscheinlicher, daß die Malignität caniner Lymphome von ihrer Invasivität und Infiltration abhängt, sowie von der Proliferationsgeschwindigkeit des neoplastischen Klons. Ein Beleg dieser Hypothese sind die Ergebnisse der Anwendung von AgNORs als prognostischer Parameter.

## AgNORs

In dieser Arbeit wurde die originale Methode nach Ploton et al. (1986) zur AgNOR-Färbung verwendet und die formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitte wurden im Birmingham Heartland Hospital (Crocker 1995) zwischen 1994 und 1995 gefärbt. Um den Einfluß von Fixativ und Färbeprotokoll (Temperatur und Dauer) auf die AgNOR-Fläche und -Anzahl (Derenzini et al. 1988b, Zaczek et al. 1994) konstant zu halten und eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen, wurden durch das AgNOR-Komitee (Aubele et al. 1994e) Richtlinien zum Färben und Bewerten von AgNORs herausgegeben. Zu diesem Zeitpunkt war das Färben der hier verwendeten Schnitte nach der originalen Methode bereits vollzogen. Darüber hinaus sind in der Veterinärmedizin methodische Vereinheitlichungen zur Anwendung von AgNORs noch nicht geschaffen. Der Mangel an Material für weitere Serienschnitte erlaubte keine Änderung der Methodik. Da sich keine Probleme bei der Auswertung der AgNORs (manuelles Auszählen) ergaben und eine Vergleichsfärbung ein halbes Jahr später an wenigen ausgewählten Schnitten dieselben Ergebnisse in der Auswertung der AgNORs ergab, bestand kein Anlaß, in dieser Arbeit die Methodik zu verändern. Schon Crocker stellte 1995 heraus, daß die AgNOR-Färbung prinzipiell einfach ist. Eine der Grundvoraussetzungen für gute Ergebnisse ist die ausschließliche Verwendung von deionisiertem Wasser. Die Fixierung mit Formalin ist ein Aspekt, der zwar die Qualität der Auswertung beeinträchtigen kann, aber für die Verwendung von Routinematerial unerlässlich ist. Ein komplizierteres Färbeprotokoll würde den Vorteil der schnellen und einfachen Anwendung der AgNOR-Technik gegenüber allen anderen Proliferationsmarkern zunichte machen. Für die meisten veterinärmedizinischen Routinelaboratorien ist die originale Färbung nach Ploton die einfachste und unkomplizierteste Methode und wird in den meisten Fällen den gestellten Anforderungen gerecht werden. Dagegen stellt sich die wesentlich wichtigere Frage, welche AgNOR-Parameter prognostisch bedeutsam sind und wie sie erfaßt werden sollten. Neben der klassischen Auszählung aller AgNORs unter Durchfokussierung des Schnittes (Crocker 1990) wurde in dieser Arbeit die automatisierte Mikroskopbildanalyse (Hufnagel et al. 1994) verwendet. Mit der Anwendung dieser Methode erhöhte sich zwar die Genauigkeit, aber auch die Anzahl der erfaßten Parameter. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten dazu dienen, die prognostisch bedeutsamen Parameter für die Überlebenszeit von unbehandelten Hunden und für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom zu selektieren.

Der große Vorteil der Mikroskopbildanalyse liegt in der Möglichkeit, ruhende Lymphozyten als interne Kontrolle (Derenzini et Trere 1991b) zu nutzen. Diese Möglichkeit bestand für die vorliegende Arbeit nicht, da eine histologische Differenzierung zwischen neoplastischen und nicht-neoplastischen lymphoiden Zellen nicht gewährleistet ist. Für zukünftige Arbeiten wäre das Mitführen normalen lymphatischen Gewebes auf jedem zu untersuchenden Schnitt eine sinnvolle Ergänzung. So können etwaige Variationen in der AgNOR-Färbung durch Standardisierung der Vermessung basierend auf der AgNOR-Fläche von Lymphozyten im unveränderten Gewebe vermieden werden.

In dieser Arbeit sollte neben der Mikroskopbildanalyse eine Bewertung der Färb- und Verteilungsmuster von AgNORs vorgenommen und eine darauf basierende Klassifikation erarbeitet werden. Fünf verschiedene AgNOR-Typen wurden beschrieben und ihre prognostische Wertigkeit analysiert. Diese Methode war einfach durchzuführen und erlaubte die Verwendung von Routinematerial. Während eine univariate Analyse den

AgNOR-Typ als signifikant für die Überlebenszeit von unbehandelten und behandelten Hunden ermittelte und einen signifikanten Unterschied nur zwischen Hunden mit malignem Lymphom vom AgNOR-Typ I und IV für die krankheitsfreie Überlebenszeit ergab, konnte diese Signifikanz nicht in der multivariaten Analyse bestätigt werden. Ein Grund hierfür mag die geringere Anzahl von Hunden in der multivariaten Analyse darstellen. Andererseits ist zu berücksichtigen, daß verschiedene Parameter, welche das Verteilungsmuster von AgNORs beschreiben und mit der Mikroskopbildanalyse erfaßt wurden, sich erst in der multivariaten Analyse als signifikant herausstellten bzw. nur in der univariaten Analyse signifikant waren. Hierbei waren vor allem die maximale Distanz zwischen zwei AgNORs im Zellkern, die AgNOR-Summenfläche und das Verhältnis der AgNOR-Summenfläche zur Zellkernfläche von prognostischer Bedeutung für die Überlebenszeit von Hunden mit malignem Lymphom. In der univariaten Analyse ergaben sich zwar signifikante Werte für einzelne Gruppen innerhalb verschiedener, das Verteilungsmuster von AgNORs beschreibender Parameter (Lokalisation von AgNORs, maximale AgNOR-Fläche); diese Werte konnten jedoch nicht in der multivariaten Analyse bestätigt werden. Ähnliches gilt auch für die AgNOR-Summenfläche.

Basierend auf diesen Ergebnissen erscheint es sinnvoll, die verschiedenen AgNOR-Typen zu überarbeiten und ein stärkeres Augenmerk auf den Abstand zwischen zwei AgNORs und die Flächenverhältnisse zu legen. Im Rahmen der Verfügbarkeit einer Mikroskopbildanalyse könnten Typen basierend auf diesen Parametern und der durchschnittlichen AgNOR-Fläche erstellt werden, um eine genauere Einteilung prognostischer Gruppen zu ermöglichen. Zur Analyse der Überlebenszeit von behandelten Hunden erscheint derzeit die Bestimmung des AgNOR-Typs, wie in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagen, neben dem Immunophänotyp als die diagnostisch schnellste und einfachste Methode, um eine Indikation zum weiteren Krankheitsverlauf zu geben.

Eine genauere prognostische Vorhersage war durch die Bestimmung der durchschnittlichen AgNOR-Fläche und -Anzahl mit der Mikroskopbildanalyse möglich. Diese Parameter sind am einfachsten zu bestimmen und haben die größte prognostische Signifikanz. Dabei spielt es keine Rolle, ob die AgNOR-Anzahl manuell oder mit der Mikroskopbildanalyse ermittelt wird. Die im Literaturteil beschriebenen Diskrepanzen zwischen der einfachen Auszählmethode und der Mikroskopbildanalyse lassen sich durch eine standardisierte Schnittdicke von 3µm und ein Auszählen unter Ölimmersion bei 1000facher Vergrößerung minimieren (Rüschoff et al. 1990c). Dies spiegelt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit wieder, da sich eine Korrelation zwischen den unterschiedlich ermittelten AgNOR-Anzahlen größer 0,85 ergab. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied in der absoluten AgNOR-Anzahl zwischen beiden Methoden ermittelt. Die Auszählung von 100 Tumorzellen pro Tumor ist ausreichend, um etwaige Fehlerquellen wie das Erfassen einzelner nicht-neoplastischer Zellen zu minimieren. Was die "Intra- und Interobservervariabilität" angeht, so konnten mittels des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten gute Übereinstimmungen gefunden werden.

Die durchschnittliche AgNOR-Anzahl erwies sich in der multivariaten Analyse als prognostisch signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit behandelter Hunde, dagegen nur in der univariaten Analyse als signifikant für die Überlebenszeit behandelter und unbehandelter Hunde. Eine längere krankheitsfreie Überlebenszeit korrelierte mit einer kleineren AgNOR-Anzahl pro Zellkern.

Die durchschnittliche AgNOR-Fläche erwies sich in der multivariaten Analyse als prognostisch signifikant für die Überlebenszeit behandelter Hunde, dagegen nur als signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit einzelner Gruppen behandelter Hunde. Eine längere Überlebenszeit behandelter Hunde mit malignem Lymphom korrelierte mit Lymphomen mit einer größeren durchschnittlichen AgNOR-Fläche.

Eine Kombination dieser beiden Parameter mit dem Immunophänotyp zur Klassifizierung caniner maligner Lymphome erlaubt eine Trennung zwischen Risikohunden mit niedrigen Überlebenschancen und Hunden mit Überlebenszeiten von bis zu drei Jahren unter Einsatz von Chemotherapie. Weitere AgNOR-Parameter würden zwar einer genaueren prognostischen Klassifizierung dienen, ihre Erfassung setzt jedoch die Benutzung entsprechender Computertechnik voraus und dürfte somit für viele kleinere Laboratorien einen zu hohen Kosten- und Zeitaufwand darstellen. Vor allem das Verhältnis zwischen der AgNOR-Summenfläche und der Zellkernfläche (AR\_RAT) und der maximale Abstand zwischen zwei AgNORs (MAXDIST) waren weitere wichtige prognostische Faktoren für die krankheitsfreie Überlebenszeit behandelter Hunde mit malignem Lymphom. Dieser Sachverhalt ist ein Indiz dafür, daß die Verteilungsmuster von AgNORs unter besonderer Berücksichtigung dieser Parameter in ein neues Klassifikationsschema für die prognostische Bewertung caniner maligner Lymphome entwickelt werden können. Alle anderen untersuchten AgNOR-Parameter hatten in dieser Arbeit keine bedeutende prognostische Signifikanz.

Der Einsatz von AgNORs in der veterinärpathologischen Diagnostik ist minimal, wobei die Mehrheit der Untersuchungen an caninen Tumoren durchgeführt wurde. Keine der wenigen vorliegenden Arbeiten analysiert canine maligne Lymphome. Frühere Arbeiten zur Bedeutung von AgNORs wurden vor allem an caninen Mastzelltumoren (Bostock et al. 1989, Simoes et al. 1994) und caninen Mammatumoren (Bostock et al. 1992, Destexhe et al. 1995) durchgeführt. In anderen Arbeiten wurde die prognostische Bedeutung von AgNORs für canine Seminome (De Vico et al. 1994), canine Perianaldrüsentumoren (Preziosi et al. 1995), canine Bindegewebstumoren (Roccabianca et al. 1992), canine Sticker-Sarkome (Harmelin et al. 1995) und canine Leiomyome (Johnson et al. 1995) untersucht. In allen Arbeiten konnte die prognostische Bedeutung von AgNORs bestätigt werden.

In der Humanmedizin ist die prognostische Bedeutung von AgNORs unumstritten. In der Mehrzahl der publizierten Arbeiten wurde Normalgewebe von Karzinomgewebe mit Hilfe der durchschnittlichen AgNOR-Anzahl pro Zellkern differenziert (Crocker 1990, Rüschoff 1992).

Die wohl umfassendsten Untersuchungen an humanen non-Hodgkin's Lymphomen wurden von Crocker und Mitarbeitern durchgeführt (Crocker et al. 1987, Crocker et al. 1988, Crocker et al. 1988a, b, Hall et al. 1988, Jan-Mohammed et al. 1989, 1990). Arbeiten jüngerer Datums liegen von Jakijc-Rasumovijc et al. (1992, 1993a, b) vor. In allen Arbeiten wurde die prognostische Bedeutung von AgNORs für non-Hodgkin's Lymphome des Menschen bestätigt und in Vergleichsstudien auf die Überlegenheit von AgNORs gegenüber anderen prognostischen Markern hingewiesen (Hall et al. 1988). Crocker et al. (1988a) beschrieben eine starke, lineare Korrelation zwischen Ki-67 und AgNORs in non-Hodgkin's Lymphomen. Diese Aussage wurde durch die Untersuchungen von Jan-Mohammed et al. (1990) spezifiziert, die eine höhere AgNOR-Anzahl in Ki-67-positiven als Ki-67-negativen Zellen beschreiben. Daraus wurde geschlossen, daß AgNORs die Proliferationsaktivität von non-Hodgkin's Lymphomen beschreiben. Diese Aussage konnte mit den vorliegenden Ergebnissen für canine maligne Lymphome ebenfalls bestätigt werden.

Die durchschnittliche Anzahl von AgNORs pro Zellkern in humanen non-Hodgkin's Lymphomen betrug 4,4 bis 6,8 AgNORs pro Zellkern für hochmaligne und 1,1 bis 1,5 AgNORs pro Zellkern für niedrigmaligne non-Hodgkin's Lymphome (Crocker 1990). Kim et al. (1988) fanden Werte von 1,3 AgNORs pro Zellkern für niedrigmaligne und 4,2 bis 8,3 AgNORs pro Zellkern für hochmaligne non-Hodgkin's Lymphome. In einer Arbeit von Yekeler et al. (1993) variierten diese Werte zwischen 1,2 für ruhende Lymphozyten, 2,8 für niedrigmaligne Lymphome und 10,5 für hochmaligne Lymphome. In allen Arbeiten (Kim et al. 1988, Crocker 1990, Yekeler et al. 1993) wurde mit sich erhöhender Malignität, basierend auf einer histomorphologischen Bewertung, eine höhere AgNOR-Anzahl pro Zellkern beschrieben. Eine derartige Übereinstimmung zwischen AgNOR-Anzahl und Histomorphologie konnte für canine maligne Lymphome nur bedingt bestätigt werden. Zwar ergaben sich vergleichbare Unterschiede in der AgNOR-Anzahl, wenn die unterschiedlichen Lebenszeiten miteinander verglichen wurden, jedoch nicht basierend auf dem histomorphologischen Malignitätsgrad (Kiel-Klassifikation). Um die AgNOR-Anzahl einem bestimmten Malignitätsgrad zuordnen zu können, ist ein primäres „Grading“ notwendig. Auf die Probleme einer solchen Einteilung wurde an anderen Stellen bereits verwiesen. Ein Vergleich zur

Histomorphologie erscheint außerdem als wenig sinnvoll, da in der vorliegenden Arbeit keine Zusammenhänge der Malignitätsgrade zu den Überlebensparametern festgestellt werden konnten. Somit ist zwar die Anzahl von AgNORs ein bedeutender prognostischer Faktor, die Assoziation zum histomorphologischen „Grading“ jedoch fraglich. Es ergibt sich die Frage, ob es sinnvoller ist, canine maligne Lymphome primär nach ihrer Proliferationsaktivität zu beurteilen oder sie histomorphologisch zu klassifizieren. Aus prognostischen Gründen wäre ersteres zwar die scheinbar günstigere Variante, doch der Mangel an umfassenden Arbeiten zum Einsatz verschiedener Proliferationsmarker an caninen malignen Lymphomen und Probleme der Standardisierung sprechen gegen eine solche Lösung. Deshalb ist es um so wichtiger, eine ausführliche histologische Klassifizierung caniner maligner Lymphome basierend auf der Kiel-Klassifikation vorzunehmen, da sowohl die Kriterien einer solchen Klassifikation standardisiert sind, als auch ihre Reproduzierbarkeit an caninen malignen Lymphomen bewiesen wurde (Parodi et al. 1988).

Was die Erfassung der Flächen- und Lageparameter von AgNORs mit der Mikroskopbildanalyse anbelangt, so sind weder an caninen malignen Lymphomen noch an humanen non-Hodgkin's Lymphomen vergleichbare Untersuchungen durchgeführt worden. Nur in einer Arbeit von Crocker et al. (1988b) wurden Vermessungen von AgNORs an kalibrierten photographischen Vergrößerungen vorgenommen. Neben der AgNOR-Anzahl wurden der maximale AgNOR-Durchmesser und die AgNOR-Fläche erfaßt. Als Resultat ergab sich eine invertierte Beziehung zwischen der AgNOR-Fläche und der AgNOR-Anzahl für die Malignität von non-Hodgkin's Lymphomen. Mit steigender AgNOR-Anzahl verringerte sich die AgNOR-Fläche und umgekehrt, wobei eine große AgNOR-Anzahl und eine kleine AgNOR-Fläche mit höherer Malignität assoziiert waren. Rüschoff (1992) beschreibt eine generelle Bedeutung des Verhältnisses zwischen der AgNOR-Anzahl und der AgNOR-Fläche für die Bewertung histologischer Schnitte sowie der AgNOR-Summenfläche für die Bewertung zytologischer Präparate. In der vorliegenden Arbeit ist besonders die durchschnittliche AgNOR-Fläche von prognostischer Bedeutung für alle untersuchten Parameter. Für canine maligne Lymphome konnte ebenfalls ein invertiertes Verhältnis zwischen der AgNOR-Anzahl und -Fläche aufgezeigt werden. Aber auch die zuvor erwähnte AgNOR-Summenfläche war von signifikanter Bedeutung.

Abschließend muß festgestellt werden, daß die deutliche Signifikanz einzelner AgNOR-Parameter für die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit behandelter Hunde und die Überlebenszeit unbehandelter Hunde mit malignem Lymphom AgNORs als den prognostisch wertvollsten Marker hervorhebt. Die einfache Applikation, die Verwendbarkeit an Routinematerial und die mögliche einfache Auszählung von AgNORs ebenso wie die Bestimmung des AgNOR-Verteilungsmusters begründen den histopathologischen Wert von AgNORs.

Faßt man alle Resultate zusammen, so bietet zum gegenwärtigen Zeitpunkt die hier vorgeschlagene AgNOR-Typenklassifikation, gekoppelt mit der Bestimmung des Immunophänotyps und der AgNOR-Anzahl, das schnellste, kostengünstigste und akkurateste Verfahren zur prognostischen Analyse caniner maligner Lymphome. Die Qualität einer prognostischen Beurteilung kann deutlich durch den Einsatz der Mikroskopbildanalyse zur Erfassung der AgNOR-Anzahl und -Fläche erhöht werden.

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 6.2. Vergleichende Wertung der Proliferationsmarker

Wie schon in der Einführung erwähnt, ist die Anwendung eines einzelnen Proliferationsmarkers zur Beurteilung der Proliferationsaktivität caniner maligner Lymphome wenig erfolgversprechend. Drei verschiedene Typen von Markern sind notwendig, um die Kinetik einer malignen Zellpopulation zu beschreiben (Brugal 1994). Der erste Marker sollte die Wachstumsfraktion erfassen (Ki-67), der zweite die Zellzyklusgeschwindigkeit (AgNOR-Anzahl) und der letzte den Phasen-Index (PCNA, Mitoserate) als Indikator möglicher karyologischer Abnormalitäten. Ein Versuch, die einzelnen Marker zu korrelieren, führte in dieser Arbeit zu keiner weitergehenden prognostischen Aussage. Die Beurteilung von PCNA, Ki-67 und Mitoserate allein erwies sich in der multivariaten Analyse als prognostisch nicht signifikant. Die AgNOR-Anzahl war prognostisch signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit in der multivariaten Analyse. In Vergleichen zwischen der AgNOR-Anzahl, PCNA und Ki-67 konnten nur geringgradige lineare Korrelation festgestellt werden.

Wie Brugal (1994) herausstellte, kann die Analyse einer großen Zellzahl pro Tumor mit dem Ziel, statistische Signifikanz zu erreichen, dazu führen, daß einzelnen Tumorealen mit Zellen mit hohen Werten für alle Proliferationsmarker nicht genügend Aufmerksamkeit geschenkt wird. Durch eine Doppelmarkierung oder eine Bewertung verschiedener Marker an Serienschnitten mit der Mikroskopbildanalyse können mehrfach positive Zellen erfaßt werden. Dies als Grundlage einer Klassifikation zu entwickeln erscheint wenig sinnvoll, da die Selektion des entsprechenden Tumoreals von hoher Subjektivität geprägt wäre.

Zu den in dieser Arbeit analysierten Markern sind folgende Bemerkungen zu machen. Ein hoher Phasen-Index (PCNA oder Mitoserate) in caninen malignen Lymphomen kann das Resultat einer realen Erhöhung des Phasen-Indexes oder einer erhöhten Wachstumsfraktion sein. Das heißt, bei Erhöhung der Wachstumsfraktion kann sich ein größerer Zahlenwert für den Phasen-Index ergeben, obwohl der Phasen-Index im Verhältnis zur Zellzykluslänge unverändert ist. Ebenso kann eine Verkleinerung der Phasenlänge bei konstanter Wachstumsfraktion und Proliferationsaktivität zu Falschinterpretationen führen, wenn nicht alle Proliferationsparameter bekannt sind. Auch durch die Erhöhung der Proliferationsaktivität bei gleichbleibender Wachstumsfraktion kann der Phasen-Index scheinbar erhöht, dabei aber gleichgroß im Verhältnis zur Zellzykluslänge sein. Es ist also weder mit der Mitoserate noch mit der PCNA allein festzustellen, welche Veränderung eingetreten ist.

Für die Wachstumsfraktion ist die Analyse weniger kompliziert, da Ki-67 alle sich im Zyklus befindlichen Zellen erfaßt und somit ein hoher Anteil Ki-67-positiver Zellen direkt mit einer großen Wachstumsfraktion korreliert. Zu beachten ist allerdings, daß nicht alle nichtmarkierten Zellen der Tumorzellpopulation angehören. Zwar ist der Anteil normaler lymphatischer Zellen in diffusen caninen malignen Lymphomen klein, allerdings kann der Anteil infiltrierender T-Lymphozyten relativ hoch sein. Um einen standardisierten Vergleich zwischen verschiedenen Wachstumsfraktionen zu ermöglichen, wäre es notwendig, die Distanz zwischen zwei Ki-67-positiven Zellen zu erfassen. Eine solche Analyse setzt den Einsatz der Mikroskopbildanalyse voraus.

AgNORs charakterisieren die Zellzyklusgeschwindigkeit. Es stellt sich hier ein ähnliches Problem wie für Ki-67. Da die AgNOR-Anzahl am höchsten in der S-Phase ist, sollten nur PCNA-positive Zellen auf ihre AgNOR-Anzahl untersucht werden. Eine Bewertung von Ki-67-markierten Zellen auf ihre AgNOR-Anzahl gewährleistet zumindest, daß nur Zellen im Zellzyklus untersucht werden. Während die AgNOR-Anzahl primär die Zellzyklusgeschwindigkeit erfaßt, sind andere AgNOR-Parameter nicht ausreichend untersucht, um einen Zusammenhang zu einem bestimmten Proliferationsparameter hervorheben zu können.

Die zuvor erwähnten Probleme spiegeln sich in den Ergebnissen dieser Arbeit wieder. Zwar waren eine hohe Mitoserate und hohe Anteile PCNA- und Ki-67-positiver Zellen gegenüber niedrigen Werten in den univariaten Analysen signifikant für verschiedene Überlebensparameter, doch eine alleinige Betrachtung dieser Marker erwies sich in der multivariaten Analyse als ungeeignet für eine prognostische Beurteilung. Da die Malignität

caniner Lymphome wahrscheinlich nur zu einem geringen Grade mit dem Anteil proliferierender Zellen bestimmt werden kann, ist unter praktischen Gesichtspunkten der Einsatz von Ki-67 und PCNA zur prognostischen Beurteilung wenig erfolgversprechend. In der Zukunft wird die Bestimmung des neoplastischen Klons ohnehin eine größere Rolle in der Prognosestellung spielen. Aus Kostengründen wird sich eine solche Methode wohl vorerst nicht in der veterinärmedizinischen Praxis durchsetzen. Andererseits sollte die gemeinsame Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit, der Wachstumsfraktion und des Phasen-Indexes die Grundlage einer jeden Proliferationsstudie sein.

Um die Bedeutung der untersuchten Proliferationsmarker für die Überlebenszeiten von Hunden mit malignem Lymphom mit den Ergebnissen zukünftiger Arbeiten vergleichen zu können, ist es wahrscheinlich notwendig, die histomorphologische Klassifikation caniner maligner Lymphome als systematische Grundlage zu benutzen. Da die Überlebensparameter abhängig vom Behandlungsprotokoll sind und das chemotherapeutische Behandlungsprotokoll den variablen Faktor in den meisten Untersuchungen darstellt, wäre es nur möglich, Vergleiche zwischen einheitlichen Behandlungsprotokollen aufzustellen. Eine andere Möglichkeit wäre die Zuordnung eines Malignitätsgrades zu bestimmten Klassen von Hunden mit malignem Lymphom basierend auf verschiedenen Proliferationsmarkern.

Die AgNORs erwiesen sich in der multivariaten Analyse sowohl PCNA als auch Ki-67 als eindeutig prognostisch überlegen. Die durchschnittliche AgNOR-Fläche (MEANAR) und die durchschnittliche AgNOR-Anzahl (NORNBC) waren die prognostisch bedeutendsten Parameter. Eine längere Überlebenszeit behandelter Hunde mit malignem Lymphom korrelierte mit Lymphomen mit einer größeren durchschnittlichen AgNOR-Fläche, und eine längere krankheitsfreie Überlebenszeit korrelierte mit einer kleineren AgNOR-Anzahl pro Zellkern. Neben der Erfassung quantitativer AgNOR-Parameter stellen Verteilungsmuster von AgNORs einen einfachen und nützlichen diagnostischen Parameter zur Indikation der Überlebenszeit dar. Die hier vorgeschlagene Klassifikation basierend auf dem AgNOR-Typ hatte nur in der univariaten Analyse eine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit unbehandelter Hunde mit malignem Lymphom und für die krankheitsfreie Überlebenszeit und die Überlebenszeit von einzelnen Gruppen behandelter Hunde mit malignem Lymphom. Weiterhin waren das Verhältnis zwischen der AgNOR-Summenfläche und der Zellkernfläche (AR\_RAT) und der maximale Abstand zwischen zwei AgNORs (MAXDIST) wichtige prognostische Faktoren für die krankheitsfreie Überlebenszeit behandelter Hunde mit malignem Lymphom.

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

### 6.3. Schlußfolgerungen

Die prognostische Beurteilung caniner maligner Lymphome ist an routinemäßig fixiertem Gewebe durchführbar und ökonomisch vertretbar. Alle in dieser Arbeit eingesetzten Marker ließen sich an formalinfixierten, paraffineingebetteten Biopaten auswerten, und die Kosten einer solchen Analyse sind im Vergleich zu den Kosten zu einer nachfolgenden chemotherapeutischen Behandlung verschwindend gering. Ein oft, speziell in Deutschland, sich stellendes Problem ist die Frage nach einer ethischen und ökonomischen Vertretbarkeit einer chemotherapeutischen Behandlung und darauffolgend einer vorhergehenden prognostischen Bewertung caniner maligner Lymphome. Unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom überleben durchschnittlich nicht mehr als 2 Monate, und eine Euthanasie wird oft zu einem früheren Zeitpunkt auf Wunsch des Besitzers durchgeführt. Eine prognostische Beurteilung von Biopaten unbehandelter Tiere ist deshalb wenig sinnvoll und nur aus wissenschaftlichen Vergleichsgründen notwendig. Mit den heutigen Behandlungsprotokollen sind aber Überlebenszeiten und auch krankheitsfreie Überlebenszeiten von mehr als einem Jahr zu erzielen. Solche Ergebnisse rechtfertigen den Einsatz von Chemotherapie und verlangen nach einer routinemäßigen prognostischen Beurteilung caniner maligner Lymphome, um den Kostenfaktor günstig zu gestalten.

Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den Erfahrungen mit humanen non-Hodgkin's Lymphomen ergibt sich aus der geringeren Aggressivität der Chemotherapie für canine maligne Lymphome. Die veterinärmedizinische Praxis sieht sich auf dem Gebiet der Onkologie dem Problem ausgesetzt, daß der Grad einer therapieinduzierten Toxizität durch den Besitzer des zu behandelnden Hundes bestimmt wird. Diese Beschränkung trägt maßgeblich zu kürzeren Überlebenszeiten und einem schlechteren Ansprechen auf die Behandlung von Hunden mit malignem Lymphom im Vergleich zu aus der Humanmedizin bekannten Daten für non-Hodgkin's Lymphome des Menschen bei. Um Unterschiede zwischen Hundepopulation festzustellen und Gruppen zu ermitteln, die bei einer aggressiveren Chemotherapie möglicherweise heilbar wären, bedarf es weiterer Arbeiten welche die untersuchten Parameter an verschiedenen Behandlungsprotokollen vergleichen. Solche Gruppen würden Hunde umfassen, die maligne Lymphome mit einer geringen proliferativen Kapazität hätten und dadurch von einer aggressiven Therapie profitieren würden. Eine hohe Proliferationsaktivität in non-Hodgkin's Lymphomen des Menschen wird oft mit guter primärer Respons zur chemotherapeutischen Behandlung aber kürzerer krankheitsfreier Überlebenszeit assoziiert. Dieser Zusammenhang trifft auch auf canine maligne Lymphome zu und mag einer der Hauptgründe für die fehlende prognostische Bedeutung einzelner Proliferationsmarker in dieser Arbeit sein. Die Resultate dieser Arbeit sind mehr indikativ für die Anfangsrespons einer chemischen Behandlung, als für die Dauerhaftigkeit einer solchen Respons.

