

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

PROGNOSTISCHE RELEVANZ VON LYMPHOZYTÄREN INFILTRATEN
UND DEREN DIFFERENZIERUNG
IN CANINEN TUMOREN DER MAMMA

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Ute Gilles, geb. Schulden

Tierärztin aus Stolberg

Berlin 2000

Journal-Nr. 2415

Gefördert durch ein Forschungsstipendium der Akademie für Tiergesundheit e.V. und ein Promotionsabschlußstipendium gemäß dem Nachwuchsförderungsgesetz des Landes Berlin

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Prodekan: Univ.-Prof. Dr. G. Hildebrandt

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Rudolph

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Plendl

Tag der Promotion: 17.07.2000

*Meinem Vater gewidmet, der den Abschluß der Arbeit
nicht mehr miterleben durfte.*

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	8
2. Literaturübersicht	9
2.1. Aufbau der Mamma des Hundes	9
2.1.1 Anatomie	9
2.1.2. Histologie	9
2.2. Tumoren des Mammagewebes beim Hund	10
2.2.1. Ätiologie	10
2.2.2. Prognose und Verlauf	11
2.2.3. Onkologische Komparatistik	13
2.2.3.1. Einleitung	13
2.2.3.2. Bedeutung lymphozytärer Infiltrate für den Brustkrebs der Frau	14
2.2.3.3. Bedeutung lymphozytärer Infiltrate für Gesäugetumoren der Hündin	17
2.2.4. Klassifikation	18
2.2.4.1. Beurteilung der Malignität durch Wertungspunkte	19
2.2.5. Gradeinteilung nach GILBERTSON et al. (1983)	20
2.2.6. Gruppeneinteilung nach COCKERELL und SLAUSON (1979)	21
2.3. Mechanismen der Immunantwort	21
2.3.1. Allgemeines	21
2.3.1.1. T-Lymphozyten (T-Zellen)	22
2.3.1.2. B-Lymphozyten (B-Zellen)	23
2.3.1.3. T-Zell-Rezeptor-Komplex	23
2.3.1.4. B-Zell-Rezeptor-Komplex	24
2.3.1.5. Antigene und Antikörper	24
2.3.1.5.1. Einleitung	24
2.3.1.5.2. CD3 (T3)-Antigen	25
2.3.1.5.3. CD79a-Antigen	26
2.4. Immunfärbung	28
2.4.1. Methoden der Immunfärbung	28
2.4.1.1. Einleitung	28
2.4.1.2. Die Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) -Methode	28
2.4.1.3. Das Biotin-Streptavidin Amplifikations (B-SA)-Nachweissystem	29
2.4.1.4. Fixierung und Antigenmaskierung	30
2.4.1.5. Antigendemaskierung durch Vorbehandlung	31
2.4.1.6. Kreuzreaktivität	32
3. Eigene Untersuchungen	32
3.1. Material und Methoden	32
3.1.1. Material	32
3.1.2. Methoden	33
3.1.2.1. Rasse-, Alters- und Geschlechtsverteilung	33
3.1.2.2. Größe des Tumors	34
3.1.2.3. Klassifikation	34
3.1.2.4. Gewebeaufbereitung	35
3.1.2.4.1. Herstellung der Gefrierschnitte	35
3.1.2.4.2. Herstellung der Paraffinschnitte	35
3.1.2.5. Nachweismethoden	36
3.1.2.5.1. Routinefärbung	36
3.1.2.5.2. Immunhistochemie	36
3.1.2.5.2.1. Einleitung	36
3.1.2.5.2.2. Seren, Antiseren, Reagenzien, Geräte und Materialien	36

3.1.2.5.2.3. Rezepturen für die immunhistochemischen Färbungen	39
3.1.2.5.2.4. Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) -Methode	41
3.1.2.5.2.5. Biotin-Streptavidin Amplifikations (B-SA)-Nachweissystem	43
3.1.2.5.2.6. Antikörper	44
3.1.2.5.2.7. Kontrollen	46
3.1.2.5.2.8. Doppelmarkierung	46
3.1.2.6. Follow-Up-Schema	46
3.1.2.7. Erarbeitung des Auswertungsschemas	47
3.1.2