Die Scheu vieler Praktiker vor der Anwendung hochtoxischer Medikamente, das Fehlen einer routinemäßigen histopathologischen Untersuchung, die hohen Kosten einer chemotherapeutischen Behandlung und die teilweise ethischen wie auch fachlichen Vorbehalte gegenüber einer Chemotherapie sind unbegründet und sollten überwunden werden. Mit der Durchführung weniger prognostischer Tests läßt sich eine gute Indikation für das Verhalten caniner maligner Lymphome geben, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Die AgNORs erwiesen sich in der multivariaten Analyse sowohl PCNA als auch Ki-67 als eindeutig prognostisch überlegen. Der Hauptgrund liegt in der unterschiedlichen Information, welche sich aus den verschiedenen Markern ableiten läßt. Zellen, die mit PCNA oder Ki-67 positiv reagieren, werden nur als positiv hinsichtlich ihrer Proliferationsaktivität, genauer gesagt ihres Aufenthalts in einer bestimmten Zellzyklusphase beurteilt, wogegen die AgNORs zusätzliche Informationen zur Proliferationsgeschwindigkeit liefern.

Die besten Voraussetzungen für die Auswertung von AgNORs sind mit dem Einsatz der Mikroskopbildanalyse gegeben. Besonders die AgNOR-Fläche erwies sich als entscheidender prognostischer Faktor für die Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom. Für die Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom waren außerdem die maximale Distanz zwischen zwei AgNORs und das Verhältnis der AgNOR-Summenfläche zur Zellkernfläche prognostisch signifikant. Der einzige, nicht-AgNOR-Parameter, der eine prognostische Signifikanz für die Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom ergab, war der Immunophänotyp. Für die krankheitsfreie Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom hatte die AgNOR-Anzahl die größte prognostische Bedeutung. Außerdem waren die AgNOR-Fläche, die AgNOR-Summenfläche und die maximale AgNOR-Fläche prognostisch signifikant für die krankheitsfreie Überlebenszeit einzelner Gruppen behandelter Hunde mit malignem Lymphom. Alle diese Parameter wurden mit der multivariaten Überlebensanalyse ermittelt. Die Notwendigkeit der Durchführung einer solchen Analyse ergibt sich aus dem Umstand der vielen, scheinbar signifikanten Parameter in der univariaten Analyse.

Aus diesen Ergebnissen kann auf eine schlechtere Prognose für Hunde mit malignem Lymphom vom T-Zell-Typ geschlossen werden. Mit der Erfassung der AgNOR-Fläche und der AgNOR-Anzahl läßt sich eine gute prognostische Bewertung vornehmen, da sich mit steigender AgNOR-Anzahl und verkleinernder AgNOR-Fläche die Prognose verschlechtert. Ein größerer Abstand zwischen zwei AgNORs, eine kleinere maximale AgNOR-Fläche und AgNOR-Summenfläche und ein größeres Verhältnis der AgNOR-Summenfläche zur Zellkernfläche sind ebenfalls mit einer schlechteren Prognose verbunden.

Zusätzlich zu diesen Parametern ergaben sich in der univariaten Analyse die folgenden Parameter als prognostisch signifikant: PCNA, Mitoserate und AgNOR-Typ sowie die AgNOR-Lokalisation. Ein hoher Anteil PCNA-positiver Zellen und eine hohe Mitoserate sind indikativ für eine schlechtere Prognose.

Der AgNOR-Typ ist ein Parameter, der besondere Beachtung verdient. Zwar konnte seine prognostische Signifikanz nur in der univariaten Analyse bestätigt werden, doch die prognostische Signifikanz verschiedener AgNOR-Flächen- und -Lageparameter in der multivariaten Analyse lassen einen stärkeren Zusammenhang vermuten. Eine Überarbeitung basierend auf den signifikanten AgNOR-Flächen- und -Lageparametern sollte zu einer Verbesserung der prognostischen Signifikanz führen. Der Vorteil dieses Parameters liegt in der einfachen und schnellen Anwendbarkeit. Weitergehende Untersuchungen auf diesem Gebiet sollten sich als nützlich herausstellen.

Für zukünftige Arbeiten sollte ein Vergleich verschiedener Behandlungsprotokolle mit einer parallelen Langzeitanalyse der Veränderungen des caninen malignen Lymphoms während der Behandlung angestrebt werden. Eine Mehrfachmarkierung mit verschiedenen Proliferationsmarkern kann sich in diesem Zusammenhang als hilfreich erweisen.

Die Ergebnisse für unbehandelte Hunde mit malignem Lymphom waren vergleichbar mit den Ergebnissen für behandelte Hunde mit malignem Lymphom. Allerdings war die Anzahl der untersuchten Hunde zu klein, um eine aussagekräftige Statistik durchführen zu können. Die ermittelten Werte sind indikativ für eine prognostische Bedeutung von AgNOR-Fläche und -Anzahl ebenso wie weiterer Flächen- und Lageparameter und des AgNOR-Typs. Zusätzlich haben Hunde mit malignem Lymphom mit hohem Anteil PCNA- und Ki-67-positiver Zellen eine schlechtere Prognose. Somit ergab sich nur in der univariaten Analyse für unbehandelte Hunde eine prognostische Signifikanz für Ki-67.

Die Ergebnisse lassen weiterhin die Schlußfolgerung zu, daß in caninen malignen Lymphomen weniger die Wachstumsfraktion oder der Phasen-Index eine entscheidende Rolle für die Proliferationsaktivität spielt, als vielmehr die Zellzyklusgeschwindigkeit, welche durch AgNORs erfaßt wird. Diese Beziehung mag auf dem Umstand beruhen, daß die Mehrheit aller caninen malignen Lymphome ohnehin hochmaligne ist und die Unterschiede in der Wachstumsfraktion zwischen einzelnen Tumoren keine große Rolle spielen, da sich die Mehrzahl der Tumorzellen im Zellzyklus befindet. Eine gesteigerte Proliferationsgeschwindigkeit deutet dagegen auf eine hohe metabolische Aktivität und das Potential zur Gewebeeinfiltration und Metastasierung hin. Somit sollten AgNORs als wichtigster prognostischer Faktor für die Bewertung caniner maligner Lymphome angesehen werden.

Ein Aspekt, der in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurde, ist die Tatsache, daß neben der Bewertung der Proliferationsaktivität eines Tumors auch der Verlust an Tumorzellen in einem bestimmte Zeitintervall eine wichtige Rolle spielt. Arbeiten zur Analyse der Apoptoserate werden an verschiedenen Institutionen durchgeführt und könnten einen entscheidenden Beitrag zur Klärung dieser Frage leisten. Weiterhin ist die Fähigkeit und die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung ein bedeutender Faktor in der prognostischen Beurteilung caniner maligner Lymphome. Eine gründliche, reproduzierbare Analyse einer großen Anzahl von Hunden mit malignem Lymphom, eine Adaptierung des chemotherapeutischen Protokolls an den morphologischen bzw. immunologischen Subtyp des Tumors und eine multivariate Statistik sind die Voraussetzung einer weiterreichenden prognostischen Bewertung caniner maligner Lymphome. Die Ergebnisse einer solchen Analyse sollten in einem ökonomisch vertretbaren, diagnostisch einfach zu handhabenden prognostischen Schlüssel für canine maligne Lymphome festgeschrieben werden.

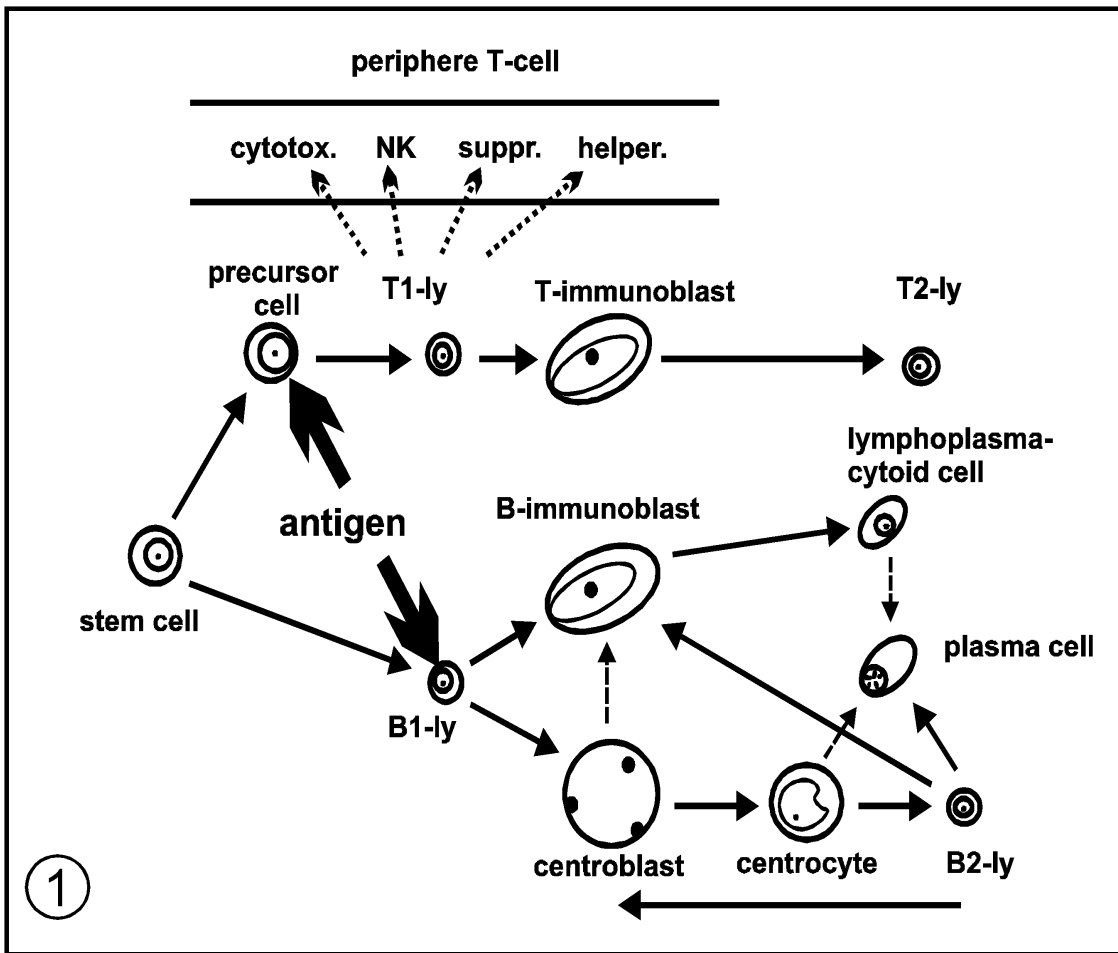
Zum gegenwärtigen Zeitpunkt bietet die hier vorgeschlagene AgNOR-Typenklassifikation, gekoppelt mit der Bestimmung des Immunophänotyp und der AgNOR-Anzahl, das schnellste, kostengünstigste und akkurateste Verfahren zur prognostischen Analyse caniner maligner Lymphome. Wenn die Möglichkeit einer Mikroskopbildanalyse besteht, sollte die durchschnittliche AgNOR-Fläche in die prognostische Beurteilung miteinbezogen werden. Eine längere Überlebenszeit behandelter Hunde mit malignem Lymphom korreliert mit Lymphomen vom B-Zell-Typ und einer größeren durchschnittlichen AgNOR-Fläche. Die AgNOR-Typen I und II und insbesondere ein kleinerer Abstand zwischen zwei AgNORs und ein kleineres Verhältnis zwischen der AgNOR-Summenfläche und der Zellkernfläche sind indikativ für eine längere Überlebenszeit. Eine längere krankheitsfreie Überlebenszeit korreliert mit einer kleineren AgNOR-Anzahl pro Zellkern. Die AgNOR-Typen I und II und insbesondere eine größere AgNOR-Fläche, eine größere AgNOR-Summenfläche und eine größere maximale AgNOR-Fläche sind indikativ für eine längere krankheitsfreie Überlebenszeit.

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 7. Abbildungen

### 7.1. Histomorphologie

#### T- und B-Lymphozytensystem



**Abb. 1:** Vereinfachtes Schema des T- und B-Lymphozytensystems (nach Lennert et Feller 1990). ly = Lymphozyt  
 Die Abbildung zeigt die wichtigsten Zellen der lymphatischen Reihe einschließlich ihrer Funktionsformen. Aus einer hämatopoetischen Stammzelle gehen Vorläuferzellen der T- und B-Zellreihe hervor. Durch Antigenstimulation wird sowohl der T<sub>1</sub>-Lymphozyt in einen großen basophilen Blasten (T-Immunoblast) umgewandelt, als auch der B<sub>1</sub>-Lymphozyt in einen Immunoblasten (bei Primärantwort) oder in eine Keimzentrumszelle (bei Primär- und besonders bei Sekundärantwort). Aus letzteren entstehen einerseits Vorläuferzellen der Immunoblasten und andererseits B<sub>2</sub>-Lymphozyten, die das immunologische Gedächtnis tragen.

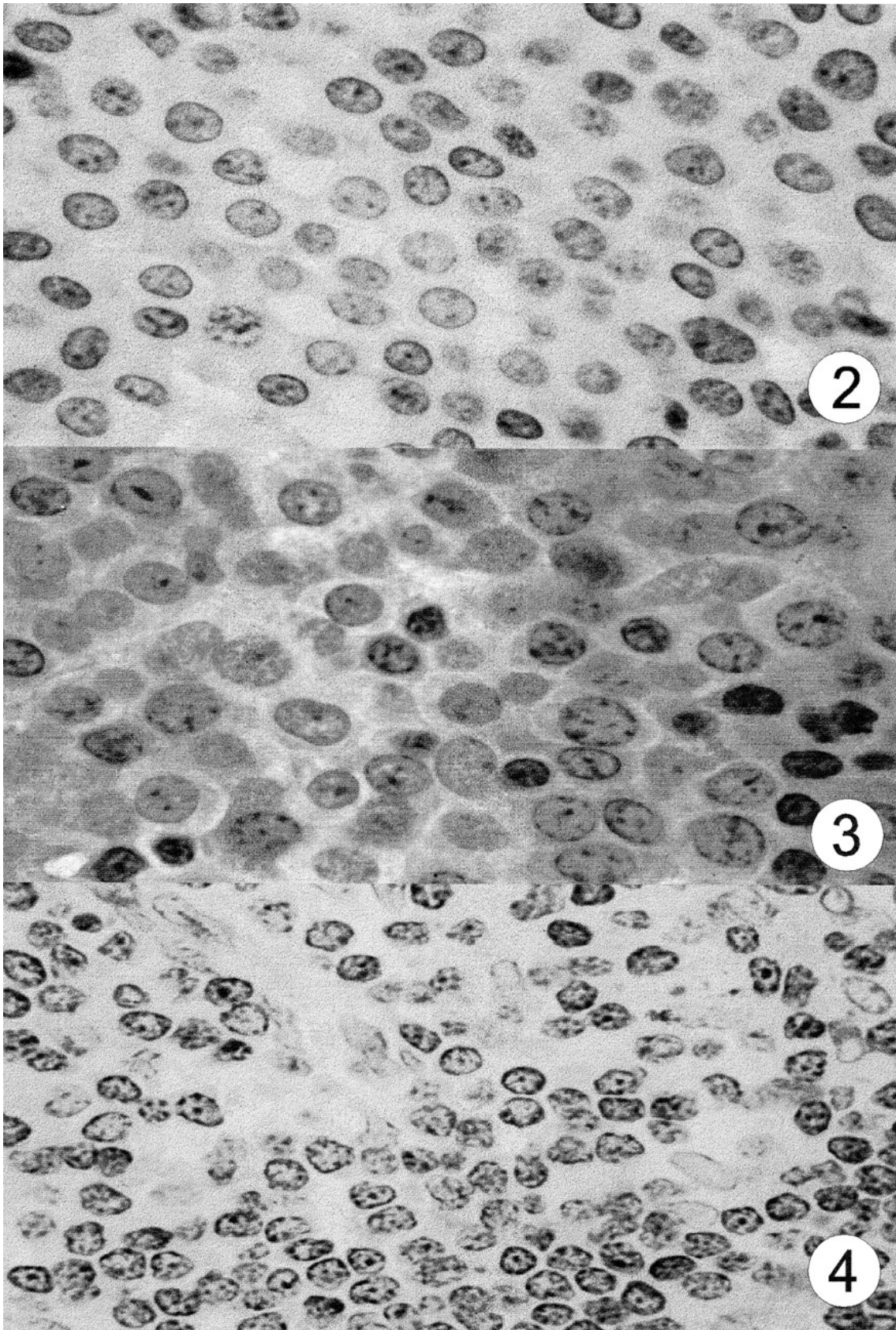
### Niedrigmaligne Lymphome

**Abb. 2:** Canines malignes Lymphom, Immunozytom, lymphoplasmazytoider Subtyp.  
 Zwischen den vorherrschenden kleinen Lymphozyten sieht man einige plasmazytoide Zellen und wenige Keimzentrumszellen.  
 HE-Färbung  
 Vergr. 1000:1

**Abb. 3:** Canines malignes Lymphom, Immunozytom, polymorpher Subtyp.  
 Die Polymorphie ist beträchtlich. Auch hier herrschen kleine Lymphozyten vor. Außerdem treten große und mittelgroße Blasten auf, plasmazytoide Zellen sowie Plasmazellen.  
 HE-Färbung  
 Vergr. 1000:1

**Abb. 4:** Canines malignes Lymphom, zentroblastisch-zentrozytisches Lymphom.  
 In der Abbildung sind hauptsächlich Zentrozyten mit dem typischen gekerbten Zellkern zu erkennen. Einige Zellen sind „multilobulated“.  
 Giemsa-Färbung  
 Vergr. 1000:1





### Hochmaligne Lymphome

**Abb. 5:** Canines malignes Lymphom, zentroblastisches Lymphom, monomorpher Subtyp.

Relativ uniforme Population von mittelgroßen bis großen Zentroblasten mit den typischen vesikulären, runden Zellkernen und den deutlichen randständigen Nukleolen.

HE-Färbung  
Vergr. 1000:1

**Abb. 6:** Canines malignes Lymphom, zentroblastisches Lymphom, polymorpher Subtyp.

Größe und Form der Blasten variieren beträchtlich. Neben den typischen Zentroblasten treten Immunoblasten mit großen solitären, zentral gelegenen Nukleolen und zentrozytenähnliche Zellen auf.

Giemsa-Färbung

Vergr. 1000:1

**Abb. 7:** Canines malignes Lymphom, zentroblastisches Lymphom, zentrozytoider Subtyp.

Charakteristische Zentroblasten sind in der Minderheit. Mittelgroße Zellen mit „multilobulated“ Kernen, irregulären Kernformen und multiplen kleinen Nukleolen dominieren das Bild.

Giemsa-Färbung

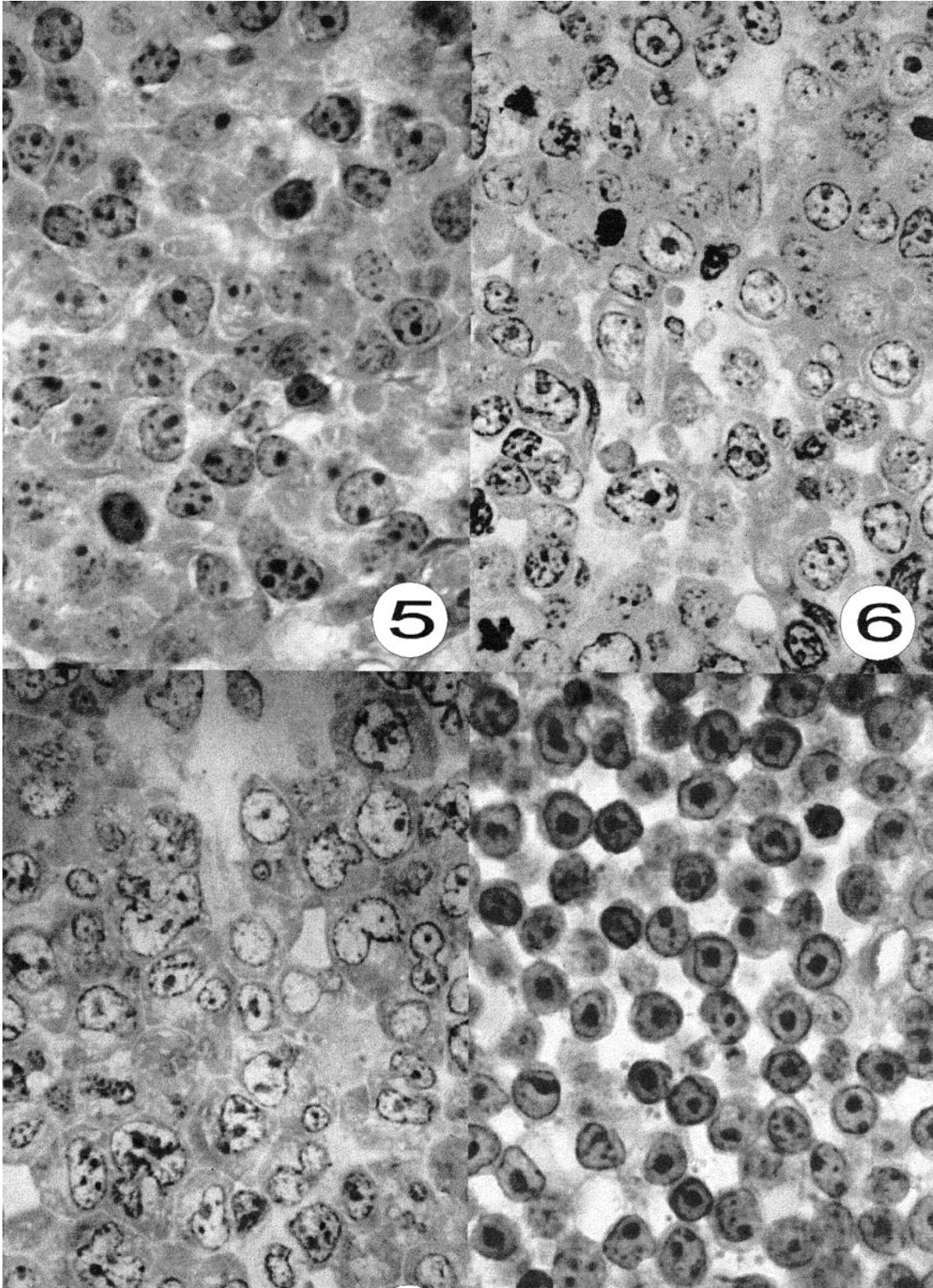
Vergr. 1000:1

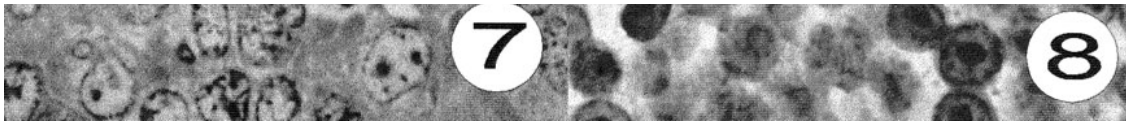
**Abb. 8:** Canines malignes Lymphom, Immunoblastom.

Das Bild wird beherrscht von mittelgroßen Immunoblasten. Der große, solitäre, zentral gelegene Nukleolus („Bulls eye“) ist auffällig.

HE-Färbung

Vergr. 1000:1





[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 7.2. Immunophänotyp

### T-Zell-Marker CD3

**Abb.9** : Canines malignes Lymphom, vom T-Zell-Typ.

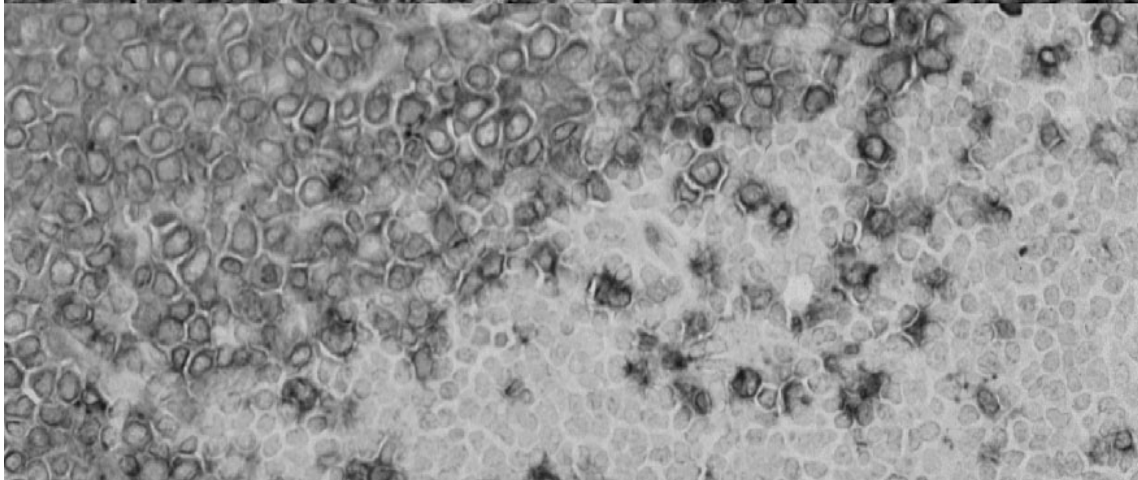
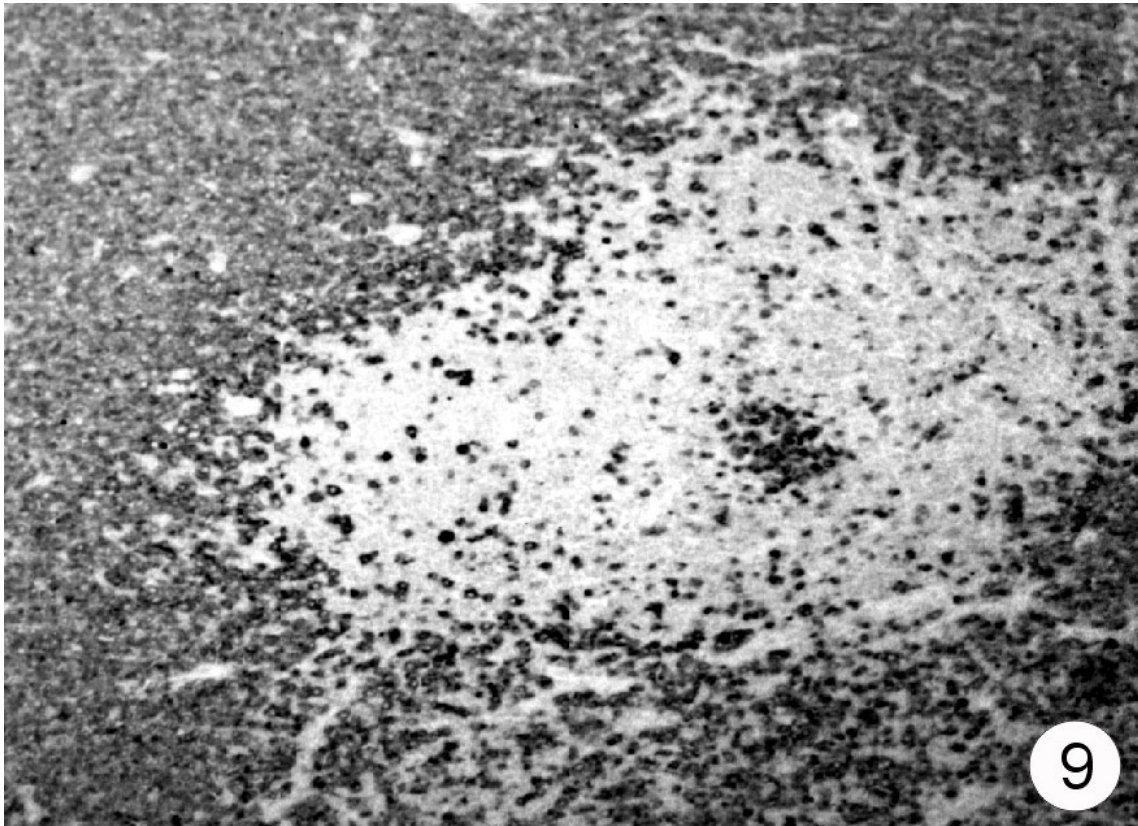
Mittels des Anti-CD3 Antikörpers ist es möglich, T-Lymphozyten in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe zu markieren (Ferrer et al. 1992). In der Abbildung ist die immunocytochemische Demonstration des CD3-Antigens in parakortikal gelegenen T-Zellen deutlich. Follikulär gelegene Lymphozyten sind negativ.

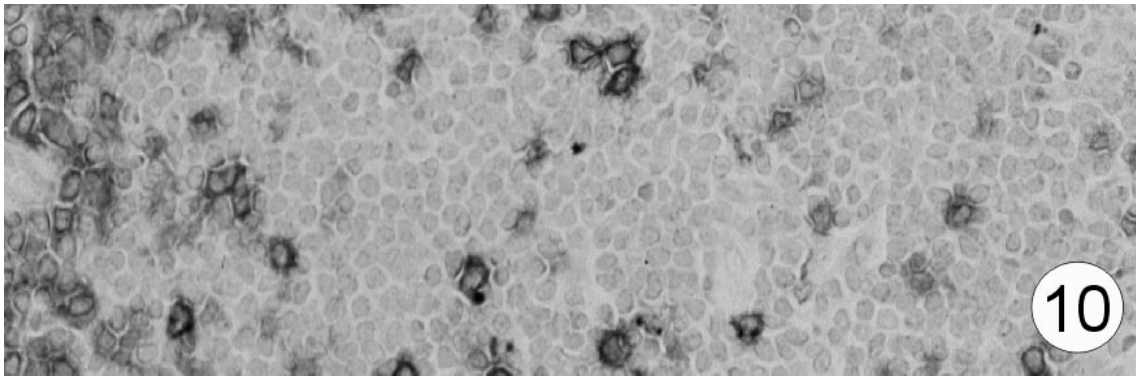
CD3-Markierung mit Avidin-Biotin-Komplex und Gegenfärbung mit Hämatoxylin  
Vergr. 200:1

**Abb.10** : Canines malignes Lymphom, vom T-Zell-Typ.

Stärkere Vergrößerung der vorherigen Abbildung. Auch hier wird das CD3-Antigen immunocytochemisch demonstriert. Die parakortikalen Lymphozyten zeigen eine intensive Membranreaktion.

CD3-Markierung mit Avidin-Biotin-Komplex und Gegenfärbung mit Hämatoxylin  
Vergr. 1000:1





#### B-Zell-Marker CD79a

**Abb.11** : Canines malignes Lymphom, vom T-Zell-Typ.

Durch den Anti-CD79a-Antikörper werden alle B-Lymphozyten markiert. Da die lymphozytären Rezeptoren evolutionär sehr stabil sind, ist die Verwendung eines humanen Markers möglich. Die Abbildung zeigt das schon in Abb. 9 und 10 dargestellte Lymphom. Auffallend sind die wenigen verbliebenen follikulären Zentren mit markierten B-Lymphozyten.

CD79a-Markierung mit Avidin-Biotin-Komplex und Gegenfärbung mit Hämatoxylin

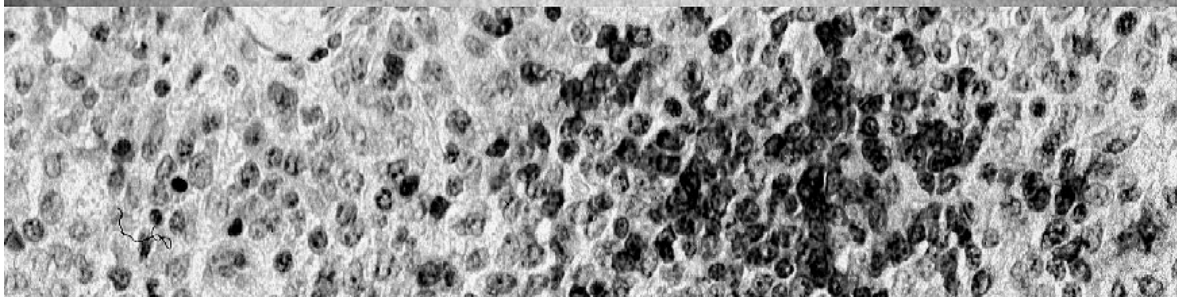
Vergr. 100:1

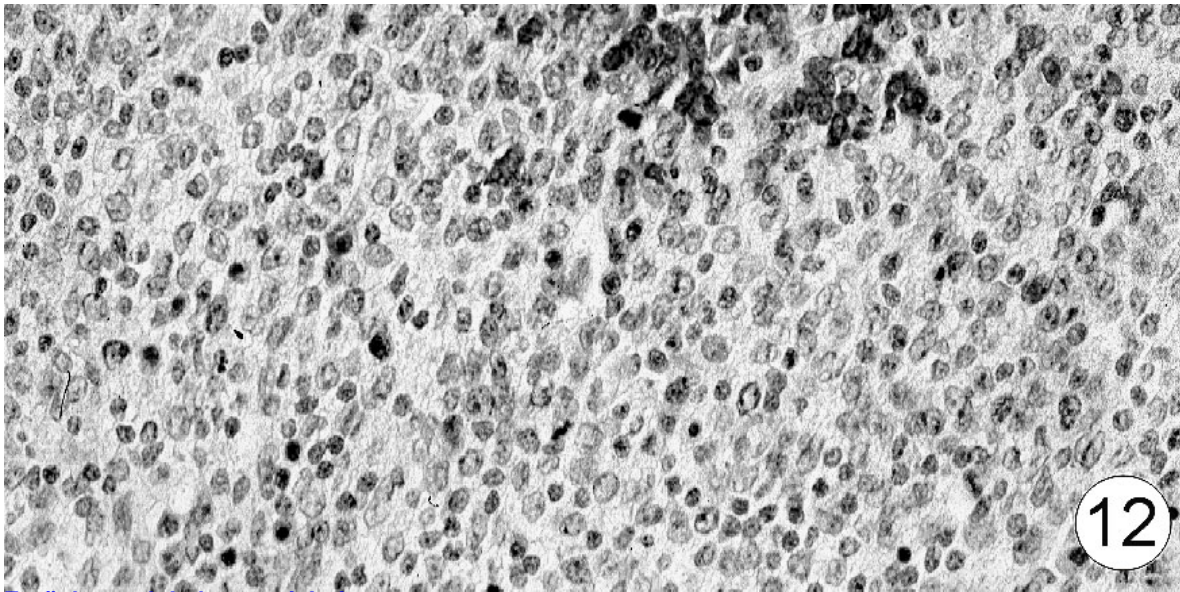
**Abb.12** : Canines malignes Lymphom, vom T-Zell-Typ.

Starke Vergrößerung der vorherigen Abbildung. Die follikulär gelegenen B-Lymphozyten zeigen eine intensive Membranreaktion, die das CD79a-Antigen immunozytochemisch demonstriert.

CD79a-Markierung mit Avidin-Biotin-Komplex und Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Vergr. 800:1





[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

### 7.3. Proliferationsmarker

#### Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

**Abb. 13 :** Canines malignes Lymphom, niedrigmalignes Lymphom.

Das 36 kDalton Molekül PCNA fungiert als Co-Faktor der DNA-Polymerase  $\delta$  sowohl in der S-Phase als auch während DNA-Reparaturen. Sein Auftreten in der S-Phase ist durch eine stark granuläre Erscheinungsform im Zellkern charakterisiert. Nur solche Zellen, in der Abbildung deutlich in der Minderheit, sind für eine Beurteilung der Proliferation, genauer des S-Phasen-Index, heranzuziehen.

PCNA-Markierung mit Avidin-Biotin-Komplex und Gegenfärbung mit Hämatoxylin

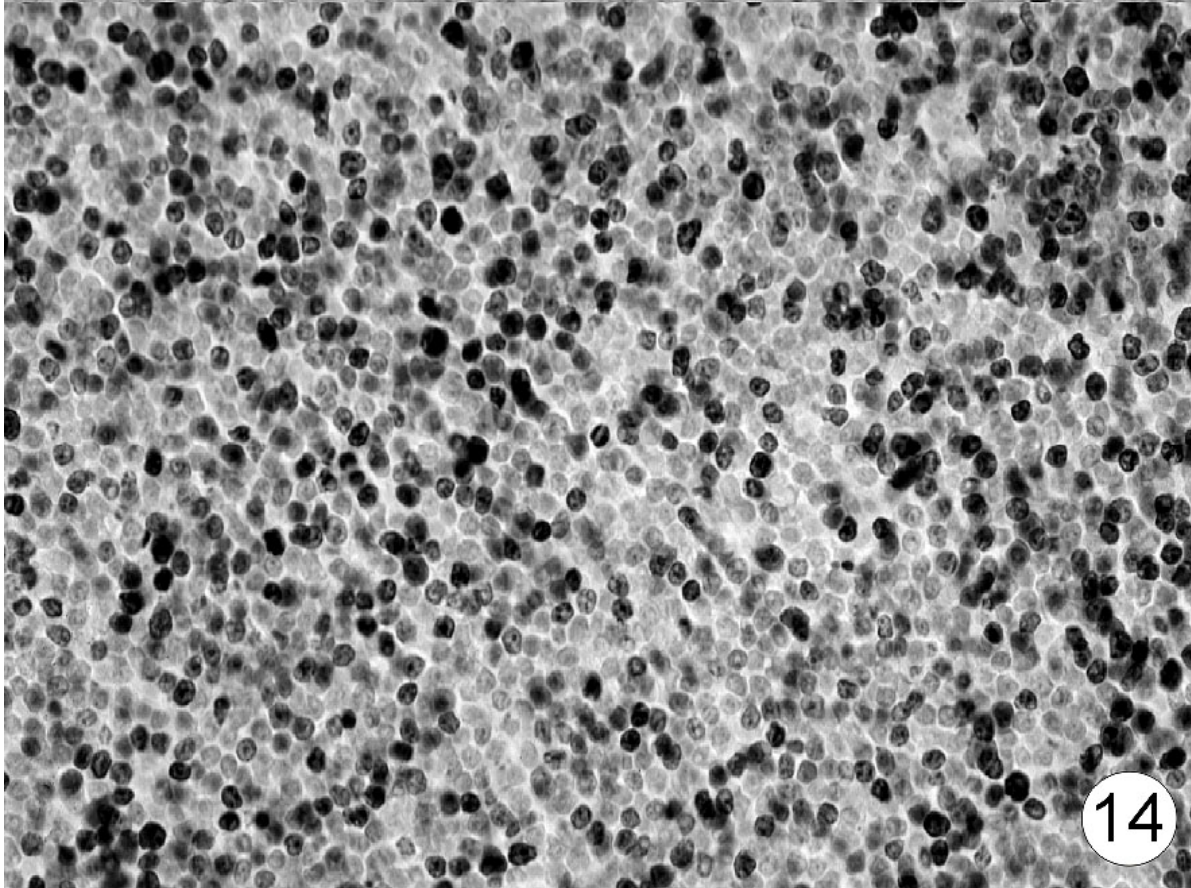
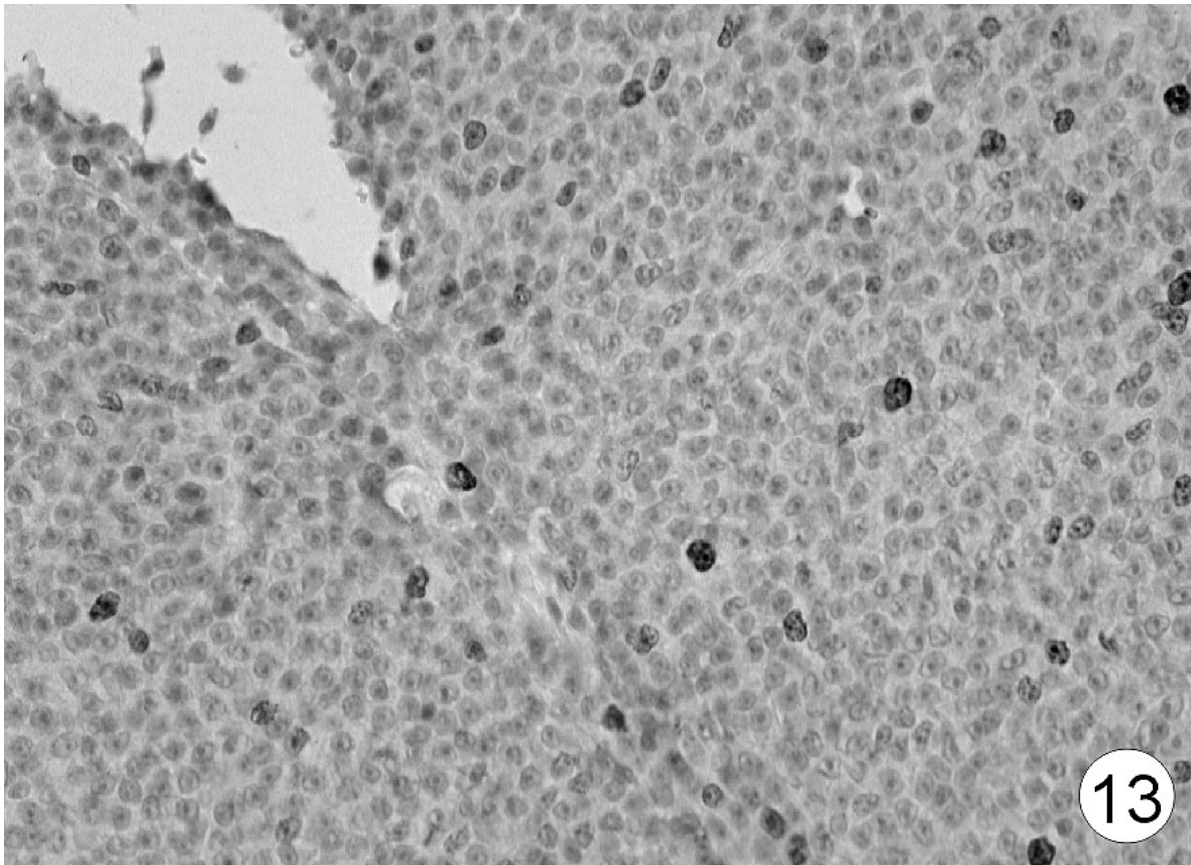
Vergr. 800:1

**Abb. 14 :** Canines malignes Lymphom, hochmalignes Lymphom.

PCNA ist ein sehr konservatives Protein und somit nicht nur in Säugetieren sondern auch in Pflanzen vorkommend. In menschlichen Tumoren konnte der Anteil von Zellen in der S-Phase nach immunohistochemischer Markierung mit PC10, das an PCNA bindet, erfaßt werden. Die Abbildung zeigt einen hohen Prozentsatz markierter Zellen in einem hochmalignen Lymphom.

PCNA-Markierung mit Avidin-Biotin-Komplex und Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Vergr. 800:1



#### Ki-67

**Abb. 15** : Canines malignes Lymphom, niedrigmalignes Lymphom.

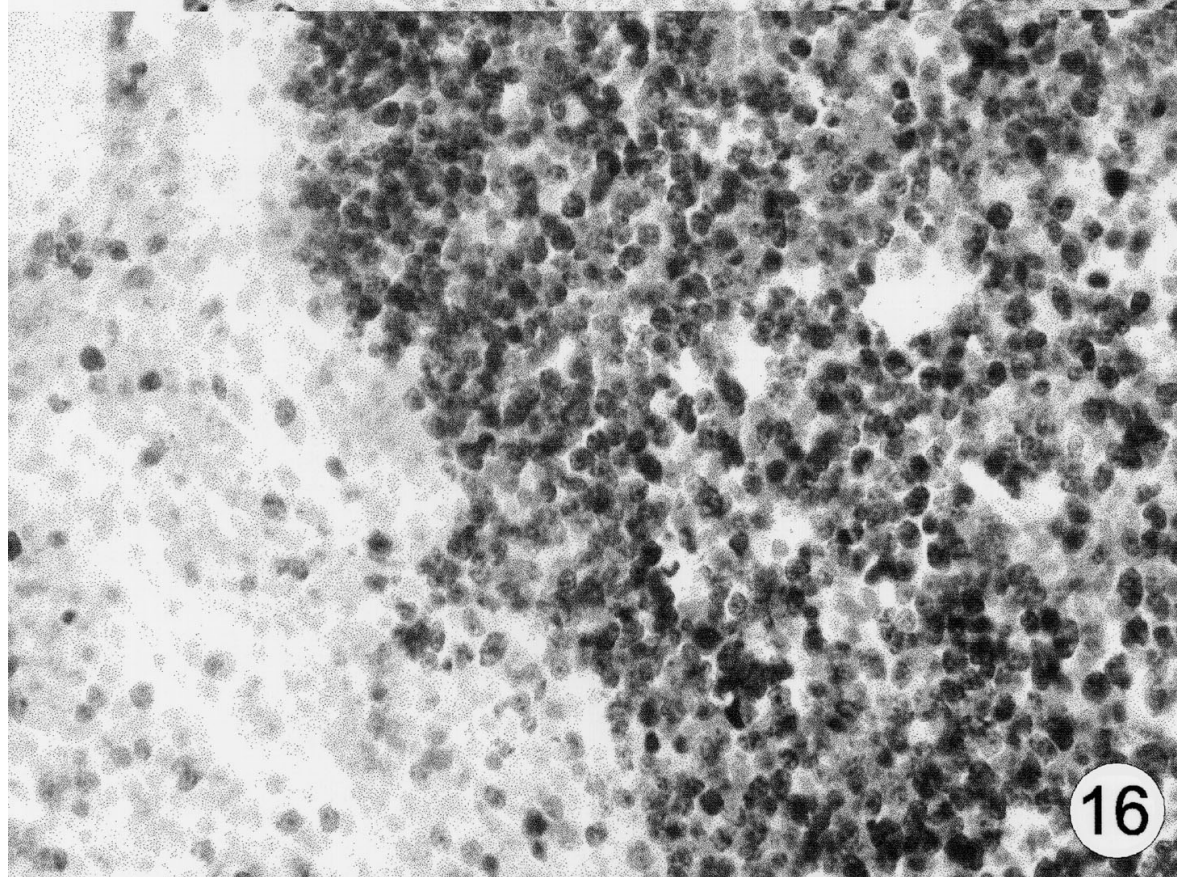
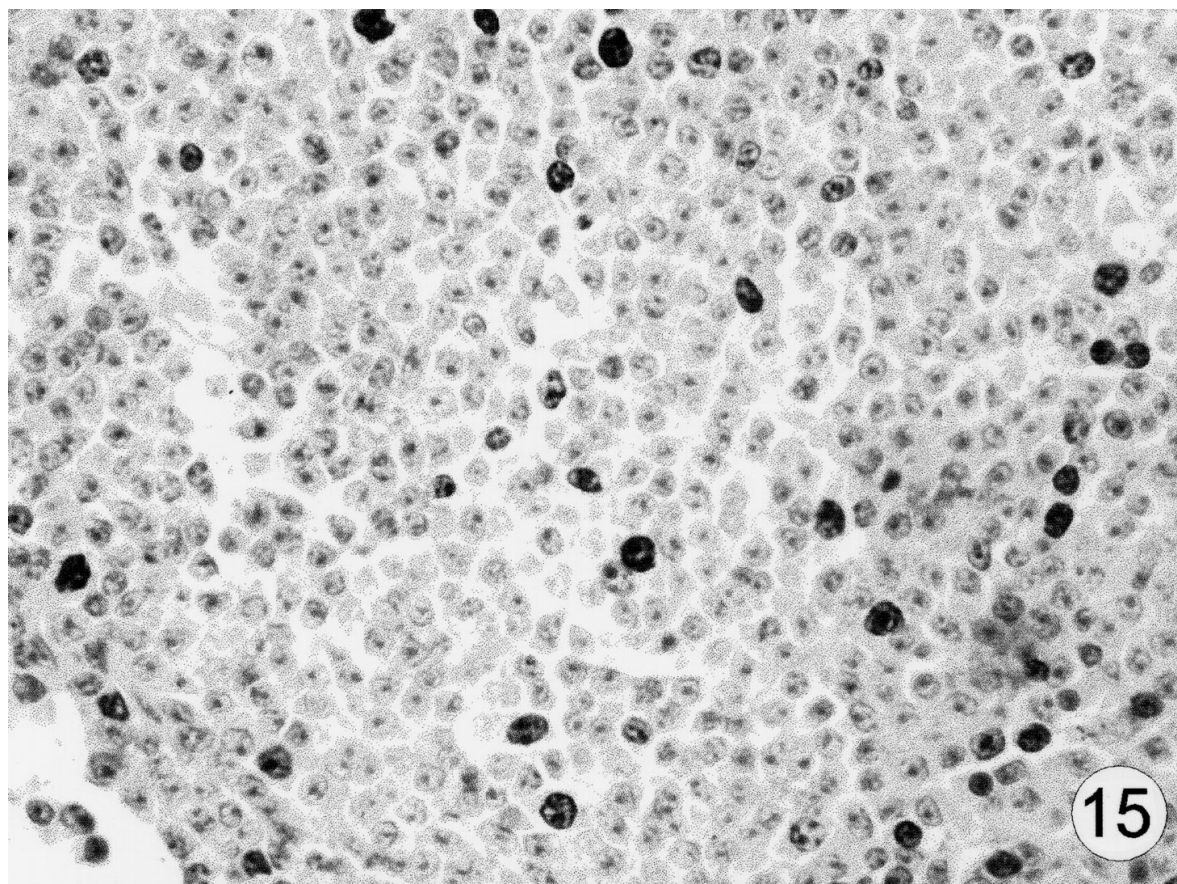
Der monoklonale Antikörper MIB-1 reagiert mit dem Ki-67 Nuklear-Antigen (ein 345 und 395 kDa Doppelband bei der Analyse von proliferierenden Zellen mit Western Blot). Es ist assoziiert mit der Wachstumsfraktion und tritt in allen Phasen des Zellzyklus ( $G_1$ , S,  $G_2$ , M) auf, jedoch nicht in ruhenden ( $G_0$ ) Zellen (Gerdes et al. 1984). Die Abbildung zeigt nur einige wenige immunoreaktive Zellkerne.

Vergr. 1000:1

**Abb. 16** : Canines malignes Lymphom, hochmalignes Lymphom.

Die Abbildung zeigt einen Tumor follikulären Typs mit einem hohen Anteil positiver Zellen. Die Anwendung des Antikörpers MIB-1 an paraffinfixiertem Material wird möglich nach vorherigem Kochen der Schnitte in einer Zitrat-Puffer-Lösung. Markierung mit Avidin-Biotin-Komplex und Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Vergr. 800:1



## Argyrophile Nukleolus organisierende Regionen (AgNORs)

### Qualitative Beurteilung

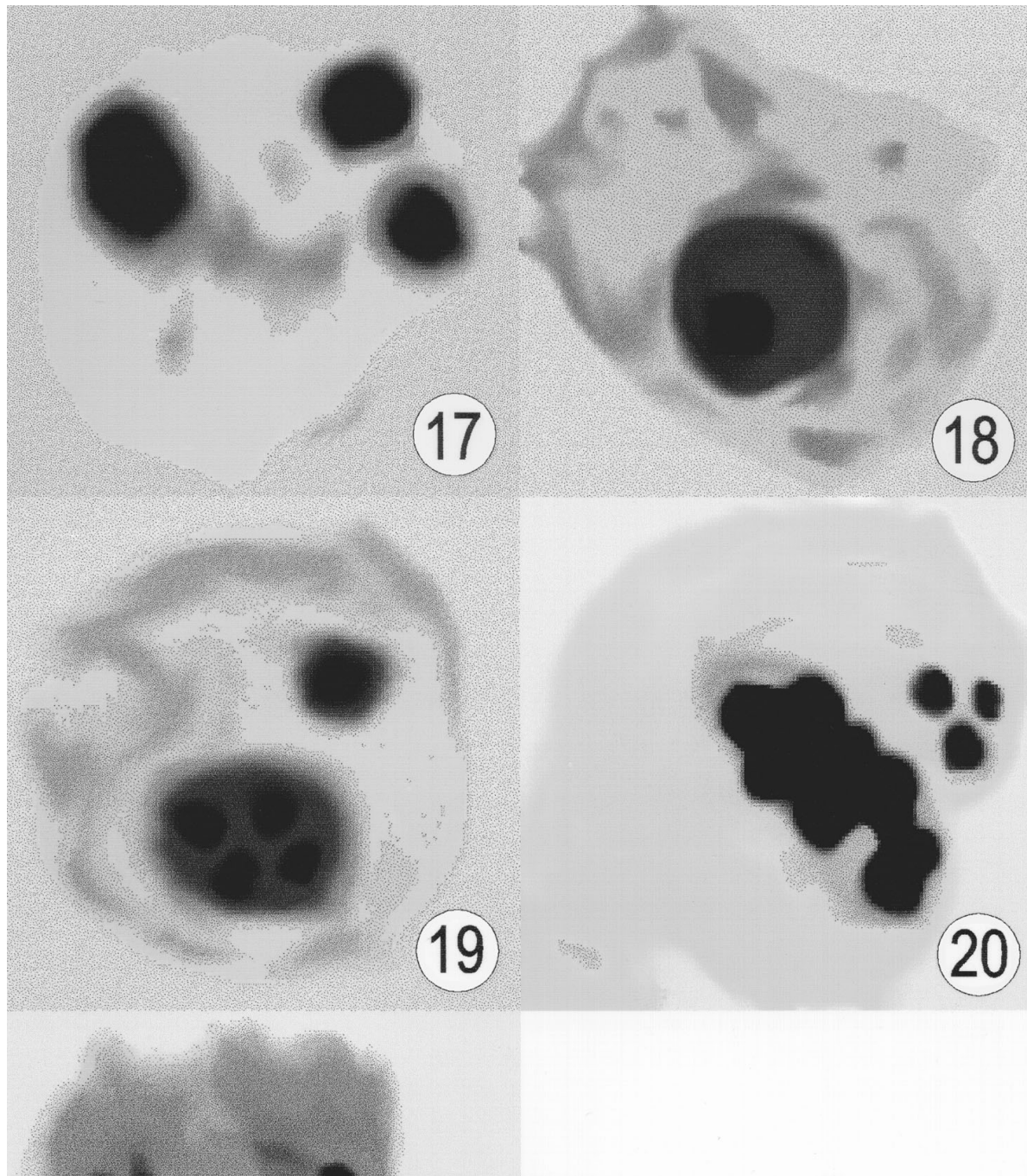
**Abb. 17:** Im Typ 1 sind die NORs vollkommen aggregiert und formen eine solitäre, abgerundete, argyrophile Struktur, die oft als AgNOR beschrieben wird, wobei es sich aber eigentlich um den Nukleolus als solchen handelt. Zellen dieses Typs zeigen meist 1 bis 5 solcher Strukturen und sind charakteristisch für Zellen der 1. Generation oder „ruhende“ Zellen, also Zellen niedriger Malignität.

**Abb. 18:** Große, zentral gelegene Nukleolen mit einem großen, oft randständigen oder auch keinem AgNOR im Inneren sind charakteristisch für den Typ 2. Es scheint sich meist um Zellen der 1. Generation, also Zellen niedriger Malignität zu handeln.

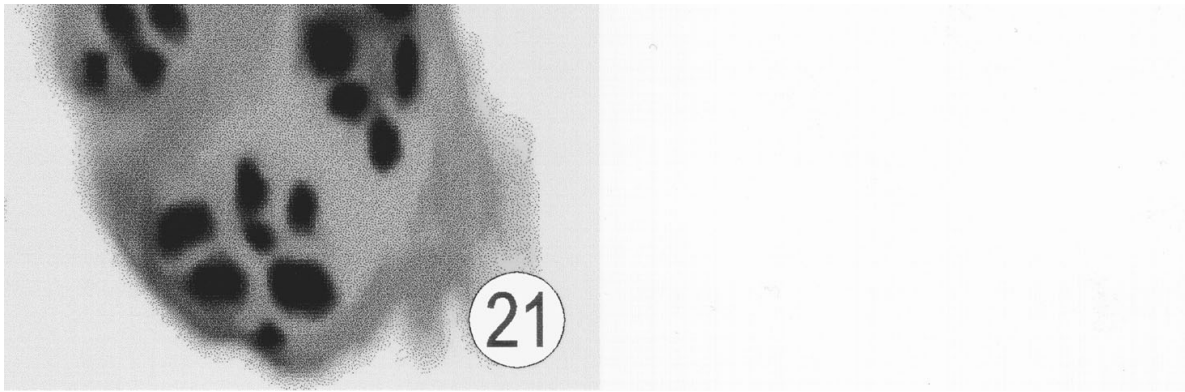
**Abb. 19:** Beim Typ 3 können AgNORs innerhalb des Nukleolus als einzelne Strukturen beobachtet werden. Dieses Verteilungsmuster weist eine große Häufigkeit auf und ist charakteristisch für proliferierende Zellen. Typ 3 ist stets von höherer Malignität als Typ 1 oder 2. Anzahl, Größe und Aggregation der im Nukleolus gelegenen AgNORs scheinen direkt mit der Malignität zu korrelieren.

**Abb. 20:** Für Typ 4 ist charakteristisch, daß eine große Anzahl von AgNORs irreguläre Aggregationen formen, aber die einzelnen AgNORs sind noch deutlich zu erkennen. Im Gegensatz zu Typ 2 sind hier die Zusammenballungen granuliert und oft kleiner, dafür aber in größerer Anzahl vorhanden. Diese Strukturen können frei im Zellkern oder im Nukleolus beobachtet werden und sind stets ein Ausdruck für Zellen hoher Malignität.

**Abb. 21:** Oft sehr kleine, aber in großer Anzahl vorliegende AgNORs kennzeichnen den Typ 5. Diese Strukturen sind charakteristisch für proliferierende Zellen und vor allem in Zellen späterer Generationen anzutreffen. Typ 5 repräsentiert Zellen hoher Malignität.







### Quantitative Beurteilung

#### **Abb. 22 :** Canines malignes Lymphom, niedrigmalignes Lymphom

Nur wenige AgNORs sind in den Zellen vorhanden. Sie sind vollkommen aggregiert und formen solitäre, abgerundete Strukturen, die eigentlichen Nukleolen, oder sie sind in den großen, zentral gelegenen Nukleolen als einzelne, oft randständige AgNORs zu erkennen. Solche Strukturen charakterisieren niedrigmaligne Lymphome mit kleiner AgNOR-Anzahl und großer AgNOR-Fläche.

Silberfärbung nach Ploton et al. 1986.

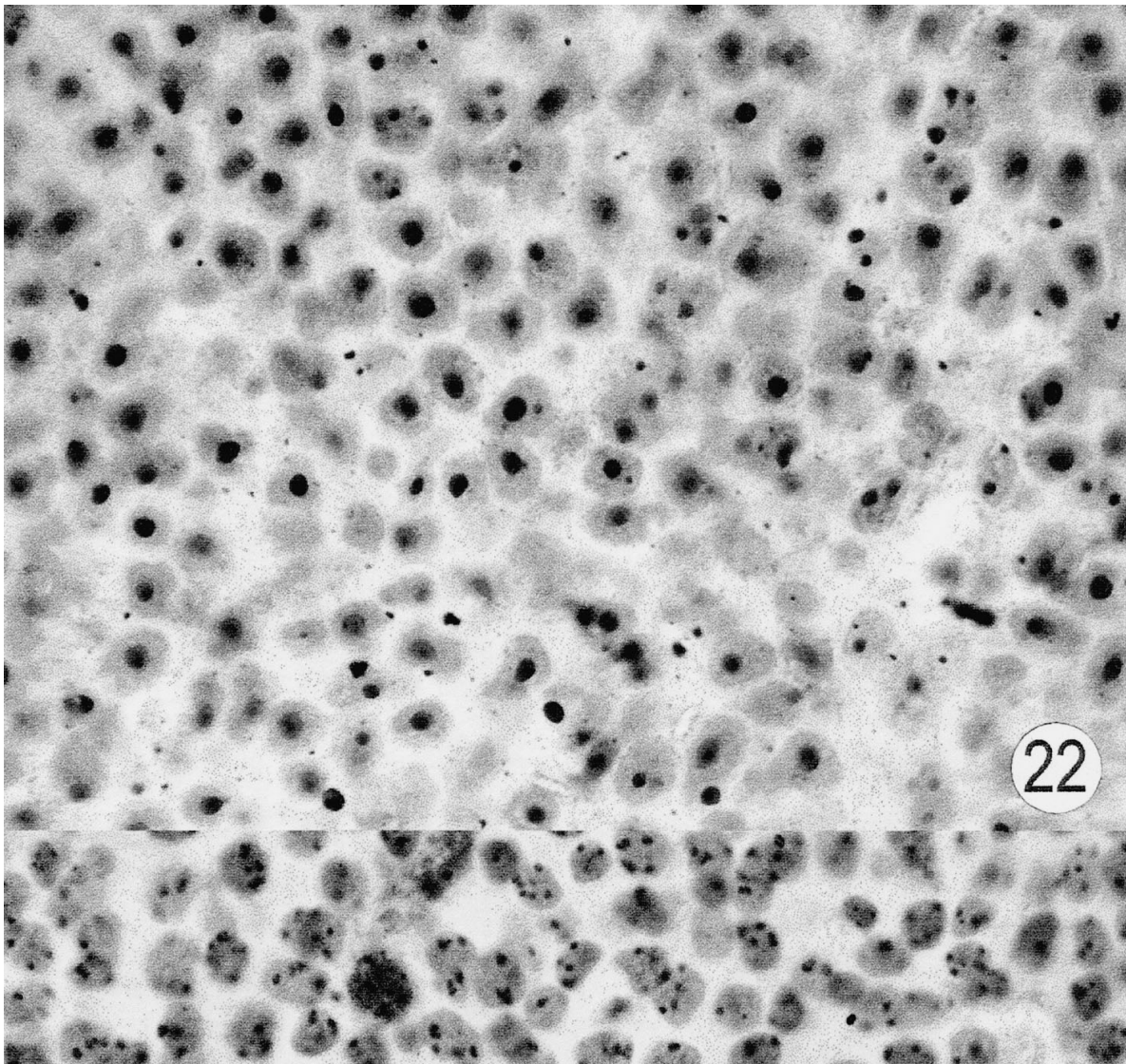
Vergr. 1000:1

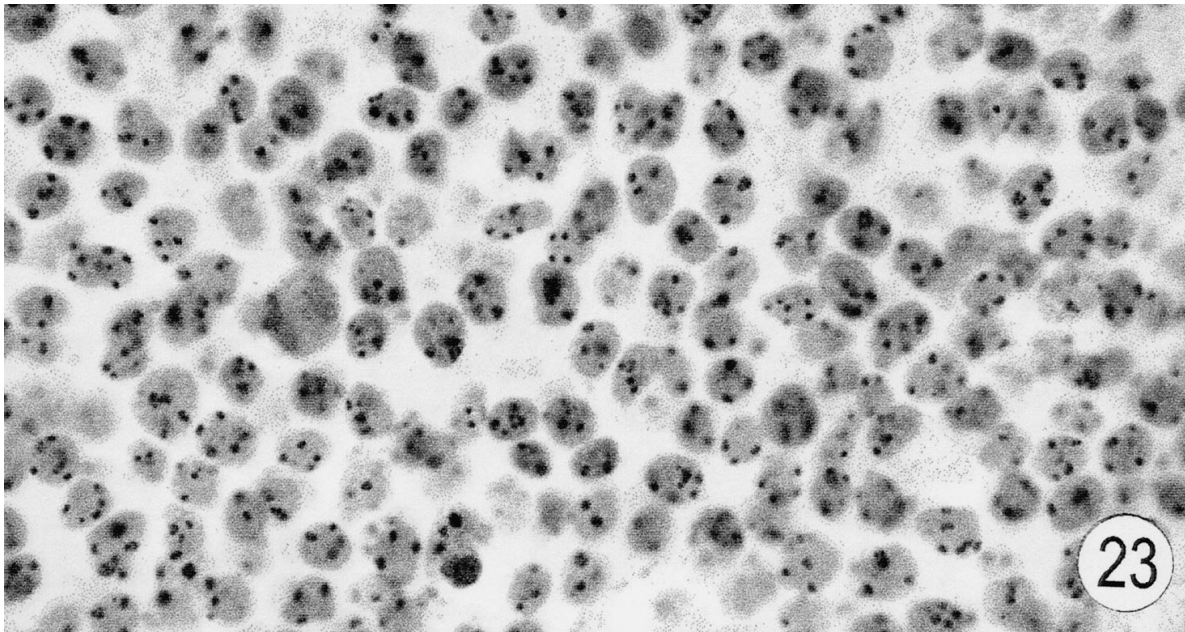
#### **Abb. 23 :** Canines malignes Lymphom, hochmalignes Lymphom

Jede Zelle enthält mehrere schwarze Punkte, die zum Teil als deutlich einzeln gelegene, gut umschriebene Strukturen zu erkennen sind, zum Teil aus Konglomeraten kleiner AgNORs bestehen. Die irregulären Aggregationen bestimmen das Bild und sind charakteristisch für hochmaligne Lymphome mit großer AgNOR-Anzahl und kleiner AgNOR-Fläche.

Silberfärbung nach Ploton et al. 1986.

Vergr. 1000:1





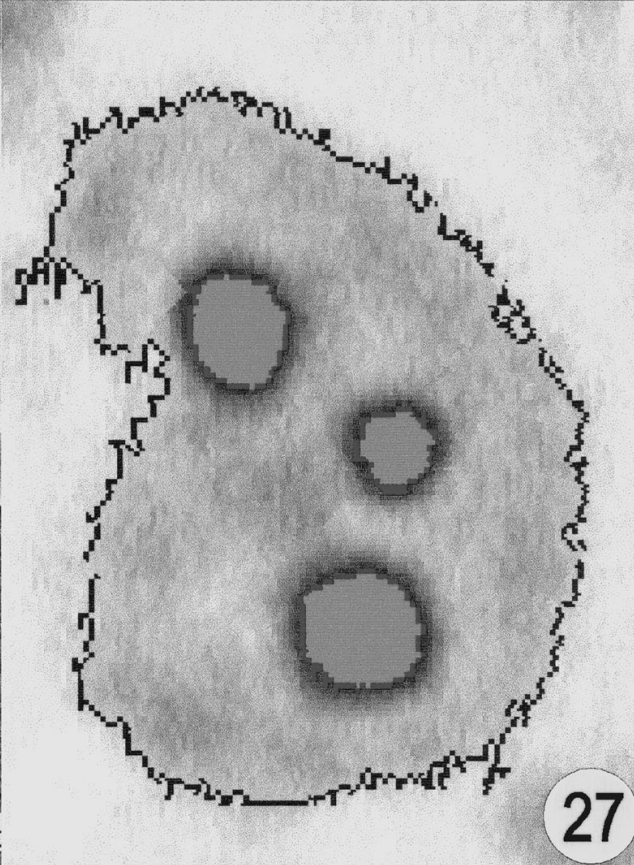
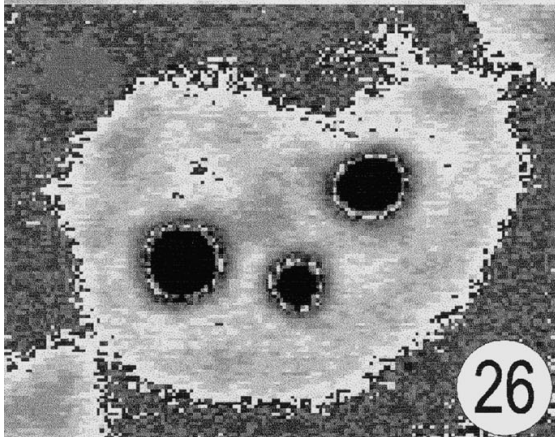
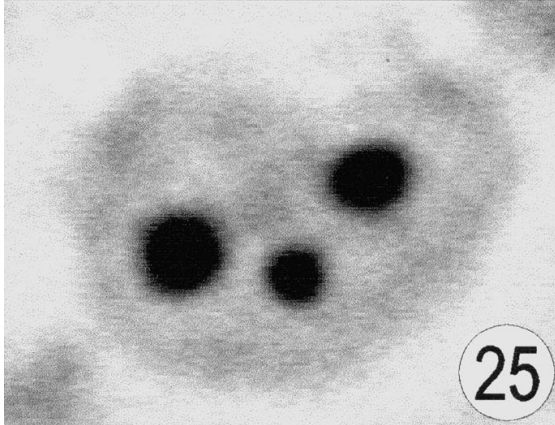
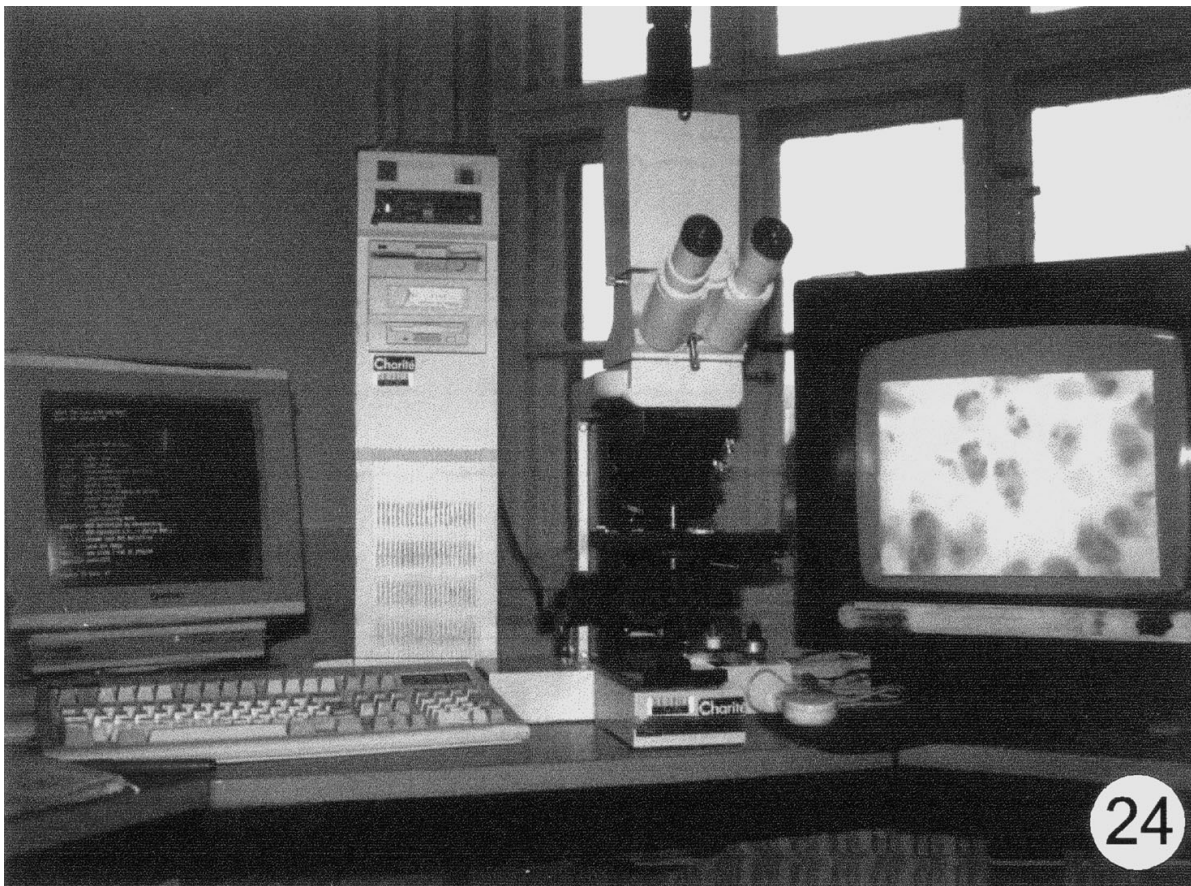
### Mikroskopbildanalyse

**Abb. 24:** Das Bildverarbeitungssystem BVS A6471 (Robotron, Berlin) basiert auf einem PDP-11(DEC)-kompatiblen Rechner, der durch zusätzliche elektronische Baugruppen erweitert wurde. Der Speicherbereich der Grafik hat eine Kapazität von 768x512 Bildpunkten x 8 bit Intensität. Ein JENAVAL-Mikroskop mit angeschlossener Kamera dient hierbei der Bilderzeugung.

**Abb. 25:** Zur Bildverarbeitung dient das interaktive automatische Bildverarbeitungssystem AMBA (Roth et Wenzelides 1989). Nach Abtastung des Mikroskopbildes durch den Image Dissector wird dem Rechner ein Bild von 4096x4096 Punkten, die in Abhängigkeit von der gewählten Mikroskopbildvergrößerung eine genau festgelegte Größe besitzen, geliefert.  
Vergr. 4000:1

**Abb. 26:** Die Lichtintensitäten der einzelnen Bildpunkte werden mit einer Genauigkeit von 1024 Grauwertstufen dem Rechner zugeführt. Das eingelesene Bild wird dann in ein 384x384-Punkte-Bild mit 16 Grauwertstufen transformiert. Um Objekte im Grauwertbild zu trennen ist eine Objektsegmentierung notwendig. Voraussetzung dafür ist eine Transformation des Grauwertbildes in ein Binärbild. Der gute Kontrast zwischen AgNORs und Zellkernen gestattet die exakte Festlegung eines Schwellenwertes für die Binarisierung.  
Vergr. 4000:1

**Abb. 27:** Von den 8 Bits werden die oberen 2 mit 0 belegt. Dies erlaubt es, Strukturen im Grauwertbild farbig zu markieren. Somit werden die Flächen von Zellkern und AgNORs und auch deren Anzahl und Lage als Primärdaten erfaßt. Miteinander verclusterte AgNORs können vom System als Konglomerate erkannt werden. Nur als Einzelstrukturen erkannte AgNORs werden durch Umrandung, wie in der Abbildung ersichtlich, markiert.  
Vergr. 4000:1



[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 8. Tabellen

### [8.1. Lymphom-Klassifikation](#)

Rappaport Klassifikation

Kiel-Klassifikation

aktualisierte Kiel-Klassifikation

Working Formulation

## **8.2. Behandlungsprotokolle**

Utrecht

Cambridge

## **8.3. AgNORs - Einsatz in der Pathologie**

Arbeiten mit prognostischem Nutzen an Tumoren des Menschen

Arbeiten ohne prognostischem Nutzen an Tumoren des Menschen

Arbeiten zur Beurteilung humaner non-Hodgkin's Lymphome

Arbeiten zur Beurteilung caniner Tumoren

## **8.4. Reproduzierbarkeit**

AgNOR-Parameter und ihre Reproduzierbarkeit

## **8.5. Überlebensanalysen**

Univariate Analyse zur krankheitsfreien Überlebenszeit und zur Überlebenszeit behandelter Hunde mit malignem Lymphom

Univariate Analyse zur Überlebenszeit unbehandelter Hunde mit malignem Lymphom

Multivariate Analyse zur krankheitsfreien Überlebenszeit

Multivariate Analyse zur Überlebenszeit

## **8.6. Überlebenszeiten**

Überlebenszeiten unbehandelter Hunde mit malignem Lymphom

Überlebenszeiten behandelter Hunde mit malignem Lymphom

## **8.1. Lymphom-Klassifikation**

**Tabelle 1: Rappaport Klassifikation der non-Hodgkin's Lymphome, 1966**

Kategorie	
lymphozytisch, hochdifferenziert	nodulär/diffus
lymphozytisch, niedrigdifferenziert	nodulär/diffus
gemischt lymphozytisch-histiozytisch	nodulär/diffus
histiozytisch	nodulär/diffus
undifferenziert	überwiegend diffus

**Tabelle 2: Kiel-Klassifikation der non-Hodgkin's Lymphome, Lennert et Mohri 1978**

Lymphome von niedrigem Malignitätsgrad
--

Lymphozytisch
B-CLL, T-CLL
Haarzellenleukämie
Mycosis fungoides, Sezary-Syndrom
T-Zonenlymphom
Lymphoplasmazytisch/-zytoid (Immunozytom)
lymphoplasmazytisch
lymphoplasmazytoid
polymorph
Plasmazytisch
Zentrozytisch
Zentroblastisch/zentrozytisch
follikulär/diffus ± Sklerose

**Lymphome von hohem Malignitätsgrad**

Zentroblastisch
monomorph
polymorph
zentrozytoid
Lymphoblastisch
Burkitt-Typ
"convoluted"-Zell-Typ
unklassifiziert
Immunoblastisch

**Tabelle 3: Aktualisierte Kiel-Klassifikation der non-Hodgkin´s Lymphome, Lennert et Feller 1990**

B	T
<b>Lymphome von niedrigem Malignitätsgrad</b>	
Lymphozytisch	Lymphozytisch
chronisch lymphozytische Leukämie	chronisch lymphozytische Leukämie
Prolymphozytenleukämie	Prolymphozytenleukämie
Haarzellenleukämie	
	Kleinzellig zeribriform

	Mycosis fungoides, Sezary-Syndrom
Lymphoplasmazytisch/-zytoid (Immunozytom)	Lymphoepitheloid (Lennert-Lymphom)
lymphoplasmazytisch	
lymphoplasmazytoid	
polymorph	
Plasmazytisch	Angioimmunoblastisch (AILD, LgrX)
Zentroblastisch/zentrozytisch	T-Zonenlymphom
follikulär/diffus ± Sklerose	
Zentrozytisch	Pleomorph, kleinzellig (HTLV1 ±)
<b>Lymphome von hohem Malignitätsgrad</b>	
Zentroblastisch	Pleomorph, mittelgroßzellig
monomorph	und großzellig (HTLV1 ±)
polymorph	
zentrozytoid	
Immunoblastisch	Immunoblastisch (HTLV1 ±)
Großzellig anaplastisch (Ki-1 +)	Großzellig anaplastisch (Ki-1 +)
Burkitt-Lymphom	
Lymphoblastisch	Lymphoblastisch
Seltene Typen	Seltene Typen

**Tabelle 4: Working Formulation, National Cancer Institut, The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1982**

**Niedriggradige Lymphome**

**A Malignes Lymphom - klein lymphozytisch**

gemeinsam mit chronisch lymphozytärer Leukämie

plasmazytoid

**B Malignes Lymphom, follikulär - hauptsächlich kleine, gekerbte Zellen**

diffuse Gebiete

Sklerose

**C Malignes Lymphom, follikulär - gemischt kleine, gekerbte und große Zellen**

diffuse Gebiete

Sklerose

**Mittelgradige Lymphome**

**D Malignes Lymphom, follikulär - hauptsächlich große Zellen**

diffuse Gebiete

Sklerose

**E Malignes Lymphom, diffus - hauptsächlich kleine, gekerbte Zellen**

Sklerose

**F Malignes Lymphom, diffus - gemischt kleine, gekerbte und große Zellen**

Sklerose

Anteil epitheloider Zellen

**G Malignes Lymphom, diffus - große Zellen**

gekerbte Zellen

ungekerbte Zellen

Sklerose

**Hochgradige Lymphome**

**H Malignes Lymphom - große Zellen, immunoblastisch**

plasmazytoid

polymorph

Anteil epitheloider Zellen

**I Malignes Lymphom - lymphoblastisch**

"convoluted"

"nonconvoluted"

**J Malignes Lymphom - kleine, ungekerbte Zellen**

Burkitt-Lymphom

follikuläre Gebiete

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 8.2. Behandlungsprotokolle

Tabelle 5: Behandlungsprotokoll der Universität Utrecht (Teske et al., 1993d)															
Medikament	Dosierung		Woche												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14
PEG-L-Asparaginase	10 IU/kg	i.m.	x	x		x		x			x		x	x	x
Vincristin	0,6 mg/m <sup>2</sup>	i.v.			x		x			x		x			
Cyclophosphamid	200 mg/m <sup>2</sup>	p.o.				x									
Doxorubicin	30 mg/m <sup>2</sup>	i.v.							x					x	
Chlorambucil	30 mg/m <sup>2</sup>	p.o.											x		
Prednisolon	0,5 mg/kg/tgl.	p.o.			xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx			

Tabelle 6: Behandlungsprotokoll der Universität Cambridge (Bostock 1986)			
Vincristin	0,5 mg/m <sup>2</sup>	i.v.	alle 7 Tage
Cyclophosphamid	50 mg/m <sup>2</sup>	p.o.	alle 2 Tage
Prednisolon	0,5 mg/kg	p.o.	täglich, dann alle 2 Tage

Anfangsprotokoll - befindet sich der Tumor nach 8 Wochen in vollständiger Remission,
Übergang zum 2wöchigen Behandlungsrhythmus

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)



## 8.3. AgNORs - Einsatz in der Pathologie

**Tabelle 7: Arbeiten, in denen der prognostische Nutzen der AgNOR-Technik an Tumoren des Menschen verifiziert wurde**

Mammakarzinome	Giri et al.	1989
	Helpap	1989
	Raymond et Leong	1989
	Derenzini et al.	1990a
	Rüschhoff et al.	1990b
	Sividris et Sims	1990
	Bockmühl et al.	1991
	Eusebi et al.	1991
	Lesty et al.	1992
	Aubele et al.	1994c
	Aubele et al.	1994d
	Rajeevan et al.	1995
	Pich et al.	1996
	Bellotti et al.	1997
	Kumar et al.	1997
Endometriumkarzinome	Rowlands	1988
	Coumbe et al.	1990
	Yokoyama et al.	1990
	Wilkinson et al.	1990
	Papadimitiou et al.	1991
	Trere et al.	1992
	Trere et al	1994
	Calore et al.	1997
Prostatakarzinome	Bittinger et al.	1994
	Chiusa et al.	1997
	Mukherjee et al.	1997
Kolorektale Karzinome	Öfner et al	1990
	Rüschhoff et al.	1990a
	Yang et al.	1990
	Sandbichler et al.	1991
	Jonjic et al.	1993
	Gambacorta et al.	1993
	Giuffre et al.	1997
	Zaczek et al.	1997
Extrahepatische Gallengangstumore	Ker	1997

	Suto et al.	1998
Bronchialkarzinome	Crocker et al.	1987
	Kaneko et al.	1991
	Abe et al.	1992
	Ogura et al.	1992
Larynxkarzinome	Bockmühl et al.	1992
	Martin et al.	1996
Orale Plattenepithelkarzinome	Sano et al.	1991
	Piffko et al.	1997
	Xie et al.	1997
Mesotheliome	Ayres et al.	1988
Spindelzellsarkome	Golough et al.	1993
Melanome	Naik et al.	1997
Neuroblastome	Brookes et al.	1992
	Pedal et al.	1994
Gliome	Kajiwara et al.	1990
	Plate et al.	1990a
	Shiraishi et al.	1991
	Engel et al.	1994
Astrozytome	Patt et al.	1994
	Haberland et al.	1996
	Husain et al.	1997
Meningiome	Boon et Sharif	1989
	Orita et al.	1990
	Plate et al.	1990b
	Chin et Hinton	1992
	Zimmer et al.	1992
	De Stefano et al.	1996
	Ohkoudo et al.	1996
Nierenzellkarzinome	Delahunt et al.	1991
	Tannapfel et al.	1996

**Tabelle 8: Arbeiten, in denen kein prognostischer Nutzen der AgNOR-Technik für Tumoren des Menschen nachgewiesen werden konnte**

Mammakarzinome	Eskelinen et al.	1991
	Toikanen et Joensuu	1993
	Friedrich et al.	1994
	Simha et al.	1996
	Basu et al.	1997
Endometriumkarzinome	Marbaix et al.	1989
	Allen et Gallimore	1992
Kolorektale Karzinome	Kram et al.	1989
	Gangadharan et Rajan	1992
Prostatakarzinome	Eskelinen et al.	1992
Bronchialkarzinome	Boldy et al.	1991
Gliome	Maier et al.	1990

**Tabelle 9: Arbeiten zum Einsatz der AgNOR-Technik für die prognostische Beurteilung von non-Hodgkin's Lymphomen und anderen Tumoren des hämatopoetischen Systems des Menschen**

Crocker et Nar	1987
Crocker et Egan	1988
Crocker et al.	1988a
Crocker et al.	1988b
Hall et al.	1988
Kim et al.	1988
Arden et al.	1989
Boldy et al.	1989
Cronin et al.	1989
Jan-Mohamed et al.	1989
Jan-Mohamed et al.	1990
Okabe et al.	1990
Goodlad et al.	1991
Ivjanyi et al.	1992
Jakijc-Razumovijc et al.	1992
Pich et al.	1992a
Jakijc-Razumovijc et al.	1993a
Jakijc-Razumovijc et al.	1993b
Munakata et Hendricks	1993
Yekeler et al.	1993
Kalir et al.	1994

Petushkov et al.	1994
Pich et al.	1994
Gan	1995
Hendricks et al.	1995
Caulet-Maugendre et al.	1996
Sreelekha et al.	1996
Wozniak et al.	1996
Mamaev et al.	1997
Pich et al.	1997

**Tabelle 10: Arbeiten zum Einsatz der AgNOR-Technik für die Beurteilung caniner Tumoren**

Mastzellen	Bostock et al.	1989
	Simoos et al.	1994
	Kravis et al.	1996
Mammatumoren	Bostock et al.	1992
	Destexhe et Vansmanshoven	1995
	Harare et al.	1995
	Juntes et al.	1995
	Bratulik et al.	1996
	Sarli et al.	1996
Seminome	De Vico et al.	1994
Perianaldrüse	Preziosi et al.	1995
Bindegewebstumoren	Roccabianca et al.	1992
Sticker Sarkom	Harmelin et al.	1995
Leiomyome	Johnson et al.	1995

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

#### 8.4. Reproduzierbarkeit

**Tabelle 11: AgNOR-Parameter und ihre Reproduzierbarkeit**

AgNOR-Parameter	Reproduzierbarkeit RM
S_AREA	51
MEANAR	62
MAXNOR	49
AR-RAT	65
SIZRAT	71
NORNBC	96
CENTER	76
BORDER	74
LOCAT	78
MAXDIST	85
MDIST	81

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

### 8.5. Überlebensanalysen

**Tabelle 31: Univariate Analyse der krankheitsfreien Überlebenszeit und der Überlebenszeit behandelter Hunde mit malignem Lymphom nach der "Cox Proportional Hazards model Regression method with a forward step selection"**

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)			Überlebenszeit (n = 74)		
	P-Wert	Hazard Rate	C-Intervall	P-Wert	Hazard Rate	C-Intervall
Alter	0,079	0,8872		0,165	0,9249	
Masse	0,733			0,549		
0 - 20 kg						
21 - 30 kg	0,522	0,6856		0,212	0,5316	
31 - 40 kg	0,791	1,155		0,801	0,9015	
> 40 kg	0,911	0,9375		0,554	0,7593	

Geschlecht							
	weiblich						
	männlich	0,436	0,7629		0,116	0,6409	
Stadium		0,435			0,076		
	Stadium II + III						
	Stadium IV	0,483	0,7235		0,417	0,6928	
	Stadium V	0,582	1,266		0,154	1,675	
Kiel-Klassifikation		0,198			0,408		
	niedrigmaligne						
	hochmaligne	0,217	1,767		0,415	1,288	
Working Formulation		0,269			0,504		
	geringgradig						
	mittelgradig	0,311	1,990		0,320	1,518	
	hochgradig	0,077	9,466		0,362	2,130	
Immunophänotyp		0,932			0,229		
	B-Zell-Typ						
	T-Zell-Typ	0,932	1,032		0,239	0,6987	
MITOSE		0,137			0,028		
	0 - 9						
	10 - 12	0,390	1,597	0,5497 - 4,640	0,287	1,670	0,6494 - 4,296
	> 12	0,020	17,36	1,561 - 193,0	0,005	6,380	1,766 - 23,04
PCNA		0,226			0,009		
	0 - 20						
	21 - 40	0,436	1,470		0,457	1,368	0,598 - 3,128
	40 - 60	0,14	2,124		0,033	2,506	1,076 - 5,840
	> 60	0,059	2,875		0,003	3,890	1,612 - 9,384
Ki-67		0,207			0,078		
	0 - 20						
	21 - 40	0,704	1,240		0,439	1,405	
	41 - 60	0,158	2,134		0,024	2,676	
	> 60	0,087	2,670		0,131	2,107	
AgNOR-Typ		0,118			0,008		
	1						
	2	0,889	1,098	0,2964 - 4,063	0,668	1,249	0,4521 - 3,448
	3	0,320	1,762	0,5762 - 5,391	0,147	1,968	0,7889 - 4,908
	4	0,012	28,28	2,085 - 383,5	0,007	10,68	1,899 - 60,02
	5	0,082	3,063	0,8673 - 10,82	0,007	3,889	1,462 - 10,34
AgNOR-Anzahl		0,005			<0,001		

	0 - 300						
	301 - 600	0,444	1,543	0,5081 - 4,686	0,625	1,227	0,5394 - 2,792
	> 600	0,008	5,078	1,531 - 16,84	<0,001	5,611	2,364 - 13,32
NORNBC		< 0,001			< 0,001		
	0 - 3,00						
	3,01 - 6,00	0,399	1,772	0,4685 - 6,705	0,182	1,877	0,7437 - 4,737
	> 600	0,008	6,647	1,628 - 27,14	< 0,001	9,340	3,367 - 25,91
S_AREA		0,075			0,074		
	0 - 2,0000						
	2,0001 - 3,0000	0,793	1,240		0,189	1,987	
	3,0001 - 4,0000	0,586	1,564		0,349	1,632	
	4,0001 - 5,0000	0,658	1,438		0,471	1,583	
	> 5,0000	0,177	0,175		0,321	0,4579	
MEANAR		< 0,001			< 0,001		
	0 - 0,5000						
	0,5001 - 1,0000	0,014	0,2647	0,0916 - 0,7646	0,022	0,4060	0,1873 - 0,8802
	> 1,0000	< 0,001	0,0760	0,0255 - 0,2267	< 0,001	0,0314	0,0090 - 0,1092
MAXNOR		0,002			< 0,001		
	0 - 1,0000						
	1,0001 - 1,5000	0,574	0,7783	0,3248 - 1,865	0,095	0,5625	0,2865 - 1,105
	1,5001 - 2,0000	0,004	0,1797	0,0563 - 0,5732	< 0,001	0,1784	0,0714 - 0,4454
	> 2,0000	0,003	0,1360	0,0357 - 0,5171	< 0,001	0,1161	0,0404 - 0,3334
AR-RAT		0,138			0,103		
	0 - 110						
	> 110	0,153	5,849		0,096	2,415	
SIZRAT		0,959			0,271		
	0 - 10						
	11 - 20	0,731	1,152		0,244	1,455	
	21 - 30	0,733	0,8070		0,49	0,6879	
	> 30	0,913	0,8650		0,322	0,5164	
CENTER		0,490			0,437		
	0 - 0,40						
	0,41 - 0,60	0,551	0,6546		0,273	0,5937	
	0,61 - 0,80	0,917	1,084		0,812	0,8822	
	> 0,80	0,452	0,5163		0,271	0,5180	
BORDER		0,217			0,327		
	0 - 0,75						
	0,76 - 1,50	0,069	2,666		0,156	1,750	

	1,51 - 2,25	0,222	1,891		0,128	1,707
	> 2,25	0,103	2,776		0,191	2,031
LOCAT		0,210			0,019	
	0 - 0,475					
	0,476 - 0,550	0,708	1,278		0,289	1,713
	> 0,550	0,126	2,209		0,017	3,017
MAXDIST		0,302			0,224	
	0 - 0,425					
	0,426 - 0,500	0,155	2,718		0,135	2,108
	0,501 - 0,575	0,093	3,068		0,056	2,506
	> 0,575	0,149	2,743		0,139	2,140

**Tabelle 32: Univariate Analyse der Überlebenszeit von unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom nach der "Cox Proportional Hazards model Regression method with a forward step selection"**

Merkmal	Überlebenszeit (n = 48)		
	P-Wert	Hazard Rate	C-Intervall
Alter	0,2230	1,1193	
Masse	0,5012		
0 - 20 kg			
21 - 30 kg	0,5124	0,6383	
31 - 40 kg	0,7425	0,7969	
> 40 kg	0,5708	1,5213	
Geschlecht			
weiblich			
männlich	0,1070	2,0627	
Kiel-Klassifikation			
niedrigmaligne			
hochmaligne	0,7667	0,8796	
Working Formulation	0,1989		
geringgradig			
mittelgradig	0,3001	3,1931	
hochgradig	0,0985	5,8264	
Immunophänotyp			
B-Zell-Typ			



T-Zell-Typ	0,1750	0,3537	
MITOSE	0,3161		
0 - 9			
10 - 12	0,3068	0,3343	
> 12	0,9273	0,8933	
PCNA	0,0010		
0 - 20			
21 - 40	0,0027	0,361	0,041 - 3,167
40 - 60	0,0001	0,152	0,019 - 1,207
> 60	0,0561	3,038	0,895 - 10,316
Ki-67	0,0195		
0 - 20			
21 - 40	0,0313	0,467	0,029 - 7,598
41 - 60	0,0019	0,329	0,038 - 2,832
> 60	0,8020	8,836	3,358 - 23,249
AgNOR-Typ	0,0047		
1			
2	0,0078	0,437	0,044 - 4,380
3	0,0003	0,049	0,003 - 0,895
4	0,0046	0,428	0,048 - 3,777
5	0,3095	1,9495	5,380 - 70,643
AgNOR-Anzahl	0,0037		
0 - 300			
301 - 600	0,0068	0,422	0,042 - 4,184
> 600	0,0030	1,644	0,499 - 5,411
NORNBC	0,0002		
0 - 3,00			
3,01 - 6,00	0,0001	0,181	0,024 - 1,344
> 600	0,0005	0,889	0,228 - 3,466
S_AREA	0,1227		
0 - 2,0000			
2,0001 - 3,0000	0,8536	8,426	
3,0001 - 4,0000	0,2666	26,089	
4,0001 - 5,0000	0,8238	8,628	
> 5,0000	0,1058	2,813	
MEANAR	0,0243		
0 - 0,5000			
0,5001 - 1,0000	0,0133	0,0371	0,0086 - 0,1607

	> 1,0000	0,0134	0,0392	0,0091 - 0,1698
MAXNOR		0,1156		
	0 - 1,0000			
	1,0001 - 1,5000	0,2060	4,0701	0,4621 - 35,8458
	1,5001 - 2,0000	0,0258	5,0768	1,2173 - 21,1726
	> 2,0000	0,1038	2,3719	0,8378 - 6,7151
AR-RAT		0,2318		
	0 - 110			
	> 110	0,2318	0,6001	
SIZRAT		0,2041		
	11 - 20			
	21 - 30	0,1800	2,9886	
	> 30	0,1326	1,9548	
CENTER		0,9808		
	0 - 0,40			
	0,41 - 0,60	0,8966	0,9174	
	0,61 - 0,80	0,8466	0,8784	
BORDER		0,0226		
	0,76 - 1,50			
	1,51 - 2,25	0,1667	0,2161	
	> 2,25	0,8154	0,7797	
LOCAT		0,0475		
	0,476 - 0,550			
	> 0,550	0,0475	0,3883	0,1524 - 0,9898
MAXDIST		0,0253		
	0,426 - 0,500			
	0,501 - 0,575	0,0789	3,030	0,800 - 11,476
	> 0,575	0,0103	2,784	1,048 - 7.394

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

**Tabelle 33: Multivariate Analyse der krankheitsfreien Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom nach der "Cox Proportional Hazards model Regression method with a forward step selection"**

Merkmal	Krankheitsfreie Überlebenszeit (n = 48)		
	P-Wert	Hazard Rate	95% C-Intervall

NORNBC	0,001			
0 - 3,00				
3,01 - 6,00	0,002	26,09		3,285 - 207,2
> 600	< 0,001	63,80		5,782 - 704,0
S_AREA	< 0,001			
0 - 2,0000				
2,0001 - 3,0000	0,002	0,0363		0,0046 - 0,2894
3,0001 - 4,0000	0,070	0,1699		0,0250 - 1,155
4,0001 - 5,0000	0,521	0,5246		0,0732 - 3,759
> 5,0000	0,001	0,0030		0,0001 - 0,1044
MEANAR	0,003			
0 - 0,5000				
0,5001 - 1,0000	< 0,001	0,0725		0,0163 - 0,3228
> 1,0000	0,588	0,5192		0,0484 - 5,564
MAXNOR	0,010			
0 - 1,0000				
1,0001 - 1,5000	0,156	2,456		0,7095 - 8,500
1,5001 - 2,0000	0,027	0,0569		0,0045 - 0,781
> 2,0000	0,397	0,3414		0,0283 - 4,112
P < 0,001				

**Tabelle 34: Multivariate Analyse der Überlebenszeit von behandelten Hunden mit malignem Lymphom nach der "Cox Proportional Hazards model Regression method with a forward step selection"**

Merkmal	Überlebenszeit (n = 53)		
	P-Wert	Hazard Rate	95% C-Intervall
Immunophänotyp	0,027		
B-Zell-Typ			
T-Zell-Typ	0,027	2,997	1,134 - 7,919
S_AREA	0,003		

	0 - 2,0000			
	2,0001 - 3,0000	0,121	0,1994	0,0260 - 1,529
	3,0001 - 4,0000	0,382	0,4430	0,0714 - 2,748
	4,0001 - 5,0000	0,383	2,513	0,3169 - 19,92
	> 5,0000	0,016	0,0414	0,0031 - 0,5480
MEANAR		< 0,001		
	0 - 0,5000			
	0,5001 - 1,0000	< 0,001	0,1053	0,0287 - 0,3859
	> 1,0000	< 0,001	0,0058	0,0007 - 0,0453
AR-RAT		0,008		
	0 - 110			
	> 110	0,008	37,45	2,529 - 554,6
MAXDIST		0,009		
	0 - 0,425			
	0,426 - 0,500	< 0,001	13,16	2,950 - 58,74
	0,501 - 0,575	0,005	10,64	2,012 - 56,32
	> 0,575	0,039	6,278	1,100 - 35,82
P = 0,026				

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 8.6. Überlebenszeiten

**Tabelle 35: Überlebenszeiten von unbehandelten Hunden mit malignem Lymphom in Korrelation zu verschiedenen prognostischen Markern**

Merkmal	Überlebenszeit (Tage) für unbehandelte Hunde		
	kürzeste	längste	durchschnittliche
Kiel-Klassifikation			
niedrigmaligne	6	174	65,2
hochmaligne	3	313	75,4
Working Formulation			
geringgradig	10	174	91,7
mittelgradig	3	162	58,8
hochgradig	85	313	199
Immunophänotyp			

B-Zell-Typ	3	313	74,7
T-Zell-Typ	10	68	39
PCNA			
< 40	3	313	162
> 40	6	117	43,4
Ki-67			
< 40	112	313	172,6
41 – 60	3	102	47,58
> 60	6	117	36,9
MITOSE			
0 – 9	3	313	78,6
10 – 12	23	58	40,5
> 12	3	42	22,5
AgNOR-Typ			
1	82	150	111,3
2	112	313	190,25
3	3	158	86,8
4	3	51	22
5	6	68	32,5
NORNBC			
0 – 3,00	158	313	211
3,01 – 6,00	3	174	76,4
> 6,00	9	65	28,6
S_AREA			
0 – 2,0000	6	85	53
2,0001 – 3,0000	3	51	23
3,0001 – 4,0000	10	162	66,75
4,0001 – 5,0000	65	174	113,25
> 5,0000	9	313	106,8
MEANAR			
0 – 0,5000	3	85	30,5
0,5001 – 1,0000	16	82	44,4
> 1,0000	9	313	142,2
MAXNOR			
0 – 1,0000	51	51	51
1,0001 – 1,5000	16	78	37,3
1,5001 – 2,0000	3	112	62
> 2,0000	6	313	90,4
AR-RAT			
0 – 110	14	313	97,7
> 110	3	158	53
SIZRAT			
11 – 20	51	54	52,5
21 – 30	6	85	41,4
> 30	3	313	84,1

CENTER			
0 – 0,40	3	174	130,6
0,41 – 0,60	6	313	77,1
0,61 – 0,80	51	112	82,7
BORDER			
0,75 – 1,50	3	313	105,2
1,51 – 2,25	3	125	38,7
> 2,25	51	51	51
LOCAT			
0,475 – 0,550	82	313	143,1
> 0,550	3	174	50,8
MAXDIST			
0,425 – 0,500	85	150	117,3
0,501 – 0,575	3	313	87,3
> 0,575	3	125	42,5

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

**Tabelle 36: Überlebenszeiten und krankheitsfreie Überlebenszeiten von behandelten Hunden mit malignem Lymphom in Korrelation zu verschiedenen prognostischen Markern**

Merkmal	Überlebenszeit (Tage)			Krankheitsfreie Überlebenszeit (Tage)		
	kürzeste	längste	durchschnittliche	kürzeste	längste	durchschnittliche
Kiel-Klassifikation						
niedrigmaligne	21	1477	399	32	1092	329,3
hochmaligne	21	1351	317,3	55	441	172,3
Working Formulation						
geringgradig	39	1477	430,1	32	356	153,8
mittelgradig	21	1351	331,3	39	1092	226,5
hochgradig	154	286	220	112	116	114
Immunophänotyp						
B-Zell-Typ	21	1351	306,7	32	441	183,9
T-Zell-Typ	21	1477	433,9	39	1092	269,4
PCNA						
0 – 20	28	1204	590,2	55	1092	494,1
21 – 40	21	1477	395	32	294	160,5
41 – 60	21	658	229,1	63	322	181,2
> 60	21	1351	204,1	39	217	104,3
Ki-67						
0 – 20	39	1204	658,6	32	1092	544,17
21 – 40	21	1477	362,3	84	441	214
41 – 60	21	1148	245,6	39	266	135,53

> 60	31	1351	249,7	70	254	148,36
MITOSE						
0 – 9	21	1477	278,4	32	1092	269
10 – 12	31	1148	251,55	70	147	98
> 12	36	132	63,2	70	159	114,5
AgNOR-Typ						
1	79	1204	513,8	116	1092	588,4
2	40	1477	455,4	39	356	208,2
3	28	1309	360,4	55	441	166,9
4	21	147	54,5	77	270	205,4
5	21	1351	186,8	32	280	137,6
NORNBC						
< 3,00	124	1204	487,4	124	1092	458,8
3,00 – 6,00	22	1477	460,65	39	518	271,7
> 6,00	21	1351	158,1	32	254	116,6
S_AREA						
0 – 2,0000	39	467	218	32	356	152,7
2,0001 – 3,0000	21	1309	243,3	85	441	197,8
3,0001 – 4,0000	22	1204	361,7	63	1092	246,1
4,0001 – 5,0000	79	525	304,5	55	518	220,4
> 5,0000	31	1477	943,2	175	175	175
MEANAR						
0 – 0,5000	21	364	131,3	32	254	125,7
0,5001 – 1,0000	31	532	239,5	55	356	188,5
> 1,0000	22	1477	735,5	84	1092	407,8
MAXNOR						
0 – 1,0000	21	364	135,2	32	356	132,7
1,0001 – 1,5000	21	707	219,6	55	308	165,9
1,5001 – 2,0000	22	1309	324,6	84	518	293,5
> 2,0000	35	1477	357,4	70	1092	460,6
AR-RAT						
0 – 110	21	1477	366,8	32	1092	212,4
> 110	21	374	133,7	70	170	120
SIZRAT						
< 10	21	1477	404,2	32	441	201,3
10 – 20	21	1309	313,5	55	308	160,5
21 – 30	35	1204	287,1	70	1092	335,1
> 30	22	658	288,1	182	182	182
CENTER						
0 – 0,40	27	150	86,4	70	356	173
0,41 – 0,60	21	1477	402,4	32	1092	274,9
0,61 – 0,80	21	1309	251,9	70	245	135,2
> 0,80	28	1351	414	63	441	283,5
BORDER						
< 0,75	22	1204	483,9	39	1092	435,4
0,75 – 1,50	21	1477	265,1	32	266	138,7

1,51 – 2,25	21	1351	250,9	70	441	178,8
> 2,25	21	658	191,7	55	322	150,7
LOCAT						
< 0,475	36	1204	419,7	116	1092	481,1
0,475 – 0,550	22	1477	430,3	39	356	181,4
> 0,550	21	1351	293,1	32	441	164,8
MAXDIST						
< 0,425	91	1204	621	70	1092	522
0,425 – 0,500	36	1477	375,8	39	441	184,3
0,501 – 0,575	21	1309	262,3	32	308	160,1
> 0,575	21	1351	313	55	322	156,7

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 9. Literaturverzeichnis

- Abe, S., Sukoh, N. & Ogura, S.**, (1992):  
Nucleolar organiser regions as a marker of growth rate in squamous cell carcinoma of the lung.  
Thorax, 47, 778-780
- Abramson, J.H., Avitzour, M. & Peritz, E.**, (1975):  
Mortality from lymphomas in Israel, 1950-1971: The possible role of environmental factors.  
Int. J. Epidemiol., 4, 321-329
- Ackerman, N. & Madewell, B.R.**, (1980):  
Thoracic and abdominal radiographic abnormalities in the multicentric form of lymphosarcoma in dogs.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 176, 36-40
- Allen, J.P. & Gallimore, A.P.**, (1992):  
Nucleolar organizer regions in benign and malignant glandular lesions of the cervix.  
J. Pathol., 166, 153-156
- Anastassova-Kristeva, M.**, (1977):  
The nucleolar cycle in man.  
J. Cell Sci., 25, 103-110
- Angelier, N., Hernandez-Verdun, D. & Bouteille, M.**, (1982):  
Visualization of Ag-NOR proteins on nucleolar transcriptional units in molecular spreads.  
Chromosoma, 86, 661-671
- Appelbaum, F.R., Sale, G.E., Storb, R., Charrier, K., Deeg, H.J., Graham, T. & Wulff, J.C.**, (1984):  
Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy.  
Haematol. Oncol., 2, 151-167
- Appelbaum, F.R., Deeg, H.J., Storb, R., Graham, T.C., Charrier, K. & Bensinger, W.**, (1986):  
Cure of malignant lymphoma in dogs with peripheral blood stem cell transplantation.  
Transplantation, 41, 19-22
- Arden, K.C., Johnston, D.A., Cork, A. & Pathak, S.**, (1989):  
Differential nucleolar organizer activity in normal and leukemic bone marrow.  
Am. J. Haematol., 30, 164-173
- Armstrong, S.J., Tomley, F.M., Nunes De Souza, P.A., Wreghitt, T.G., Owen, L.N. & Mahy, B.W.J.**, (1981):  
Reverse transcriptase activity associated with canine leukaemia and lymphosarcoma.  
In: Yohn, D.S. & Blakeslee, J.R. (Hrsg.): Advances in comparative leukemia research.  
Elsevier North Holland, 411-412
- Aubele, M., Auer, G., Gais, P., Jütting, U., Rodenacker, K. & Voss, A.**, (1994a):  
Nucleolar organizer regions (AgNORs) in ductal mammary carcinoma: comparison with classifications and prognosis.  
Pathol. Res. Pract., 190, 129-137
- Aubele, M., Auer, G. & Jütting, U.**, (1994b):  
Prognostische Wertigkeit von AgNORs beim Mammakarzinom.  
Zentralbl. Pathol., 140, 55-60
- Aubele, M., Auer, G., Jütting, U. & Gais, P.**, (1994c):  
Nucleolar organizer regions (AgNORs) in ductal mammary carcinoma. Their relation to clinical factors, DNA parameters and clinical course.  
In: Schmitt, M. et al. (Hrsg.): Prospects in diagnosis and treatment of breast cancer.  
Elsevier Science B. V., 47-56
- Aubele, M., Auer, G., Jütting, U., Falkmer, U. & Gais, P.**, (1994d):  
Prognostic value of quantitatively measured AgNORs in ductal mammary carcinoma.  
Anal. Quant. Cytol. Histol., 16, 211-218
- Aubele, M., Biesterfeld, S., Derenzini, M., Hufnagel, P., Martin, H., Öfner, D., Ploton, D. & Rüschoff, J.**, (1994e):  
Guidelines of AgNOR quantitation.  
Zentralbl. Pathol., 140, 107-108
- Ayres, J.G., Crocker, J.G. & Skilbeck, N.Q.**, (1988):  
Differentiation of malignant from normal and reactive mesothelial cells by the argyrophil technique for nucleolar organiser region associated proteins.



Thorax, 43, 366-370

**Bäckgren, A.W.**, (1965):

Lymphatic leukosis in dogs. An epizootological, clinical and haematological study.  
Acta Vet. Scand., 6, Suppl. I., 7-73

**Bartel, A.**, (1978)

Ethnic clinical aspects of chronic lymphatic leukaemia in Israel.  
Acta Haemat., 69, 599-615

**Baron, T., Magnol, J.P. & Bryon, P.A.**, (1990):

Contribution of histology in lymphoid tumours in dogs. 1. Principles of the classification of lymphoid tumours.  
Point-Veterinaire, 21, 875-880

**Basu, A., Sanyal, S., Bhattacharyya, A., Bhattacharyya, S. & Dasgupta, S.**, (1997):

A comparative study of silver binding nucleolar organiser regions (AgNORs) of breast lesions in histological sections and fine needle aspiration smears.  
J. Ind. Med. Assoc., 95, 443-447

**Bell, R., Cotter, S.M., Lillquist, A., Sallan, S. & McGaffray, R.**, (1984):

Characterization of glyocorticoid receptors in animal lymphoblastic disease: correlation with response to single agent glyocorticoid treatment.  
Blood, 63, 380-383

**Bellotti, M., Elsner, B., Kahn, A., Bezodnick, L., Pisilli, L. & Greco, P.**, (1997):

Morphometric determination of AgNORs in breast carcinoma. Correlation with flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen.  
Analyt. Quant. Cytol. Histol., 19, 139-144

**Bernard, S.M.**, (1988):

Epidemiology of malignant lymphoma.  
In: Habeshaw, J.A. & Lauder, I. (Hrsg.): Malignant lymphomas.  
Churchill Livingstone, Edinburgh, 6-45

**Bernard, S.M., Cartwright, R.A., Bird, C.C., Richards, I.D.G., Lauder, I. & Roberts, B.E.**, (1984):

Aetiologic factors in lymphoid malignancies: a case-control epidemiological study.  
Leukemia Res., 8, 681-689

**Bielka, H.**, (1985):

Eukaryontenchromosomen.  
In: Bielka, H. (Hrsg.): Molekularbiologie.  
Gustav Fischer Verlag, Jena, 124-128

**Biesterfeld, S., Ruoss, E., Hufnagel, P. & Martin, H.**, (1994):

Influence of fixation and preparation on the AgNOR distribution in routinely processed breast cancer specimens.  
Zentralbl. Pathol., 140, 41-48

**Bittinger, A., Keitz, A.v., Rüschoff, J. & Melekos, M.D.**, (1994):

Silver staining nucleolar organizer region in prostate cytology.  
Zentralbl. Pathol., 140, 103-106

**Bloom, F., Flushing, L.I. & Meyer, L.M.**, (1945):

Malignant lymphoma (so-called leukemia) in dogs.  
Am. J. Pathol., 21, 683-715

**Bockmühl, U., Theissig, F., Dimmer, V. & Kunze, K.D.**, (1991):

The impact of nucleolar organizer regions for the lymph node spread and prognosis of invasive ductal mammary carcinoma.  
Pathol. Res. Pract., 187, 437-443

**Bockmühl, U., Bockmühl, F., Dimmer, V. & Kunze, K.D.**, (1992):

„Nucleolar Organizer Regions“ (AgNORs) als Faktor für die Prognose des Larynxkarzinoms?  
Laryngo-Rhino-Otologie, 71, 137-141

**Boldy, D.A., Crocker, J. & Ayres, J.G.**, (1989):

Application of the AgNOR method to cell imprints of lymphoid tissue.  
J. Pathol., 157, 75-79

**Boldy, D.A., Ayres, J.G., Crocker, J., Waterhouse, J.A. & Gilthorpe, M.**, (1991):

Interphase nucleolar organiser regions and survival in squamous cell carcinoma of the bronchus: a 10 year follow up study of 138 cases.  
Thorax, 46, 871-877

**Boon, A.P. & Sharif, H.**, (1989):

Value of AgNOR method in predicting recurrence of meningioma.  
J. Clin. Pathol., 9, 1002-1003

**Bortnowski, H.B. & Rosenthal, R.C.**, (1991):

Preclinical evaluation of L-asparaginase and methotrexate administered at intermediate doses in dogs.  
Am. J. Vet. Res., 52, 1636-38

**Bostock, D.E.**, (1986):

Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats.  
Br. Vet. J., 142, 1-19

**Bostock, D.E., Crocker, J., Harris, K. & Smith, P.**, (1989):

Nucleolar organizer regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours:  
Br. J. Cancer, 59, 915-918

**Bostock, D.E., Moriarty, J. & Crocker, J.**, (1992):

Correlation between histologic diagnosis mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumours.  
Vet. Pathol., 29(5), 381-385

**Bowles, C.A. & Lucas, D.**, (1980):

Clinical and immunological response of lymphoma dogs following chemotherapy and irradiation.  
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Diseases, 3, 317-326

**Bowles, C.A., Bull, M., McCormick, K., Kadin, M. & Lucas, D.**, (1980):

Autologous bone marrow transplantation following chemotherapy and irradiation in dogs with spontaneous lymphomas.

J. Natl. Cancer Inst., 65, 615-620

**Bratulic, M., Grabarevic, Z., Artukovic, B. & Capak, D.,** (1996):

Number of nucleoli and nucleolar organizer regions per nucleus and nucleolus - prognostic value in canine mammary tumors.  
Vet. Path., 33, 527-532

**Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A. & McDonald, B.H.,** (1987):

Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta.  
Nature, 326, 515-517

**Brick, J.O., Roenigk, W.J. & Wilson, G.P.,** (1968):

Chemotherapy of malignant lymphoma in dogs and cats.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 153, 47

**Brookes, C.N., Ooms, B.C.M., McGill, F., England, K., Hinchliffe, S.A. & Van Velzen, D.,** (1992):

Ploidy independence of AgNOR number in neuroblastoma.  
Lab. Invest., 67, 243-246

**Brooks, M.B., Matus, R.E., Leifer, C.E. & Patnaik, A.K.,**(1987):

Use of splenectomy in the management of lymphoma in dogs: 16 cases.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 191, 1008-1010

**Brugal, G.,** (1994):

Interpretation of proliferation marker.  
The Comp. Cytol. and Histol. Laboratory, 234-239

**Burger, P.C., Shibata, T. & Kleihues, P.,** (1986):

The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: Application to surgical neuropathology.  
Am. J. Surg. Pathol., 9, 611-616

**Burke, J.S.,** (1990):

The histopathologic classification of Non-Hodgkin's lymphomas: Ambiguities in the working formulation and two newly reported categories.  
Sem. Oncol. 17, 3-10

**Busch, H., Lischwe, M.A., Michalik, J., Chan, P.K. & Busch, R.,** (1984):

Nucleolar proteins of special interest: silver-staining proteins B23 and C23 and antigens of human tumour nucleoli.  
In: Jordan, E.G. & Cullis, C.A. (Hrsg.): The nucleolus.  
Cambridge Univ. Press, London, New York, 43-72

**Calore, E.E., Maeda, M.Y., Cavaliere, M.J., Pereira, S.M., Shih, L.W., Pereira, G.M. & de Melo, J.R.,** (1997):

Study of organizer nucleolar regions by the argyrophil technique in cervical intraepithelial neoplasias.  
Minerva Ginecol., 49, 59-62

**Canepa, M., Gambini, C. & Sementa, A.R.,** (1990):

Nucleolus organizer regions and Ki-67 immunostaining in ductal breast cancer: a comparative study.  
Pathologica, 82, 125-132

**Canese, M.G., Ru, G. & Gagna, C.,** (1994):

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in normal and neoplastic mammary gland of dog.  
12<sup>th</sup> Meeting of the European Society of Veterinary Pathology (Proceed.), Abstract 112

**Capurro, C., Buracco, P. & Rossi, L.,** (1992):

Lymphoma in dogs.  
Eur. J. Comp. Anim. Pract., 2, 7-19

**Carbone, P.P., Kaplan, H.S., Musshoff, K., Smithers, D.W. & Tubiana, M.,** (1971):

Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification.  
Cancer Res., 31, 1860

**Carlo, G.L., Cole, P., Miller, A.B., Munro, I.C., Solomon, K.R. & Squire, R.A.,** (1992):

Review of a study reporting an association between 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and canine malignant lymphoma: report of an expert panel.  
Regul. Toxicol. Pharmacol., 16, 245

**Carter, R.F.,** (1988):

Cell types in canine lymphoma: morphology, morphometry, phenotypes, and prognostic correlations.  
Dissert. Abstr. Internat., B Sci. Engineering, 49, 53

**Carter, R.F. & Valli, V.E.O.,** (1988):

Advances in the cytologic diagnosis of canine lymphoma.  
Seminars in Vet. Med. Surg. Small Anim., 3, 167-175

**Carter, R.F., Valli, V.E.O. & Lumsden, J.H.,** (1986):

The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute working formulation.  
Can. J. Vet. Res., 50, 154-164

**Carter, R.F., Harris, C.K., Withrow, S.J., Valli, V.E.O. & Susaneck, S.J.,** (1987):

Chemotherapy of canine lymphoma with histopathological correlation: doxorubicin alone compared to COP as first treatment regimen.  
J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 23, 587-596

**Cattoretti, G., Pileri, S., Parravicini, C., Becker, M.H.G., Poggi, S., Bifulco, C., Key, G., D'Amato, L., Sabbatini, E., Feudale, E., Reynolds, F., Gerdes, J. & Rilke, F.,** (1993):

Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.  
J. Pathol., 171, 83-98

**Caulet-Maugendre, S., Patey, M., Granier, E., Joundi, A., Gentile, A. & Caulet, T.,** (1996):

Quantitative analysis of cellular proliferative activity in 35 T-cell non-Hodgkin's lymphomas. Use of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 (MIB-1) antibodies and nucleolar organizer regions.  
Anal. Quant. Cytol. Histol., 18, 337-344

**Chapman, A.L., Bopp, W.J., Brightwell, A.S., Cohen, H., Nielson, A.H., Gravelle, C.R. & Werder, A.A.,** (1967):

Preliminary report on virus-like particles in canine leukemia and derived cell cultures.  
Cancer Res., 27, 18-25

**Chapman, A.L., Bopp, W.J., Torres, J.Jr. & Cohen, H.,** (1981):

An electron microscopic study of the cell types in canine lymphoma and leukaemia.

J. Comp. Pathol., 91, 331-340

**Chew, D.J., Meuten, D.J.**, (1982):  
Disorders of calcium and phosphorus metabolism.  
Vet. Clin. North Am., 12, 411- 438

**Chin, L.S. & Hinton, D.R.**, (1992):  
The standardized assessment of argyrophilic nucleolar organizer regions in meningeal tumours.  
J. Neurosurg., 74, 590-596

**Chiu, K.Y., Loke, S.L. & Wong, K.K.**, (1989):  
Improved silver technique for showing nucleolar organizer regions in paraffin wax sections.  
J. Clin. Pathol., 42, 992-994

**Chiusa, L., Galliano, D., Formiconi, A., Di Primio, O. & Pich, A.**, (1997):  
High and low risk prostatic carcinoma determined by histologic grade and proliferative activity.  
Cancer, 79, 1956-1963

**Coghill, G., Grant, A.M. & Orrell, J.M.**, (1990):  
Improved silver staining of nucleolar organizer regions in paraffin wax sections using an inverted incubation technique.  
J. Clin. Pathol., 43, 1029

**Cohen, D., Booth, S. & Sussman, O.**, (1961):  
Canine lymphoma.  
In: WHO Conference on Comparative Studies in Leukemias.  
Philadelphia, Penna, no 30, WHO, Geneva, Switzerland

**Cotter, S.M.**, (1983):  
Treatment of lymphoma and leukemia with cyclophosphamide, vincristine and prednisolone. I. Treatment of dogs.  
J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 23, 159-172

**Cotter, S.M. & Goldstein, M.A.**, (1987):  
Comparison of two protocols for maintenance of remission in dogs with lymphoma.  
J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 23, 495-499

**Coumbe, A., Mills, B.P. & Brown, C.L.**, (1990):  
Nucleolar organizer regions in endometrial hyperplasia and neoplasia.  
Pathol. Res. Pract., 186, 254-259

**Couto, C.G.**, (1985):  
Canine lymphoma: something old, something new.  
Comp. Cont. Educ. Prac. Vet., 7, 291

**Couto, C.G., Cullen, J., Pedroia, V. & Turrel, J.M.**, (1984):  
Central nervous system lymphosarcoma in the dog.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 184, 809-813

**Couto, C.G., Rutgers, H.C., Sherding, R.G. & Rojko, J.**, (1989):  
Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs. A retrospective study.  
J. Vet. Int. Med., 3, 73-78

**Crocker, J.**, (1990):  
Nucleolar organizer regions.  
Curr. Top. Pathol., 82, 91-143

**Crocker, J.**, (1995):  
The trials and tribulations of interphase AgNORs.  
J. Pathol., 175, 367-368

**Crocker, J. & Egan, M.J.**, (1988):  
Correlation between NOR sizes and numbers in Non-Hodgkin's lymphomas.  
J. Pathol., 156, 233-239

**Crocker, J. & Nar, P.**, (1987):  
Nucleolar organizer regions in lymphomas.  
J. Pathol., 151, 111-118

**Crocker, J., Ayres, J. & McGovern, J.**, (1987):  
Nucleolar organizer regions in small cell carcinoma of the bronchus.  
Thorax, 42, 972-975

**Crocker, J., Hall, P.A., McCartney, J.C. & Stansfeld, A.G.**, (1988a):  
A comparative study of nucleolar organizer regions (AgNORs), Ki-67 staining and DNA flow cytometry in Non-Hodgkin's lymphomas.  
J. Pathol., 154, 37A

**Crocker, J., McCartney, J.C. & Smith, P.J.**, (1988b):  
Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in Non-Hodgkin's lymphoma.  
J. Pathol., 154, 151-156

**Crocker, J., Boldy, D. & Egan, M.J.**, (1989):  
How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach.  
J. Pathol., 158, 185-188

**Cronin, K., Loftus, B.M. & Dervan, P.A.**, (1989):  
Are AgNORs useful in distinguishing follicular hyperplasia from follicular lymphoma?  
J. Clin. Pathol., 42, 1267-1268

**Crow, S.E., Theilen, G.H., Benjamini, E., Torten, M., Henness, A.M. & Buhles, W.C.**, (1977):  
Chemotherapy for canine lymphosarcomas.  
Cancer, 40, 2102-2108

**Daniliyan, S.A., Zharinov, G.M. & Osipova, T.T.**, (1986):  
Application of the principal components method and proportional Hazards model to analysis of survival data.  
Biometrical J., 28

**Darke, P.G.G., McCulligh, K.G. & Geldart, P.H., (1975)**

Myasthenia gravis, thymoma and myositis in a dog.  
Vet. Rec., 97, 392-394

**Davis, T.E., (1985):**

Non-Hodgkin's lymphomas.  
In: Wyngaarden, J.B. & Smith, L.H. (Hrsg.): Cecil textbook of medicine.  
WB Saunders Co., Philadelphia, 994-1008

**De Boer, D.J., Turrel, J.M. & Moore, P.F., (1990):**

Mycosis Fungoides in a dog: Demonstration of T-cell specificity and response to radiotherapy.  
J. Am. Anim. Hosp. Ass., 26, 566-572

**Delahunt, B., Ribas, J.L. & Nacey, J.N., (1991):**

Nucleolar organizer regions and prognosis in renal cell carcinoma.  
J. Pathol., 163, 31-37

**De La Torre, C. & Gimenez-Martin, G., (1980):**

The nucleolar cycle.  
In: Jordan, E.G. & Cullis, C.A. (Hrsg.): The nucleolus.  
Cambridge Univ. Press, London, New York, 153-173

**Delverdier, M., Buchet, B., Haverbeke, G. van & Van Haverbeke, G., (1988):**

Histology and cytology of malignant canine lymphomas. A comparative study of current classifications.  
Revue Vet. Med., 139, 1141-1150

**Derezini, M. & Ploton, D., (1991):**

Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells.  
Int. Rev. Exp. Pathol., 32, 149-192

**Derezini, M. & Trere, D., (1991a):**

Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumour pathology.  
Virchows Arch. B, 61, 1-8

**Derezini, M. & Trere, D., (1991b):**

Standardization of interphase AgNOR measurement by means of automated image analysis system using lymphocytes as an internal control.  
J. Pathol., 165, 337-342

**Derezini, M. & Trere, D., (1994):**

AgNOR proteins as a parameter of the rapidity of cell proliferation.  
Zentralbl. Pathol., 140, 7-10

**Derezini, M., Betts, C.M. & Eusebi, V., (1987):**

Distribution of interphase nucleolar organizer regions and diagnosis of malignancy.  
Lancet, I, 286

**Derezini, M., Romagnoli, T., Mingazzini, P. & Marinozzi, V., (1988a):**

Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumours of human intestine.  
Virchows Arch. B, 54, 334-340

**Derezini, M., Romagnoli, T., Ceccarelli, C. & Eusebi, V., (1988b):**

Fixatives and silver stainability of NOR proteins at the light microscopic level.  
J. Histochem. Cytochem., 36, 1453-1454

**Derezini, M., Betts, C.M. & Trere, D., (1990a):**

Diagnostic value of silver-stained interphasic nucleolar organizer regions in breast tumours.  
Ultrastruct. Pathol., 14, 233-245

**Derezini, M., Pession, A. & Trere, D., (1990b):**

The quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells.  
Lab Invest, 63, 137-140

**Derezini, M., Thiry, M. & Goessens, G., (1990c):**

Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus.  
J. Histochem. Cytochem., 38, 1237-1253

**Derezini, M., Farabegoli, F. & Trere, D., (1992):**

Relationship between interphase AgNOR distribution and nucleolar size in cancer cells.  
Histochem. J., 24, 951-956

**Derezini, M., Sirri, V. & Trere, D., (1994):**

Nucleolar organizer regions in tumor cells.  
Cancer J., 7, 71-77

**Dervan, P.A., Gilmartin, L.G., Loftus, B.M. & Carney, D.N., (1990):**

Breast carcinoma kinetics. Agryophilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki-67 scores.  
Am. J. Clin. Pathol., 92, 401-406

**De Stefano, V., Salvatore, G., Monticelli, A., Riccio, P., Cappabianca, P. & Bucciero A., (1996):**

Prognostic significance of nucleolar organizer regions in meningiomas.  
J. Neurosurg. Sc., 40, 89-92

**Destexhe, E. & Vanmanshoven, F.C., (1995):**

Comparison of argyrophilic nucleolar organizer regions by counting and image analysis in canine mammary tumours.  
Am. J. Vet. Res., 56, 185-187

**De Vico, G., Papparella, S. & Di Guardo, G., (1994):**

Number and size of silver-stained nucleoli (AgNOR clusters) in canine seminomas: correlation with histological features and tumour behaviour.  
J. Comp. Pathol., 110, 267-273

**Di Stefano, D., Mingazzini, P.L., Scucchi, L., Doetti, M. & Marinozzi, V., (1991):**

A comparative study on histopathology, hormon receptors, peanut lectin binding, Ki-67 immunostaining and nucleolar organizer region-associated proteins in human breast cancer.  
Cancer, 67, 463-470

**Dick, F., Bloomfield, C.D. & Brunning, R.D., (1974):**

Incidence, cytology and histopathology of Non-Hodgkin's lymphomas in the bone marrow.  
Cancer, 33, 1382-1398

**Dixon, D.O., McLaughlin, P., Hagemester, F.B., Freirich, E.J., Fuller, L.M., Gabanillas, F.F. & Gehan, E.A., (1987):**

Reporting Outcomes in Hodgkin's Disease and Lymphoma.  
J. Clin. Oncol., 5, 1670-1671

**Dorn, C.R., (1976):**

Epidemiology of canine and feline tumours.  
J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 12, 307-312

**Dorn, C.R., Taylor, D.O.N. & Hibbard, H.H., (1967):**

Epizootiologic characteristics of canine and feline leukemia and lymphoma.  
Am. J. Vet. Res., 28, 993-1001

**Dorn, C.R., Taylor, D.O.N. & Schneider, R., (1970):**

The epidemiology of canine leukemia and lymphoma.  
In: Dutcher, R.M. (Hrsg.): Comparative Leukemia Research Proceedings 4th International Symposium on Comparative Leukemia Research.  
Bibl. Haematol. Cherry Hill, NJ, 36, 403

**Egan, M.J. & Crocker, J., (1992):**

Nucleolar organizer regions in pathology.  
Br. J. Cancer, 65, 1-7

**Elliot, J., Dobson, J.M., Dunn, J.K., Herrtage, M.E. & Jackson, K.F., (1991):**

Hypercalcaemia in the dog: a study of 40 cases.  
J. Small Anim. Pract., 32, 564-571

**Engel, U., Plate, K., Jänisch, W. & Mennel, H.D., (1994):**

Nucleolar organizer regions (AgNORs) in primary and recurrent gliomas.  
Zentralbl. Pathol., 140, 73-81

**Eriksson, M., Hardell, L., Berg, N.-O., Moller, T. & Axelson, O., (1981)**

Soft-tissue sarcomas and exposure to chemical substances: A case referent study.  
Br. J. Ind. Med., 15, 231-236

**Eskelinen, M.J., Lipponen, P.K. & Collan, Y., (1991):**

The role of nucleolar organizer regions as prognostic factors in breast cancer.  
Eur. J. Cancer, 27, 989-992

**Eskelinen, M.J., Lipponen, P.K. & Syrjanen, K., (1992):**

Nucleolar organizer regions (AgNORs) related to histopathological characteristics and survival in prostatic adenocarcinoma.  
Anticancer Res., 12, 1635-1640

**Eusebi, V., Cattani, M.G. & Lamovec, J., (1991):**

Prognostic relevance of silver stained nucleolar proteins in sarcomatoid carcinomas of the breast.  
Ultrastruct. Pathol., 15, 203-214

**Fallowfield, M.E., Dodson, A.R. & Cook, M.G., (1988):**

Nucleolar organizer regions in melanocytic dysplasia and melanoma.  
Histopathology, 13, 95-99

**Ferrari, A.R., Bianchi, F.M. & Migliorini, L., (1993):**

Proposal for a semiquantitative evaluation method for AgNORs (rap score).  
Pathologica, 6, 661-665

**Ferrer, L., Fondevila, D., Rabanal, R. & Ramis, A., (1992):**

Detection of T-lymphocytes in canine tissue embedded in paraffin wax by means of antibody to CD 3 antigen.  
J. Comp. Pathol., 106, 311

**Field, D.H., Fitzgerald, P.H. & Sin, F.Y., (1984):**

Nucleolar silver-staining patterns related to cell cycle phase and cell generation of PHA-stimulated human lymphocytes.  
Cytobios, 41, 23-33

**Friedrich, K., Sturm, U., Dimmer, U. & Flössel, C., (1994):**

Darstellung und mögliche prognostische Bedeutung der Nukleolus-organisierenden Regionen (NOR), des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1A/1B (MAP) sowie der Intermediärfilamente Vimentin und Cytokeratin 19 bei invasiven duktalem Mammakarzinomen.  
Zentralbl. Pathol., 140, 61-71

**Gall, E.A. & Mallory, T.B., (1942):**

Malignant lymphoma. A clinico-pathologic survey of 618 cases.  
Am. J. Pathol., 18, 381-429

**Gambacorta, M., Bauer, D. & Brusamolino, R., (1993):**

Multifactorial study of colorectal cancer: quantitative evaluation of geometric parameters and cell proliferation. Correlation with clinical data.  
Pathol. Res. Pract., 189, 701

**Gan, X., (1995):**

Quantitative study of AgNOR in differential diagnosis between non-Hodgkin's lymphoma and reactive hyperplasia.  
Chin. Med. J., 108, 132-137

**Gangadharan, B. & Rajan, A., (1992):**

Assessment of efficacy of certain tumour markers in ethmoid carcinoma.  
Ind. J. Vet. Pathol., 16, 73-75

**Gendron-Fitzpatrick, A.P., (1986):**

A functional classification of canine malignant lymphoma by histology, immunoperoxidase and cytochemistry.  
Thesis, University of Southern California, Los Angeles

**Gerdes, J., Schwab, U., Lembke, H. & Stein, H., (1983):**

Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.  
Int. J. Cancer, 31, 13-20

**Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U. & Stein, H.,** (1984):

Cell cycle analysis of a cell-proliferation associated human nucleolar antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.  
J. Immunol., 133, 1710-1715

**Gerdes, J., Li, L. & Schlüter, C.,** (1991):

Immunobiochemical and molecularbiological characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen is defined by monoclonal antibody Ki-67.  
Am. J. Path., 138, 867-873

**Gerdes, J., Becker, M.H.G., Key, G. & Cattoretti, G.,** (1992):

Immunohistological detection of tumour growth (Ki-67 antigen) in formalinixed and routinely processed tissue.  
J. Pathol., 168, 85-87

**Giger, U., Evans, S.M., Hendrick, M.J. & Dudek, S.M.,** (1989):

Orthovoltage radiotherapy of primary lymphoma of bone in a dog.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 195, 627-630

**Giri, D.D., Nottingham, J.F. & Lawry, J.,** (1989):

Silver binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: correlation with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry.  
J. Pathol., 157, 307-313

**Giuffre, G., Barresi, G., Speciale, G., Gioffre Sarnelli, R., Florio, M.A. & Tuccari, G.,** (1997):

Differences in AgNOR quantity between colorectal cancer and corresponding metastases: are they useful for prognostic purposes?  
Eur. J. Histochem., 41, 111-118

**Goessens, G.,** (1984):

Nucleolar structure.  
Int. Rev. Cytol., 87, 107-155

**Golough, R., Bracko, M. & Frkovic-Grazio, S.,** (1993):

Prognostic significance of histologic and proliferative parameters in spindle cell sarcomas.  
Pathol. Res. Pract., 189, 706

**Gonzalez-Campora, R., Armas-Padron, J.R. & Rios-Martin, J.,** (1991):

Nucleolar organizer regions in pigmented skin lesions - value in the differential diagnosis of Spitz nevi.  
Anat. Quant. Cytol. Histol., 13, 16-22

**Goodlad, J.R., Crocker, J. & McCartney, J.C.,** (1991):

Nucleolar ultrastructure in low- and high-grade Non-Hodgkin's lymphomas.  
J. Pathol., 163, 233-237

**Goodpasture, C. & Bloom, S.E.,** (1975):

Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Chromosomes Using Silver Staining.  
Chromosoma, 53, 37-49

**Gray, K.N., Raulston, G.L., Gleiser, C.A. & Jardine, J.H.,** (1984):

Histologic classification as an indication of therapeutic response in malignant lymphoma of dogs.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 184, 814-817

**Greenlee, P.G., Filippa, D.A., Quimby, F.W., Patnaik, A.K., Calvano, S.E., Matus, R.E., Kimmel, M., Hurvitz, A.I. & Liebermann, P.H.,** (1990):

Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic and clinical study.  
Cancer, 66, 480-491

**Griffiths, A.P., Butler, C.W. & Roberts, P.,** (1989):

Silverstained structures (AgNORs), their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma.  
J. Pathol., 159, 121-127

**Grindem, C.B. & Buoen, L.C.,** (1986):

Cytogenetic analysis of leukaemic cells in the dog. A report of 10 cases and a review of literature.  
J. Comp. Pathol., 96, 623

**Grossman, B., Schechter, G.P., Horton, J.E., Pierce, L., Jaffe, E. & Whal, L.,** (1981):

Hypercalcemia associated with the T-cell lymphoma-leukemia.  
Am. J. Clin. Pathol., 75, 149-154

**Haberland, C., Martin, H., Guski, H., Hufnagl, P. & Vogel, S.,** (1996):

AgNOR analysis of astrocytoma in childhood.  
Zentralbl. Neurochir., 57, 5-11

**Hahn, K.E., Richardson, R.C., Teclaw, R.F., Cline, J.M., Carlton, W.W., DeNicola, D.B. & Bonney, P.L.,** (1992):

Is maintenance chemotherapy appropriate for the management of canine malignant lymphoma?  
Vet. Int. Med., 6, 3

**Hahn, K.E., Richardson, R.C., Hahn, E.A. & Chrisman, C.L.,** (1994):

Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma.  
Vet. Pathol., 31, 528-540

**Hall, P.A., Crocker, J., Watts, A. & Stansfield, A.G.,** (1988):

A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki 67 immunostaining in Non-Hodgkin's lymphoma.  
Histopathology, 12, 373-381

**Hansen, A.B. & Ostergard, B.,** (1990):

Nucleolar organizer regions in hyperplastic and neoplastic prostatic tissue.  
Virchows Arch. A, 147, 9-13

**Hara, A., Hirayama, H. & Sakai, N.,** (1990):

Correlation between nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in human gliomas.  
Surg. Neurol., 33, 320-324

**Hara, A., Hirayama, H. & Sakai, N.,** (1991):

Nucleolar organizer region score and Ki-67 labelling index in high-grade gliomas and metastatic brain tumours.  
Acta Neurochir., 109, 37-41

**Harare, R., Shahar, R., Zuckerman, A. & Nyska, A.,** (1995):

Silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in canine mammary tumors measured by image analysis and direct counting: correlation to histology and clinical behaviour.

Israel J. Vet. Med., 50, 147-155

**Hardell, L., Eriksson, M., Lenner, P. & Lundgren, E.,** (1981):

Malignant lymphoma and exposure to chemicals, especially organic solvents, chlorophenols and phenoxy acids: a case-control study.  
Br. J. Cancer, 43, 169-175

**Hardy, W.D.,** (1976):

The ethiology of canine and feline tumours.  
J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 12, 313-33

**Harmelin, A., Zuckerman, A. & Nyska, A.,** (1995):

Correlation of AgNOR protein measurements with prognosis in canine transmissible venereal tumour.  
J. Comp. Path., 112, 429-433

**Hastrup, N., Hamilton-Dutoit, S., Ralfkiaer, E. & Pallesen, G.,** (1991):

Peripheral T-cell lymphomas: an evaluation of reproducibility of the updated Kiel classification.  
Histopathology, 18, 99-105

**Hayes, H.M., Tarone, R.E., Cantor, K.P., Jessen, C.R., McCurnin, D.M. & Richardson, R.C.,** (1991):

Case-Control Study of Canine Malignant Lymphoma: Positive Association with Dog Owner's Use of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Herbicides.  
J. Natl. Cancer Inst., 83, 1226-1231

**Heath, H., Weller, R.E. & Mundy, G.R.,** (1980):

Canine lymphosarcoma: A model for study of the hypercalcemia of cancer.  
Calcif. Tissue Int., 30, 127-131

**Helpap, B.,** (1989):

Nucleolar grading of breast cancer. Comparative studies on frequency and localization of nucleoli and histology, stage, hormonal receptor status and lectin histochemistry.  
Virchows Arch. A, 415, 501-508

**Hendricks, J.B., Rainer, R. & Munakata, S.,** (1995):

Computer-assisted and visual methods of assessing cellular proliferation in tissue sections from non-Hodgkin's lymphoma. A comparison.  
Analyt. Quant. Cytol. Histol., 17, 383-388

**Hermanek, D.P., Scheibe, O., Spiessl, B. & Wagner, G.,** (1987):

Klassifikation maligner Tumoren.  
Berlin, Akademie-Verlag

**Hernandez-Verdun, D. & Derenzini, M.,** (1983):

Non-nucleosomal configuration of chromatin in nucleolar organizer regions of metaphase chromosomes in situ.  
Eur. J. Cell. Biol., 31, 360-365

**Hittmair, A. & Öfner, D.,** (1991):

Silver stained nucleolar organizer regions in cancer cells. Letter to the Editor.  
Lab. Invest., 64, 718-719

**Hohenhaus, A.E. & Matus, R.E.,** (1990):

Etoposide (VP-16): retrospective analysis of treatment in 13 dogs with lymphoma.  
J. Vet. Int. Med., 4:5, 239-241

**Holmberg, C.A., Manning, J.S. & Osburn, B.I.,** (1976):

Canine Malignant Lymphomas: Comparison of Morphologic and Immunologic Parameters.  
J. Natl. Cancer Inst., 59, 125-135

**Howat, A.J., Giri, D.D. & Wright, A.L.,** (1988):

Silver-stained nucleoli and nucleolar organizer region counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma.  
J. Pathol., 156, 227-232

**Howat, A.J., Giri, D.D., Cotton, D.W.K. & Slater, D.N.,** (1989):

Nucleolar organizer regions in Spitz naevi and malignant melanomas.  
Cancer, 63, 474-478

**Howell, W.M.,** (1977):

Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocytes chromosomes.  
Chromosoma, 62, 361-365

**Howell, W.M.,** (1982):

Selective staining of nucleolus organizer regions.  
In: Busch, H. & Rothblum, L. (Hrsg.): The cell nucleus.  
Academic Press, New York, 90-142

**Howell, W.M. & Black, D.A.,** (1980):

Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method.  
Experientia, 36, 1014-1015

**Hufnagel, P. & Guski, H.,** (1994):

The role of AgNORs in tumour pathology.  
Zentralbl. Pathol., 140, 1-2

**Hufnagel, P., Beil, K. & Wenzelides, K.,** (1991):

Measurement of number, size and location of AgNORs in histological sections of astrocytomas and urinary bladder carcinomas.  
Zentralbl. Pathol., 137, 493-497

**Hufnagel, P., Guski, H. & Schulz, H.J.,** (1994):

Measuring of AgNORs using image analysis.  
Zentralbl. Pathol., 140, 31-35

**Husain, N., Bagchi, M., Husain, M. & Tiwari, B.,** (1997):

AgNOR expression in CNS neoplasms.  
Ind. J. Pathol. Microbiol., 40, 503-509

**Ivjanyi, J.L., Kiss, A. & Telek, B.,** (1992):

Nucleolar organizer regions in acute and chronic leukaemias.  
Acta Histochem., 93, 453-461

**Jaffe, E.S.**, (1990):

The role of immunophenotypic markers in the classification of Non-Hodgkin's lymphomas.  
Sem. Oncol. 17, 11-19

**Jaffe, E.S., Strauchen, J.A. & Berard, C.W.**, (1982):

Predictability of immunologic phenotype by morphologic criteria in diffuse aggressive Non-Hodgkin's lymphomas.  
Am. J. Clin. Pathol., 77, 46-49

**Jakijc-Razumovijc, J., Uzarevic, B. & Petroveicki, M.**, (1992):

AgNORs predictive value of prognosis in non-Hodgkin's lymphoma: comparison with flow cytometric cell cycle analysis.  
Leuk. Lymphoma, 7, 165-170

**Jakijc-Razumovijc, J., Labar, B., Cör, A. & Radman, I.**, (1993a):

Regija nukleolarnog organizatora u malignih ne-Hodgkinovih limfoma.  
Lijec Vjesn, 114, 18-21

**Jakijc-Razumovijc, J., Tentor, D., Petroveicki, M. & Radman, I.**, (1993b):

Nucleolar organizer regions and survival in patients with Non-Hodgkin's lymphomas classified by the working formulation.  
J. Clin. Pathol., 46, 943-947

**Jan-Mohamed, R.M., Armstrong, S.J., Crocker, J., Leyland, M.J. & Hulten, M.A.**, (1989):

The relationship between number of interphase NORs and NOR-bearing chromosomes in Non-Hodgkin's lymphoma.  
J. Pathol., 158, 3-7

**Jan-Mohamed, R.M., Murray, P.G., Crocker, J. & Leyland, M.J.**, (1990):

Sequential demonstration of nucleolar organizer regions and Ki-67 immunolabelling in Non-Hodgkin's lymphomas.  
Clin. Lab. Haematol., 12, 395-399

**Janowska-Wieczorek, A., Andrews, E.J., Khaliq, A. & Pilarski, L.M.**, (1987):

Deficiency of mature B- and T-lymphocyte subset in the blood of Non-Hodgkin lymphoma patients.  
Am. J. Hematol., 26, 125-134

**Jarrett, W.F.H., Crighton, G.W. & Dalton, R.G.**, (1966):

Leukemia and lymphosarcoma in animals and man.  
Vet. Rec., 79, 693-699

**Jeglum, K.A., Winters, W.D. & Young, K.M.**, (1989):

In vitro immune monitoring of antibody response in dogs given chemoimmunotherapy for lymphoma.  
Am. J. Vet. Res., 50, 488-492

**Jennings, A.R.**, (1953):

Blood and visceral changes in canine leukemia (lymphadenosis).  
J. Comp. Pathol., 63, 85-91

**Johnson, G.C., Miller, M.A. & Ramos-Vara, J.A.**, (1995):

Comparison of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and mitotic index in distinguishing benign from malignant canine smooth muscle tumours and in separating inflammatory hyperplasia from neoplastic lesions of the urinary bladder mucosa.  
J. Vet. Diagn. Invest., 7, 127-136

**Johnson, R.E., Cameron, T.P. & Kinard, R.**, (1968):

Canine lymphoma as a potential model for experimental therapeutics.  
Cancer Res., 28, 2562-2564

**Johnson, R.E., O'Connor, G.T., Titus, W. & Hafermann, M.D.**, (1969):

Comparative clinical, histologic and radiotherapeutic aspects of canine and human malignant lymphoma.  
Radiology, 93, 395-399

**Jones, S.E., Rosenberg, S.A. & Kaplan, H.S.**, (1972):

Non-Hodgkin's lymphomas. I. Bone marrow involvement.  
Cancer, 29, 954-961

**Jones, S.E., Grozea, P.N., Miller, T.P., Van Slyck, E.J., Balcerzak, S.P., Constanzi, J.J., Morrison, F.S., Eyre, H.J., Fabian, C.J., Dabich, L., Dixon, D.O., Hartssock, R.J., Grogan, T.M., Kjeldsberg, C. & Schnitzer, B.**, (1985):

Chemotherapy with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone alone or with levamisole or with levamisole plus BCG for malignant lymphoma: a Southwest Oncology Group study.  
J. Clin. Oncol., 3, 1318-1323

**Jonjic, N., Eminovic, M. & Krstulja, E.M.**, (1993):

Association between DNA ploidy pattern and nucleolar organizer regions (AgNORs) in colorectal carcinomas.  
Pathol. Res. Pract., 189, 722

**Jordan, E.G. & Cullis, C.A.**, (1982):

The nucleolus.  
Cambridge Univ. Press, London, New York,

**Juntes, P., Cor, A., Pogacnik, M. & Senk, L.**, (1995):

Comparison of the results of the silver nucleolar organizer region (AgNOR) technique on normal and carcinomatous mammary glands of dogs using two different image analysis systems.  
Zbornik Vet. Fak. Uni. Ljubljana, 32, 7-12

**Kajiwara, K., Nishizaki, T. & Orita, T.**, (1990):

Silver colloid staining technique for analysis of glioma malignancy.  
J. Neurosurg., 73, 113-117

**Takeji, Y., Korenaga, D. & Tsujitani, S.**, (1991):

Predictive value of Ki-67 and argyrophilic nucleolar organizer region staining for lymph node metastasis in gastric cancer.  
Cancer Res., 51, 3503-3506

**Kalir, T., Chan, K.S., Liu, Z., Strauchen, J. & Gil, J.**, (1994):

Semi-automatic quantitation of nucleolar organizer regions in Non-Hodgkin's lymphomas.  
Pathol. Res. Pract., 190, 124-128

**Kaneko, S., Ishida, T. & Sugio, K.**, (1991):

Nucleolar organizer regions as a prognostic indicator for stage I non-small cell lung cancer.



Cancer Res., 51, 4008-4011

**Kaplan, P.L. & Meier, P.,** (1958):  
Nonparametric estimation from incomplete observations.  
J. Am. Stat. Assoc., 53, 457-481

**Keller, E.T.,** (1992):  
Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma.  
Cancer, 70, 2334-2337

**Ker, C.G.,** (1997):  
Silver-binding nucleolar organizer regions in hepatolithiasis and bile duct cancer.  
Proceed. Nat. Science Council, China, 21, 43-48

**Kim, I., Park, S.H & Paik, S.Y.,**(1988):  
Nucleolar organizer regions of lymphomas in Korea.  
J. Korean Med. Sci.,3,99-105

**Kinoshita, K., Kamihira, S., Ikeda, S., Yamada, Y., Muta, T., Kitamura, T., Ichimaru, M. & Matsuo, T.,** (1982):  
Clinical, hematologic and pathologic features of leukemic T-cell lymphoma.  
Cancer, 50, 1554-1562

**Klein, G.,** (1980):  
Viral Oncology.  
New York, Raven Press

**Korek, G., Martin, H. & Wenzelides, K.,** (1991):  
A modified method for the detection of nucleolar organizer regions (AgNORs).  
Acta. Histochem., 90, 155-157

**Kram, N., Nessim, S. & Geller, S.A.,** (1989):  
A study of colonic adenocarcinoma, with comparison of histopathology, DNA flow cytometric data and number of nucleolar organizer regions (NORs).  
Mod. Pathol., 2, 468-472

**Kravis, L.D., Vail, D.M., Kisseberth, W.C., Ogilvie, G.K. & Volk, L.M.,** (1996):  
Frequency of argyrophilic nuclear organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 209, 1418-1420

**Krishnaiah, P.R. & Rao, C.R.,**(1991)  
Multivariate analysis.  
In: Multivariate statistics and probability. Academic Press, Boston

**Kristofferson, U., Heim, S., Mandahl, N., Olson, H., Ranstam, J., Akerman, M. & Mitelman, F.,** (1987):  
Prognostic implications of cytogenetic findings in 106 patients with Non-Hodgkin lymphoma.  
Cancer Genet. Cytogenet., 25, 55-63

**Kumar, A., Kushawa, A.K., Kumar, M. & Gupta, S.,** (1997):  
Argyrophilic nucleolar organizer regions: their value and correlation with clinical prognostic factors in breast carcinoma.  
J. Surg. Oncol., 65, 201-204

**Laing, E.J. & Carter, R.F.,** (1988):  
Acute tumour lysis syndrome following treatment of canine lymphoma.  
J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 24, 691-96

**Laing, E.J., Fitzpatrick, P.J., Binnington, A.G., Norris, A.M., Mosseri, A., Rider, W.D., Valli, V.E. & Baur, A.,** (1988):  
Half-body radiotherapy in the treatment of canine lymphoma.  
J. Vet. Int. Med., 3, 102-108

**LeBeau, M.M.,** (1990):  
Chromosomal abnormalities in Non-Hodgkin's lymphomas.  
Sem. Oncol., 17, 20-27

**Lennert, K. & Feller, A.C.,** (1990):  
Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome.  
2nd Edition, Springer Verlag, Berlin

**Lennert, K. & Mohri, N.,** (1978):  
Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease: Histopathology and diagnosis of Non-Hodgkin's lymphomas.  
Springer-Verlag, New York, 111

**Lennert, K., Collins, R.D. & Lukes, R.J.,** (1983):  
Concordance of the Kiel and Lukes-Collins classification of Non-Hodgkin's lymphomas.  
Histopathology, 7, 549-559

**Leong, A.S. & Gilham, P.,** (1989):  
Silver staining of nucleolar organizer regions in malignant melanoma and melanotic nevi.  
Human. Pathol., 20, 257-262

**Leong, A.S. & Raymond, W.A.,**(1986):  
Demonstration of AgNOR-related proteins in microwave-fixed tissues.  
J. Pathol., 156, 352

**Lesty, C., Raphael, M., Chleq, C. & Binet, J.L.,** (1990):  
Nucleolar topography of nuclei in histologic sections.  
Analyt. Quant. Cytol. Histol., 12, 242-250

**Lesty, C., Chleq, C. & Contesso, G.,** (1992):  
Nucleoli and AgNOR proteins in 32 cases of primary breast carcinoma. Spatial pattern of interactions between 50 clinical and histometric criteria.  
Analyt. Quant. Cytol. Histol., 14, 175-186

**Levine, A.M.,** (1990):  
Lymphoma in acquired immunodeficiency syndrom.  
Sem. Oncol., 17, 20-29

**Lieberman, P.H., Filippa, D.A., Straus, D.J., Thaler, H.T., Cirrincione, C. & Clarkson, B.D., (1986):**

Evaluation of malignant lymphomas using three different classifications and the Working Formulation. 482 cases with median follow-up of 11,9 years.  
Am. J. Med., 81, 365-379

**Linder, L.E., (1993):**

Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNORs).  
J. Histochem. Cytochem., 41, 439

**Lippman, S.M., Miller, T.P., Spier, C.M., Slymen, D.J. & Grogan, T.M., (1988):**

The prognostic significance of the immunotype in diffuse large-cell lymphoma: a comparative study of the T-cell and B-cell phenotype.  
Blood, 72, 436-441

**Lukes, R.J. & Collins, R.D., (1974):**

Immunologic characterization of human malignant lymphomas.  
Cancer, 34, 1488-1503

**Lynch, H.T., Marcus, J.N. & Lynch, J.F., (1992):**

Genetics of Hodgkin's and Non-Hodgkin's lymphoma: a review.  
Cancer Invest, 10, 247

**Macon, W.R., Williams, M.E., Greer, J.P., Stein, R.S., Collins, R.D. & Cousar, J.B., (1992):**

T-cell-rich B-cell lymphomas. A clinicopathologic study of 19 cases.  
Am. J. Surg. Pathol., 16, 351-363

**Madewell, B.R., (1986):**

Haematological and bone marrow cytological abnormalities in 75 dogs with malignant lymphomas.  
J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 22, 235

**Madewell, B.R. & Theilen, G.H., (1987):**

Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions.  
In: Madewell, B.R. & Theilen, G.H.(Hrsg.): Vet. Cancer Med., Part IV.  
2. edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 392-407

**Maier, H., Morimura, T. & Öfner, D., (1990):**

AgNOR nucleolar organizer region proteins (AgNORs) in human brain tumours: relation with grade of malignancy and proliferative indices.  
Acta Neuropathol., 80, 156-162

**Mamaev, N.N., Medvedeva, N.V., Shust, V.F., Markochev, A.B. & Pasternak, N.D., (1997):**

Nucleoli and AgNORs in Hodgkin's disease.  
Molec. Pathol., 50, 149-152

**Mandell, C.P., O'Neill, S.L. & Feldman, B.F., (1992):**

Antithrombin III concentrations associated with L-asparaginase administration.  
Vet. Clin. Pathol., 21:2, 68-70

**Marbaix, E., Dewandeleer, S. & Habba, U., (1989):**

Nucleolar organizer regions in the normal and carcinomatous epithelium of the uterine cervix.  
Int. J. Gynecol. Pathol., 8, 237-245

**Martin, H., (1975):**

The importance of the AgNOR analysis in malignant tumours.  
Zentralblatt Pathol., 140, 15-22

**Martin, H., Hufnagel, P. & Beil, M., (1992):**

Nucleolar organizer region-associated proteins in cancer cells. Quantitative investigations on gliomas, meningiomas, urinary bladder carcinomas and pleural lesions.  
Analyt. Quant. Cytol. Histol., 14, 312-319

**Martin, H., Greiner, K., Beil, M. & Hufnagel, P., (1996):**

The significance of the nucleolar organizer region antigen for the differentiation of laryngeal dysplasias and laryngeal carcinoma.  
HNO, 44, 22-26

**McCarty, G.A., (1985):**

Autoimmunity and malignancy.  
Med. Clin. North Am., 69, 599-615

**McEwen, E.G., Brown, N.O., Patnaik, A.K., Hayes, A.A. & Passe, S., (1981):**

Cyclical combination therapy of canine lymphosarcoma.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 178, 1178-1182

**McEwen, E.G., Hayes, A.A., Matus, R.E. & Kurzman, I., (1987a):**

Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog. 147 cases (1978-1981).  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 190, 564-568

**McEwen, E.G., Rosenthal, R., Matus, R., Viau, A.T. & Abuchowski, A., (1987b):**

A preliminary study on the evaluation of asparaginase. Polyethylene glycol conjugate against canine malignant lymphoma.  
Cancer, 59, 2011-2015

**McEwen, E.G., Rosenthal, R.C., Fox, L.E., Loar, A.S. & Kurzman, I.D., (1992):**

Evaluation of L-asparaginase: polyethylene glycol conjugate versus native L-asparaginase combined with chemotherapy. A randomized double blind study in canine lymphoma.  
J. Vet. Int. Med., 6, 230-234

**McKeithan, T.W., (1990):**

Molecular biology of Non-Hodgkin's lymphomas.  
Sem. Oncol. 17, 30-40

**McKenzie, J.L. & Fabre, J.W., (1981):**

Studies with a monoclonal antibody on the distribution of the Thy-1 in the lymphoid and extracellular connective tissues of the dog.  
Transplantation, 31, 275-281

**Miller, T.P., Dana, B.W., Weick, J.K., Jones, S.E., Coltman, C.A., Danilberg, S. & Fisher, R.I., (1988):**

Southwest Oncology Group clinical trials for intermediate- and high-grade Non-Hodgkin's lymphomas.  
Sem. Hematol. 25, 2, 17-22

**Moldovanu, G., Friedmann, M. & Miller, D.G., (1966a):**

Treatment of canine malignant lymphoma with surgery and chemotherapy.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 148, 153-156

**Moldovanu, G., Moore, A.E., Friedmann, M. & Miller, D.G.,** (1966b):  
Cellular transmission of lymphosarcomas in dogs.  
Nature, 210, 1342

**Moore, P.F., Rossitto, P.V. & Danilenko, D.M.,** (1990):  
Canine leukocyte integrins: characterization of a CD18 homologue.  
Tissue Antigens, 36, 211-219

**Moore, P.F., Rossitto, P.V., Danilenko, D.M., Wielenga, J.J., Raff, R.F. & Severns, E.,** (1992):  
Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils.  
Tissue Antigens, 40, 75-85

**Moormeier, J.A., Williams, S.F. & Golomb, H.M.,** (1990):  
The staging of Non-Hodgkin's lymphomas.  
Semin. Oncol., 17, 43-50

**Moreno, F.J., Villamarin, A., Garcia Herdugo, G. & Lopez Campos, J.L.,** (1988):  
Silver staining of the nucleolar organizer regions (NORs) in semithin lowacryl sections.  
Stain Technol., 63, 27

**Moulton, J.E.,**(1990):  
Tumours of the lymphoid and hematopoietic tissues.  
In: Tumours in Domestic Animals. Uni. Calif. Press, 3rd edition,  
Berkeley-Los Angeles-London

**Moulton, J.E. & Bostick, W.L.,** (1958):  
Canine malignant lymphoma, simulating Hodgkin's disease in man.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 132, 204-209

**Mourad, W.A., Erkman-Babis, B. & Livingston, S.,** (1992):  
Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. Correlation with DNA flow cytometry, histopathology and lymph node status.  
Cancer, 69, 1739-1744

**Mourad, W.A., Sneige, N., Katz, R.L. & Orchornez, N.G.,** (1994):  
Correlation of two AgNOR counts with Ki-67 labeling index: a study in fine-needle aspirates of lymphoproliferative disorders and breast carcinoma.  
Diagn. Cytopathol., 10, 113-119

**Mueller, N.E., Mohar, A. & Evans, A.,** (1992):  
Viruses other than HIV and Non-Hodgkin's lymphoma.  
Cancer Res., 52, (Suppl.), 5479s-5481s

**Mukherjee, J., Misra, V., Gupta, S.C., Gupta, A.K. & Tandon, S.P.,** (1997):  
Argyrophilic nucleolar organizer regions in atypical adenomatous hyperplasias, prostatic intraepithelial neoplasias and prostatic neoplasms.  
Urol. Internat., 58, 75-79

**Muller, G.H., Kirk, R.W. & Scott, D.W.,** (1989):  
Cutaneous lymphosarcoma.  
In: Small animal dermatology.  
Wb Saunders Co., Philadelphia, 918-929

**Munakata, S. & Hendricks, J.B.,**(1993):  
Morphometric analysis of AgNORs in imprints and sections from Non-Hodgkin's lymphomas. An approach to standardization.  
Analyt. Quant. Cytol. Histol., 15, 329-334

**Murray, P.G., Boldy, D.A., Crocker, J. & Ayres, J.G.,** (1989):  
Sequential demonstration of antigens and AgNORs in frozen and paraffin sections.  
J. Pathol., 159, 169-172

**Naik, R., Raghuvver, C.V. & Jacob, B.L.,** (1997):  
Silver staining nucleolar organizer region (AgNOR) study in melanocytic skin tumors.  
J. Ind. Med. Assoc., 95, 420-421

**Narashimham, P.,** (1984):  
Tamoxifen in the treatment of refractory lymphoma.  
New Engl. J. Med., 311, 1258-1259

**NCI,** (1982):  
The Non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of Non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a working formulation for clinical usage.  
Cancer, 49, 2112-2135

**Noorduyn, L.A., Van der Valk, P., Van Heerde, P., Vroom, T.M., Blok, P., Willemze, R. & Meijer, C.J.L.M.,** (1990):  
Stage is a better prognostic indicator than morphologic subtype in primary noncutaneous T-cell lymphoma.  
Am. J. Clin. Pathol., 93, 49-57

**Novotney, C.A., Page, R.L., Macy, D.W., Dewhirst, M.W., Oglvie, G.K., Withrow, S.J., McEntee, M.C., Heidner, G.L., Allen, S.A., Thrall, D.E. & Gillette, E.L.,** (1992):  
Phase I evaluation of doxorubicin and whole-body hyperthermia in dogs with lymphoma.  
J. Vet. Int. Med., 6:4, 245-249

**Oates, J.L., Bostock, D.E., Morris, J.S. & Crocker, J.,** (1994):  
Correlation between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) scores, histologic diagnosis and post-surgical survival in dogs with spontaneous mammary tumours.  
in press

**Öfner, D., Tötsch, M. & Sandbichler, P.,** (1990):  
Silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as a predictor of prognosis in colonic cancer.  
J. Pathol., 162, 42-49

**Öfner, D., Hittmair, A., Marth, C., Öfner, C., Tötsch, M., Daxenbichler, G., Mikuz, G., Margreiter, R. & Schmid, K.W.,** (1992):  
Relationship between quantity of silver-stained nucleolar organizer regions associated proteins (AgNORs) and population doubling time in ten breast cancer cell lines.  
Path. Res. Pract., 188, 742-746

**Ofner, D., Bankfalvi, A., Riehemann, K., Böcker, W. & Schmid, K.W.**, (1994a):

Standardisierte AgNOR-Färbemethode für formalinfixiertes und paraffineingebettetes Material.  
Pathologie, 15, 226-230

**Öfner, D., Hittmair, A. & Maier, H.**, (1994b):

Sequential quantification of AgNOR area and number during silver staining by means of an image analysis system.  
Zentralbl. Pathol., 140, 37-40

**Ogilvie, G.K., Reynolds, H.A., Richardson, R.C., Withrow, S.J., Norris, A.M., Henderson, R.A., Klausner, J.S., Fowler, J.D. & McCaw, D.**, (1989):

Phase II evaluation of doxorubicin for treatment of various canine neoplasms.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 195:11, 1580-1583

**Ogilvie, G.K., Obradovich, J.E., Elmslie, R.E., Vail, D.M., Moore, A.S., Straw, R.C., Dickinson, K., Cooper, M.F. & Withrow, S.J.**, (1991a):

Efficacy of mitoxantrone against various neoplasms in dogs.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 198:9, 1618-1621

**Ogilvie, G.K., Vail, D.M., Klein, M.K., Powers, B.E. & Dickinson, K.**, (1991b):

Weekly administration of low-dose doxorubicin for treatment of malignant lymphoma in dogs.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 198:10, 1762-1764

**Ogura, S., Abe, S. & Sukoh, N.**, (1992):

Correlation between nucleolar organizer regions visualized by silver staining and growth rate in lung adenocarcinoma.  
Cancer, 70, 63-68

**Ohkoudo, M., Sawa, H., Shiina, Y., Sato, H., Kamata, K., Iijima, J., Yamamoto, H., Fujii, M. & Saito, I.**, (1996):

Morphometrical analysis of nucleolin immunohistochemistry in meningiomas.  
Acta Neuropathol., 92, 1-7

**Okabe, Y., Nakamura, S. & Okumura, H.**, (1990):

The relation of argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions (AgNORs) to the proportions of Ki-67 or DNA polymerase alpha-reacting cells in non-Hodgkin's lymphomas.  
Anticancer Res., 11, 2031

**Onions, D.E.**, (1977):

B- and T-Cell Markers on Canine Lymphosarcoma Cells.  
J. Natl. Cancer Inst., 59, 1001-1006

**Onions, D.E.**, (1980):

RNA dependent DNA polymerase activity in canine lymphosarcoma.  
Eur. J. Cancer, 16, 345-350

**Onions, D.E.**, (1984):

A prospective survey of familial canine lymphosarcoma.  
J. Natl. Cancer Inst., 72, 909-912

**Orita, T., Kajiwara, K. & Nishizaki, T.**, (1990):

Nucleolar organizer regions in meningioma.  
Neurosurgery, 26, 43-46

**Orrell, J.M., Evans, A.T. & Grant, A.**, (1991):

A critical evaluation of AgNOR counting in benign and malignant melanoma.  
J. Pathol., 163, 239-244

**Owen, L.N.**, (1971):

Serial transplantation of canine lymphocytic leukemia.  
Eur. J. Cancer, 7, 525-528

**Owen, L.N.**, (1980):

TNM classification of tumours in domestic animals.  
World Health Organization, Geneva, 46-47

**Owen, L.N., Bostock, D.E., Betton, G.R., Onions, D.E., Holmes, J., Yoxall, A. & Gorman, N.**, (1975a):

The role of spontaneous canine tumours in the evaluation of the aetiology and therapy of human cancer.  
J. Small Anim. Pract., 16, 155-162

**Owen, L.N., Bostock, D.E. & Halliwell, R.E.W.**, (1975b):

Cell-mediated and humoral immunity in dogs with spontaneous lymphosarcomas.  
Eur. J. Cancer, 11, 187-191

**Papadimitiou, C.S., Athanasiadou, S., Stylianidou, A. & Karameris, A.**, (1991):

Nucleolar organizer regions in the normal, hyperplastic and carcinomatous epithelium of endometrium.  
Virchows Arch. B, 60, 155-160

**Parodi, A., Wyers, M. & Paris, J.**, (1968):

Incidence of canine lymphoid leukosis. Age, sex and breed distribution; results of a necropsic survey.  
In: Proc. 3rd Int. Symp. Comp. Leukemia Res.  
Bibl. Haemat. 31, Karger, Basel/New York, 263

**Parodi, A., Dargent, F. & Crespeau, F.**, (1988):

Histological classification of canine malignant lymphomas.  
J. Vet. Med. A, 35, 178-192

**Patt, S., Giraldo, M. & Martin, H.**, (1994):

AgNOR- and PCNA-studies in astrocytomas of the optic nerve.  
Zentralbl. Pathol., 140, 83-87

**Pedal, W.P., Warzok, R.W., Hufnagel, P. & Roth, K.**, (1994):

Nucleolar organizer regions (AgNORs) in astrocytic tumours.  
Zentralbl. Pathol., 140, 89-94

**Penn, I.**, (1984):

Cancer in immunosuppressed patients.  
Transplant. Procedure, 16, 492-494

**Pession, A., Farabegoli, F. & Trere, D.**, (1991):

The AgNOR proteins and transcription and duplication of ribosomal genes in mammalian cell nucleoli.  
Chromosoma, 100, 242-250

**Petushkov, V.I., Strozha, I.L., Bondare, D.K., Mironova, N.A., Voskobolinik, N.I. & Ose, A.I.,** (1994):  
Functional activity of the nucleolar organizer in the interphase granulocytic nuclei in chronic myeloid leukemia.  
Ark. Patol., 56, 28-30

**Pich, A., Valente, G. & Margaria, E.,** (1991):  
Argyrophilic nucleolar organizer region counts and Ki-67 scores in human renal cell carcinoma.  
Pathol. Res. Pract., 187, 482-486

**Pich, A., Chiusa, L. & Marmont, F.,** (1992a):  
Argyrophilic nucleolar organizer region counts in multiple myeloma: a histopathological study on bone marrow trephine biopsies.  
Virchows Arch. A. Pathol. Anat., 421, 143-147

**Pich, A., Chiusa, L. & Pisani, P.,** (1992b):  
Argyrophilic nucleolar organizer region counts and proliferating cell nuclear antigen scores are two reliable indicators of survival in pharyngeal carcinoma.  
J. Cancer Res. Clin. Oncol., 119, 106-110

**Pich, A., Chiusa, L., Boccadoro, M. & Marmont, F.,** (1994):  
AgNORs and myeloma prognosis.  
Leuk. Lymphoma, 12, 383-394

**Pich, A., Margaria, E., Chiusa, L., Ponti, R. & Geuna, M.,** (1996):  
DNA ploidy and p53 expression correlate with survival and cell proliferative activity in male breast carcinoma.  
Human Pathol., 27, 676-682

**Pich, A., Chiusa, L., Marmont, F. & Navone, R.,** (1997):  
Risk groups from myeloma patients by histologic pattern and proliferative activity.  
Am. J. Surg. Pathol., 21, 339-347

**Pierrepoint, C.G.,** (1985):  
Possible benefits to veterinary medicine of considering the dog as a model for human cancer.  
J. Small Anim. Pract., 26, 43-47

**Piffko, J., Bankfalvi, A., Ofner, D., Bryne, M., Rasch, D., Joos, U., Bocker, W. & Schmid, K.W.,** (1997):  
Prognostic value of histobiological factors (malignancy grading and AgNOR content) assessed at the invasive tumour front of oral squamous cell carcinomas.  
Br. J. Cancer, 75, 1543-1546

**Plate, K.H., Arndt, D. & Hellwig, D.,** (1990a):  
Assessment of histogenesis and proliferative potential in cytologic specimens of human brain tumours. Value of immunocytochemistry and nucleolar organizer regions.  
Anal. Quant. Cytol. Histol., 12, 157-164

**Plate, K.H., Rüschoff, J. & Mennel, H.D.,** (1990b):  
Nucleolar organizer regions in meningiomas: correlation with histopathologic malignancy grading, DNA cytometry and clinical outcome.  
Anal. Quant. Cytol. Histol., 12, 429-438

**Plate, K.H., Rüschoff, J., Behnke, J. & Mennel, H.D.,** (1990c):  
Proliferative potential of human brain tumours as assessed by nucleolar organizer regions (AgNORs) and Ki-67-immunoreactivity.  
Acta Neurochir.(Wien), 104, 103-109

**Plate, K.H., Rüschoff, J. & Mennel, H.D.,** (1992):  
Application of the AgNOR technique to neurooncology.  
Acta Histochem., Suppl., 42, 171-178

**Ploton, D.,** (1994):  
Structure and molecular organisation of the nucleolus.  
Zentralbl. Pathol., 140, 3-6

**Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F. & Adnet, J.J.,** (1986):  
Improvement in the staining and in the argyrophilic protein of the nucleolar organizer region at the optical level.  
Histochem.J., 18, 5-14

**Ploton, P., Visseaux-Coletto, B. & Canellas, J.C.,** (1992):  
Semiautomatic quantification of silver-stained nucleolar organizer regions in tissue sections and cellular smears.  
Anal. Quant. Cytol. Histol., 14, 14-23

**Portlock, C.S.,** (1990):  
Management of the low grade Non-Hodgkin's lymphomas.  
Sem. Oncol., 17, 51-57

**Preziosi, R., Della Salda, L., Ricci, A., Simoni, P. & Marcato, P.S.,** (1995):  
Quantification of nucleolar organizer regions in canine perianal gland tumors.  
Res. Vet. Sc., 58, 277-281

**Priester, W.A.,** (1967):  
Canine lymphoma: relative risk in the boxer breed.  
J. Natl. Cancer Inst., 39, 833-840

**Rajeevan, K., Aravindan, K.P. & Kumari, B.C.,** (1995):  
Value of AgNORs in fine needle aspiration cytology of breast lesions.  
Ind. J. Pathol. Microbiol., 38, 17-24

**Ramsay, A.D., Smith, W.J. & Isaacson, P.G.,** (1988):  
T-cell-rich B-cell lymphoma.  
Am. J. Surg. Pathol., 12, 433-443

**Rangan, S.R.S., Calvert, R.C. & Vitol, S.K.,** (1971):  
Fibrillar bundles in canine lymphomas. An ultrastructural study.  
J. Ultrastr. Res., 36, 425-436

**Rappaport, H.,** (1966):  
Tumours of the hematopoietic system.  
In: Rappaport, H.: Atlas of tumour pathology.

Washington DC, AFIP, section 3, fascicle 8

**Raskin, R.E. & Krehbiel, J.D.**, (1989):  
Prevalence of leukemic blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 194, 1427-1429

**Raymond, W.A. & Leong, A.S.**, (1989):  
Nucleolar organizer regions related to growth fraction in human breast carcinoma.  
Human Pathol., 20, 741-746

**Rebora, A.**, (1992):  
Prognosing melanomas: the agyrophilic nucleolar organizer region approach.  
Dermatology, 185, 166-168

**Reich, O., Heinisch, G. & Justus, J.**, (1993):  
Nukleolus-organisierende Regionen bei gut- und bösartigen Erkrankungen des exokrinen Pankreas - Vergleich mit einer Analyse des Proliferationsmarkers Ki-67.  
Pathologie, 14, 1-6

**Roccabianca, P., Caniatti, M., Scanziani, E., Mortellaro, C.M. & Greppi, G.**, (1992):  
Assessment of the argyrophil nucleolar organizer region (AgNOR) method used on cell samples from connective tissue tumours of dogs.  
Veterinaria Cremona, 6, 53-56

**Roller, E., Fritz, P. & Wicherer, C.**, (1993):  
Nucleolar organizer regions in human breast cancer.  
Zentralbl. Pathol., 139, 195-199

**Rosales, C., Jeglum, K.A., Obrocka, M. & Steplewski, Z.**, (1988):  
Cytolytic activity of murine anti-dog lymphoma monoclonal antibodies with canine effector cells and complement.  
Cell. Immunol., 115, 420-428

**Rosenberg, M.P., Matus, R.E. & Patnaik, A.K.**, (1991):  
Prognostic factors in dogs with lymphoma and associated hypercalcemia.  
J. Vet. Int. Med., 5, 268-271

**Rosenberg, S.A.**, (1977):  
Validity of the Ann Arbor staging classification for the Non-Hodgkin's lymphomas.  
Cancer Treat. Rep., 61, 1023-1027

**Rosenberg, S.A.**, (1979):  
Non-Hodgkin's lymphoma: Selection of treatment on the basis of histologic type.  
N. Engl. J. Med., 301, 924-928

**Rosenthal, R.C. & McEwen, E.G.**, (1990):  
Treatment of lymphoma in dogs.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 196, 774-779

**Roth, K. & Wenzelides, K.**, (1989):  
Das interaktive Bildverarbeitungssystem AMBA/R.  
Gegenbaurs morphol. Jahrb., 135, 25-32

**Roussel, P., Betenguer, P. & Amalric, F.**, (1992):  
Nucleolin is an AgNOR protein; this property is determined by its amino-terminal domain independently of its phosphorylation state.  
Exp. Cell. Res., 203, 259-269

**Rowlands, D.C.**, (1988):  
Nucleolar organizer regions in cervical intraepithelial neoplasia.  
J. Clin. Pathol., 41, 1200-1202

**Rowlands, D.C., Ayres, J.G. & Crocker, J.**, (1993):  
The effect of different fixatives and length of fixation time on subsequent AgNOR staining for frozen and paraffin-embedded tissue sections.  
Histochem. J., 25, 123-132

**Rudolph, R.**, (1971):  
Virusähnliche Strukturen in Tumorzellen bei lymphatischer Leukose des Hundes.  
Berliner Münchener Tierärztlicher Wochenschrift, 84, 68-69

**Rüschhoff, J.**, (1992):  
Nukleolus organisierende Regionen (NORs) in der pathomorphologischen Tumordiagnostik.  
Stuttgart, Fischer, 1992

**Rüschhoff, J. & Barth, P.**, (1992):  
Theorie und Praxis der Silberfärbung Nukleolus organisierender Regionen (AgNORs).  
Pathologie, 13, 13-19

**Rüschhoff, J. & Kleb, B.**, (1992):  
Silberfärbung Nukleolus-organisierender Regionen (AgNOR).  
mta, 12, 1264-1267

**Rüschhoff, J., Bittinger, A. & Plate, K.**, (1989a):  
Application of the AgNOR method to cell imprints.  
J Pathol., 158, 333

**Rüschhoff, J., Plate, K.H., Bittinger, A. & Thomas, C.**, (1989b):  
Nucleolar organizer regions (NORs). Basic concepts and practical applications in tumour pathology.  
Pathol. Res. Pract., 185, 878-885

**Rüschhoff, J., Bittinger, A. & Neumann, K.**, (1990a):  
Prognostic significance of nucleolar organizer regions (NORs) in carcinomas of the sigmoid colon and rectum.  
Pathol. Res. Pract., 186, 85-91

**Rüschhoff, J., Neumann, K. & Contractor, H.**, (1990b):  
Assessment of nucleolar organizer regions by automatic image analysis in breast cancer: correlation with DNA content, proliferation rate, receptor status and histopathological grading.  
J. Cancer Res. Clin. Oncol., 116, 480-485

**Rüschoff, J., Plate, K.H. & Contractor, H.,** (1990c):

Evaluation of nucleolar organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to the standardization.  
J. Pathol., 161, 113-118

**Rüschoff, J., Fauser, G., Knüchel, R. & Hofstädter, F.,** (1994):

AgNOR quantification with special reference to staining patterns.  
Zentralbl. Pathol., 140, 23-30

**Safran, N., Perk, K. & Eyal, O.,** (1992):

Isolation and preliminary characterisation of a novel retrovirus isolated from a leukaemic dog.  
Res. Vet. Sci., 52, 250-255

**Sandbichler, P., Hallbruckner, C. & Öfner, D.,** (1991):

Nucleolar organizer regions (AgNORs). A prognostically useful factor in rectal carcinoma.  
Tumordiagn. Ther., 12, 50-54

**Sandusky, G.E., Horton, P.J. & Wightman, K.A.,** (1986):

Use of monoclonal antibodies to human lymphocytes to identify lymphocyte subsets in lymph nodes of the rhesus monkey and the dog.  
J. Med. Primatol., 15, 441-451

**Sano, K., Takahashi, H. & Fujita, S.,** (1991):

Prognostic implication of silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral squamous cell carcinoma.  
J. Oral. Pathol. Med., 20, 53-56

**Sarli, G., Benazzi, C., Preziosi, R. & Marcato, P.S.,** (1994):

Proliferative activity assessed by anti-PCNA and Ki-67 monoclonal antibodies in canine testicular tumours.  
J. Comp. Pathol., 110, 357-368

**Sarli, G., Preziosi, R., Benazzi, C., Capitani, O. & Marcato, P.S.,** (1996):

Survival time and period before recurrence of mammary neoplasms in dogs and cats. Evaluation of proliferative activity and DNA ploidy.  
Obiettivi e Documenti Vet., 17, 57-66

**Scheer, U. & Benavente, R.,** (1990):

Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus.  
Bioessays, 12, 14-20

**Schneider, R.,** (1983):

Comparison of age- and sex-specific incidence rate patterns of the leukemia complex in the cat and in the dog.  
J. Natl. Cancer Inst., 70, 971-977

**Schuurman, H.J., Van Baarlen, J., Lam, B.W., Huppkes, W., Verdonck, L.F. & Van Unnik, J.A.M.,** (1987):

Immunophenotyping of Non-Hodgkin's lymphoma. Lack of correlation between immunophenotype and cell morphology.  
Am. J. Pathol., 129, 140-151

**Schwartz, S.N.,** (1988):

Spontaneous regression of lymphosarcoma in a dog.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 192, 222-224

**Seman, G., Proena, G., Guillon, J.C. & Moraillon, R.,** (1967):

Particules d'aspect viral dans les cellules du lymphosarcoma du chien.  
Bull. Acad. Vet. France, 4, 211-214

**Shi, S.R., Key, M.E. & Kalra, K.L.,** (1991):

Antigen Retrieval in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues: An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating of Tissue Sections.  
J. Histochem. Cytochem., 39, 741-747

**Shiraishi, T., Tabuchi, K. & Mineta, T.,** (1991):

Nucleolar organizer regions in various human brain tumours.  
J. Neurosurg., 74, 979-984

**Siedamgrotzky, O.,** (1871):

Lymphatische Leukämie beim Hund.  
Bericht Veterinärw. Sachsen, 16, 64-67

**Simha, M., Menon, M. & Doctor, V.,** (1996):

Prognostic value of argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNORs) in breast lesions.  
Ind. J. Cancer, 33, 76-85

**Simoes, J.P.C., Schoning, P. & Butine, M.,** (1994):

Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods.  
Vet. Pathol., 31, 637-647

**Simon, J., Small, E. & Jaeschke, W.,** (1964):

Hodgkin's disease in a dog.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 145, 231-233

**Singh, N.,** (1994):

Heat pre-treatment for antigen unmasking in immunocytochemistry.  
Sigma Immuno Chemicals (Hrsg.), Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7NH, England

**Sivridis, E. & Sims, B.,** (1990):

Nucleolar organizer regions: new prognostic variable in breast carcinomas.  
J. Clin. Pathol., 43, 390-392

**Skopelitou, A., Korkolopoulou, P., Papanicolau, A.,** (1992):

Comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and of nucleolar organizer region staining in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. Correlation with other conventional prognostic pathologic parameters.  
Eur. Urol., 22, 235-240

**Smith, R. & Crocker, J.,** (1988):

Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy.  
Histopathology, 12, 113-125

**Smith, P.J., Skilbeck, N., Harrison, A. & Crocker, J.,** (1988):

The effect of a series of fixatives in the AgNOR technique.  
J. Pathol., 155, 109-112

**Somerville, J. & Scheer, U.**, (1987):  
Elektron microscopy in molecular biology: a practical approach.  
In: Trendelenburg, M.F. & Puvion-Dutilleul, F. (Hrsg.): Visualizing active genes.  
Oxford, Washington, IRL Press, 101

**Soomro, I.N. & Whimster, W.F.**, (1990):  
Growth fraction in lung tumours determined by Ki-67 immunostaining and comparison with AgNOR scores.  
J. Pathol., 162, 217-222

**Spector, D.L., Ochs, R.L. & Busch, H.**, (1984):  
Silver staining, immunofluorescence and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23.  
Chromosoma, 90, 139-148

**Squire, R.A.**, (1969):  
Spontaneous hematopoietic tumours of dogs.  
Nat. Cancer Inst. Monogr., 32, 97-109

**Squire, R.A., Bush, M., Melby, E.C., Neely, L.M. & Yarbrough, B.**, (1973):  
Clinical and pathologic study of canine lymphoma: clinical staging, cell classification and therapy.  
J. Natl. Cancer Inst., 51, 565-571

**Sreelekha, T.T., Kusumakumary, P., Srinivas, G., Kumar, S.R., Pushpakumary, S., Nair, M.K. & Pillai, M.R.**, (1996):  
Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in pediatric acute lymphoblastic leukemia.  
Cancer Letters, 108, 87-91

**Stahl, S.**, (1982):  
The nucleolus and nucleolar chromosomes.  
London, Cambridge University Press, 1-21

**Stein, H., Lennert, K., Mason, D.Y., Gerdes, J., Ziegler, A., Naiem, M. & Wernet, P.**, (1981):  
Morphology and immunohistology of malignant lymphomas.  
In: Yohn, D.S. & Blakeslee, J.R.: Advances in Comparative Leukemia Research.  
Elsevier North Holland, New York, 479-485

**Stone, M.S., Goldstein, M.A. & Cotter, S.M.**, (1991):  
Comparison of two protocols for induction of remission in dogs with lymphoma.  
J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 27, 315-321

**Strandström, H.V., Higgins, J.R., Mossie, K. & Theilen, G.H.**, (1990):  
Studies with canine sera that contain antibodies which recognize human immunodeficiency virus structural proteins.  
Cancer Res., Suppl., 50, 5628s-5630s

**Suresh, U.R., Chawner, L. & Buckley, C.H.**, (1990):  
Do AgNOR counts reflect cellular ploidy or cellular proliferation? A study of trophoblastic tissue.  
J. Pathol., 160, 213-215

**Suto, T., Sugai, T., Nakamura, S., Funato, O., Nitta, H., Sasaki, R., Kanno, S. & Saito, K.**, (1998):  
Assessment of the expression of p53, MIB-1 (Ki-67 antigen), and argyrophilic nucleolar organizer regions in carcinoma of the extrahepatic bile duct.  
Cancer, 82, 86-95

**Swanson, J.F.**, (1990)  
Ocular manifestations of systemic diseases.  
Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract., 20, 849-67

**Tannapfel, A., Hahn, H.A., Katalinic, A., Fietkau, R.J., Kuhn, R. & Wittekind C.W.**, (1996):  
Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma.  
Cancer, 77, 164-171

**Teske, E.**, (1993):  
Canine malignant lymphoma: a review and some comparisons with human Non-Hodgkin's lymphoma.  
Proefschrift Universiteit Utrecht, 111-134

**Teske, E. & van Heerde, P.**, (1993):  
Diagnostic value and reproducibility of fine-needle aspiration cytology in canine Non-Hodgkin's lymphoma.  
Proefschrift Universiteit Utrecht, 37-46

**Teske, E., Rutteman, G.R., van Heerde, P. & Misdorp, W.**, (1990):  
Polyethylene glycol-L-asparaginase versus native L-asparaginase in canine Non-Hodgkin's lymphoma.  
Eur. J. Cancer, 26, 891-895

**Teske, E., Besselink, C.M.L.T., Blankenstein, M.A., Rutteman, G.R. & Misdorp, W.**, (1993a):  
The occurrence of estrogen and progesterin receptors and anti-estrogen binding sites (AEBS) in canine Non-Hodgkin's lymphomas.  
Proefschrift Universiteit Utrecht, 61-70

**Teske, E., de Vos, J.P., Egberink, H.F. & Vos, J.H.**, (1993b):  
Clustering in canine malignant lymphomas.  
Proefschrift Universiteit Utrecht, 101-110

**Teske, E., Rutteman, G.R., Kuipers-Dijkshoorn, N.J., van Dierendonck, J.H., van Heerde, P. & Cornelisse, C.J.**, (1993c):  
DNA Ploidy and cell kinetic characteristics in canine Non-Hodgkin's lymphoma.  
Proefschrift Universiteit Utrecht, 47-60

**Teske, E., van Heerde, P., Rutteman, G.R., Kurzman, I., Moore, P.F. & McEwen, E.G.**, (1993d):  
Prognostic factors in canine Non-Hodgkin's lymphoma: a prospective study in 138 dogs.  
Proefschrift Universiteit Utrecht, 83-100

**Teske, E., Wisman, P., Moore, P.F. & van Heerde, P.**, (1993e):  
Histological classification and immunophenotyping of canine Non-Hodgkin's lymphoma. An unexpected high frequency of T-cell lymphomas with B-cell morphology.  
Proefschrift Universiteit Utrecht, 19-36

**Theilen, G.H., Worley, M. & Benjamini, E.**, (1977):



Chemoimmunotherapy for canine lymphosarcomas.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 170, 607

**Thiry, M. & Goessens, G.**, (1992):  
Where, within the nucleolus, are the rRNA genes located?  
Exp. Cell Res., 200, 1-4

**Toikkanen, S. & Joensuu, H.**, (1993):  
AgNOR counts have no prognostic value in breast cancer.  
J. Pathol., 169, 251-254

**Tomley, F.M., Armstrong, S.J., Mahy, B.W.J. & Owen, L.N.**, (1983):  
Reverse transcriptase activity and particles of retroviral density in cultured canine lymphosarcoma supernatants.  
Br. J. Cancer, 47, 277-284

**Trere, D.**, (1993a):  
Critical analysis of the methods commonly employed in the assessment of the cell proliferation; advantages of the NOR silver-staining technique in routine cyto-histopathology.  
Anat. Cell Pathol., 5, 191-201

**Trere, D.**, (1993b):  
AgNOR quantification in tumour pathology: what is actually evaluated?  
J. Clin. Pathol., 46, 189

**Trere, D.**, (1994):  
Technical and methodological aspects of silver staining and measurement of nucleolar organizer region (NOR).  
Zentralbl. Pathol., 140, 11-14

**Trere, D., Pession, A. & Derenzini, M.**, (1988):  
The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of a cell duplication rate.  
Exp. Cell Res., 184, 131-137

**Trere, D., Farabegoli, F. & Cancellieri, A.**, (1991):  
AgNOR protein quantity in human tumours correlates with the proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labeling and Ki-67 immunostaining.  
J. Pathol., 164, 53-59

**Trere, D., Cancellieri, A. & Perrone, A.**, (1992):  
AgNOR protein distribution correlates with patient survival in stage I endometrial adenocarcinoma.  
Virchows Arch. A, 421, 203-207

**Trere, D., Melchiorri, C., Chieco, P., Marabini, A. & Derenzini, M.**, (1994):  
Interphase AgNOR quantity and DNA content in endometrial adenocarcinoma.  
Gyn. Oncol., 53, 202-207

**Vail, D.M., Ogilvie, G.K., Fettman, M.J. & Wheeler, S.L.**, (1990a):  
Exacerbation of hyperlactatemia by infusion of lactated Ringer's solution in dogs with lymphoma.  
J. Vet. Int. Med., 4, 228-232

**Vail, D.M., Ogilvie, G.K., Wheeler, S.L., Fettman, M.J., Johnston, S.D. & Hegstad, R.L.**, (1990b):  
Alterations in carbohydrate metabolism in canine lymphoma.  
J. Vet. Int. Med., 4, 8-11

**Valli, V.E., McSherry, B.J., Dunham, B.M., Jakobs, R.M. & Lumsden, J.H.**, (1981):  
Histology of lymphoid tumours in the dog, cat and cow.  
Vet. Pathol., 18, 494-512

**Van Heerde, P., Feltkamp, C.A., Feltkamp-Vroom, T.M., Koudstaal, J. & Van Unnik, J.A.M.**, (1982):  
Non-Hodgkin's lymphoma. Immunohistochemical and electron microscopical findings in relation to lightmicroscopy. A study of 74 cases.  
Cancer, 46, 2210-2220

**Van Pelt, R.W. & Connor, G.H.**, (1968):  
Clinico-pathologic survey of malignant lymphoma in the dog.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 152, 976-989

**Vechten, M. van, Helfand, S.C., Jeglum, K.A. & Van Vechten, M.**, (1990):  
Treatment of relapsed canine lymphoma with doxorubicin and dacarbazine.  
J. Vet. Int. Med., 4, 187-191

**Vicini, D.S., Ogilvie, G.K., Katzenellenbogen, J. & Carlson, K.**, (1991):  
Measurement of estrogen receptors in normal and neoplastic lymph node tissue from dogs.  
Am. J. Vet. Res., 52, 2055-2059

**Wachtler, F., Hopman, A.H.N. & Wiegant, J.**, (1986):  
On the position of nucleolar organizer regions (NORs) in interphase nuclei.  
Exp. Cell Res., 167, 227-240

**Wachtler, F., Schoeffer, C. & Mosgoeller, W.**, (1992):  
Human ribosomal RNA gene repeats are localized in the dense fibrillar component of nucleoli - light and electron microscopic in situ hybridisation in human Sertoli cells.  
Exp. Cell Res., 198, 135-143

**Weir, E.C., Greenlee, P., Matus, R.E., Brooks, M.B., Morris, C. & Isogna, K.L.**, (1988a):  
Hypercalcemia in canine lymphosarcoma is associated with the T-cell subtype and with secretion of a PTH-like factor.  
J. Bone Mineral. Res., 3, 106

**Weir, E.C., Norrdin, R.W., Matus, R.E., Brooks, M.B., Broadus, A.E., Mitnick, M., Johnston, S.D. & Isogna, K.L.**, (1988b):  
Humoral hypercalcemia of malignancy in canine lymphosarcoma.  
Endocrinology, 122, 602-607

**Weller, R.E. & Hoffman, W.E.**, (1992):  
Renal function in dogs with lymphosarcoma and associated hypercalcaemia.  
J. Small Anim. Prac., 33, 61

**Weller, R.E., Holmberg, C.A., Theilen, G.H. & Madewell, B.R.**, (1980a):  
Histologic classification as a prognostic criterion for canine lymphosarcomas.  
Am. J. Vet. Res., 41, 1310-1315

**Weller, R.E., Holmberg, C.A., Theilen, G.H. & Madewell, B.R.,** (1982a):

Canine lymphosarcoma and hypercalcaemia: clinical laboratory and pathologic evaluation of 24 cases.  
J. Small Anim. Prac., 23, 649

**Weller, R.E., Theilen, G.H. & Madewell, B.R.,** (1982b):

Chemotherapeutic responses in dogs with lymphosarcoma and hypercalcaemia.  
J. Am. Vet. Med. Assoc., 181, 891-894

**Weller, R.E., Theilen, G.H., Madewell, B.R., Crow, S.E., Benjamini, E. & Villalobos, A.,** (1980b):

Chemoinmunotherapy for canine lymphosarcomas: a prospective evaluation of specific and nonspecific immunomodulation.  
Am. J. Vet. Res., 41, 516

**Wells, G.A.H.,** (1974):

Hodgkin's disease-like lesions in the dog.  
J. Pathol., 112, 5

**Wilcock, B.P. & Yager, J.A.,** (1989):

The behaviour of epidermotropic lymphoma in 25 dogs.  
Can. Vet. J., 30, 754-756

**Wilkinson, N., Buckley, C.H., Chawner, L. & Fox, H.,** (1990):

Nucleolar organizer regions in normal, hyperplastic and neoplastic endometria.  
Int. J. Gynecol. Pathol., 9, 55-59

**Williams, J.H.,** (1988):

The use of gamma linolenic acid and natural vitamin E for the treatment of multicentric lymphoma in two dogs.  
J. S. African Vet. Assoc., 59, 141-144

**Winkler, C.F., Sausville, E.A., Ihde, D.C, Fischmann, A.B, Schechter, G.P., Kumar, P.P., Nibhandupi, J.R., Minna, J.D., Makuch, R.W.,** (1986):

Combined modality treatment of cutaneous T cell lymphoma: Results of a 6-year follow-up.  
J. Clin. Oncol. 4: 1094-1100

**Winokur, S.H.,** (1987):

Practical approaches to the management of aggressive lymphomas in the community practice.  
Sem. Hematol., 24, Suppl.1, 41-44

**Withrow, S.J. & McEwen, E.G.,** (1989):

Clinical veterinary oncology.  
In: McEwen, E.G. & Young, K.M.: Canine lymphoma and lymphoid leukemia.  
JB Lippincott Co., Philadelphia, 380

**Wozniak, Z.M., Usson, Y., Parazza, F., Champelovier, P., Leroux, D. & Seigneurin, D.,** (1996):

Quantitative analysis of three-dimensional distribution of AgNOR proteins during interphase in leukemic cells.  
Cytometry, 24, 14-26

**Xie, X., Clausen, O.P., Sudbu, J. & Boysen, M.,** (1997):

Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity.  
Cancer, 79, 2200-2208

**Yang, P., Huang, G.S. & Zhu, X.S.,** (1990):

Role of nucleolar organizer regions in differentiating malignant from benign tumours of the colon.  
J. Clin. Pathol., 43, 235-238

**Yekeler, H., Ozercan, M.R., Yumbul, A.Z., Ajgan, M. & Ozercan, I.H.,** (1993):

Nucleolar organizer regions in lymphomas: a quantitative study.  
Pathologica, 85, 353

**Yi, P.I., Coleman, M., Saltz, L., Norton, L., Topilow, A.A., Adler, K. & Berhardt, B.,** (1990):

Chemotherapy for large cell lymphoma: a status update.  
Sem. Oncol., 17, 60-71

**Yokoyama, Y., Serdar, D. & Niwa, K.,** (1990):

Nucleolar organizer regions in malignant transformation of uterine cervix.  
Gynecol. Oncol., 39, 309-313

**Yu, C.C., Fletcher, C.D. & Newmann, P.L.,** (1992):

A comparison of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organizer region (AgNOR) staining, and histological grading in gastrointestinal stromal tumours.  
J. Pathol., 166, 147-152

**Zaczek, M., Dabros, E., Maciejowski, J. & Szot, W.,** (1994):

Identification and assessment of nucleolar organizer regions (NORs) - technical problems.  
Patol. Pol., 45, 35-38

**Zaczek, M., Dabros, E., Szot, W. & Chlap, Z.,** (1997):

Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in tumors of colon.  
Polish J. Pathol., 47, 195-200

**Zaniboni, A., Di Lorenzo, D., Simoncini, E., Marpicati, P., Gorni, F., Marini, G. & Marinoni, G.,** (1986):

Estrogen and progesterone receptor guideline for tamoxifen therapy in Chronic Lymphocytic Leukemia: a pilot study.  
Acta. Haemat., 75, 92-95

**Zimmer, C., Gottschalk, J., Cervos-Navarro, J., Martin, H., Beil, M. & Jautzke, G.,** (1992):

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in atypical and malignant meningiomas.  
Pathol. Res. Pract., 188, 951-958

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 10. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACSA	Adenyl-Zyklase-stimulierende Aktivität
ADIC	Doxorubicin und Dacarbacin
AgNOR	argyrophile Nukleolus organisierende Regionen
AIDS	aquired immunodeficiency syndrome
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
AR_RAT	Verhältnis der AgNOR-Summenfläche (S_AREA) zur Zellkernfläche
ATP	Adenosintriphosphat
BORDER	Anzahl der randständigen AgNORs im Zellkern
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CENTER	Anzahl der zentral im Zellkern gelegenen AgNORs
CML	canines malignes Lymphom
COP	Cyclophosphamid-Zytoxan, Vincristin-Oncovin, Kortikosteroid-Prednisolon
COPA	COP und Doxorubicin (Adriamycin)
COP-BLAM	Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisolon, Bleomycin, Doxorubicin und Prokarbazin
d	Tage
DFC	dense fibrillar component
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	und andere
ExChr	extranucleolar chromatin
FC	fibrillar center
G	granular
HIV	human immunodeficiency virus
i. v.	intravenös
LOC K0 ... LOC K1000	Anzahl der AgNORs in einem der Ellipsensektoren
LOCAT	Position der AgNORs zwischen Schwerpunkt und Kernmembran
MACOP-B	Methotrexat, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon, Bleomycin
MAXDIST	maximales Distanzmaß zweier AgNORs im Zellkern
MAXNOR	Anschnittsfläche des größten AgNORs im Zellkern
M-BACOD	Methotrexat, Bleomycin, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Dexamethason
MDIST	Abstand der AgNORs zueinander
MEANAR	Anschnittsfläche der einzelnen AgNORs pro Zellkern
n	Anzahl
NCI	National Cancer Institute
NHL	non-Hodgkin's Lymphom (des Menschen)
NOR	Nukleolus organisierende Regionen

NORNBC	Anzahl der AgNORs pro Zellkern
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PEG	Polyäthylenglycol-konjugierte Asparaginase
ProMACE-MOPP	Prednisolon, Methotrexat, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Etoposid, Mechlorethamin, Vincristin, Procarbazin, Prednisolon
ProMACE-ZytaBOM	ProMACE und Zytarabin, Bleomycin, Vincristin, Methotrexat
PTHrP	Parathormon-ähnliche Peptide
RNA	Ribonukleinsäure
S_AREA	Summe der Anschnittfläche aller AgNORs pro Zellkern
SIZRAT	Verhältnis der AgNOR-Fläche (MEANAR) zur Zellkernfläche
VP-16	Etoposid
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
zit.	zitiert

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)

## 11. Danksagungen

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. V. Bergmann, danke ich für seine Anleitung und jederzeit gewährte Unterstützung.  
 Meinem Mentor und Freund, Herrn D. Bostock, danke ich für die Überlassung des Themas der Dissertation und seine beratende Hilfe.  
 Meinem Freund, Herrn Dr. E. Teske, danke ich für die zusätzliche Überlassung von Material und seine große Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Weiterhin bedanke ich mich bei

Meinem Freund, Dr. J. Crocker und besonders Frau Dr. J. Oates aus dem Birmingham Heartlands Hospital für ihre Hilfe in der Immunhistologie.  
 Herrn F. Mills aus der Universität Utrecht für seine Unterstützung bei der Anwendung von Ki-67.

Meinem Freund, Herrn Dr. P. Hufnagel aus der Charité Berlin für die Zur-Verfügung-Stellung der Mikroskopbildanalysetechnik und für seinen Rat in statistischen und fachlichen Fragen.

Herrn Dr. R. Hirschmann für seine Hilfe bei der Bildverarbeitung und beim Layout.

Meiner Frau für ihre unermüdliche Unterstützung.

Allen Freunden und Verwandten, die direkt oder indirekt zu dieser Arbeit beigetragen haben.

## 12. Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Matti Kiupel, die vorliegende Dissertation selbständig nur mit den in dieser Arbeit aufgeführten Hilfsmitteln und Hilfen verfaßt zu haben. Diese Arbeit wurde noch in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt.

Unterschrift: Matti Kiupel

Berlin, den 01. 09. 1998

## 13. Lebenslauf

06.10.1968 geboren in Stralsund (Mecklenburg-Vorpommern) als Sohn des Tierarztes Dr. Hartmut Kiupel und der Bibliothekarin Bärbel Kiupel, geb. Feddern

1975 – 1977 Besuch der Grundschule in Rostock-Evershagen

1977 – 1987 Besuch der Spezialschule "J. G. Herder" in Rostock

Juni 1987 Abitur

Herbst 1987 Arbeit in der Landwirtschaft

Nov. 1987 – Jan. 1990 Wehrdienst

Jan. 1990 – Okt. 1990 Sektionsassistent in der Veterinärpathologie in Rostock

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Standort Mitte

- Okt. 1990 – Mai 1996 Studium der Veterinärmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin, später FU Berlin
- Okt. 1991 – Aug. 1996 Studium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin
- Juli 1992 Bestehen der tierärztlichen Vorprüfung
- Jul. 1992 – Jul. 1996 Stipendium der Begabtenförderung der Friedrich-Ebert-Stiftung
- Juli 1993 Vordiplom der Biologie
- Aug. 1993 Praktikum im Hwange National Park, Simbabwe
- Sep. 1993 – Aug. 1994 Studium in Cambridge, Stipendium der "British Chamber of Commerce"
- Sep. 1994 Praktikum in Sea World of Texas, San Antonio, USA
- Jun. 1995 – Aug. 1995 Praktikum im Animal Health Trust, Newmarket, England
- Sep. 1995 – Dez. 1995 Wildtierpathologie-Praktikum in Utrecht, Niederlande
- 11.05.1996 Bestehen der tierärztlichen Prüfung
- 11.05.1996 Approbation als Tierarzt
- seit 13.08.1996 postgraduales Studium an der Purdue University, Indiana, USA,  
- Assistentenstelle bis Juli 2001

[Zurück zum Inhaltsverzeichnis](#)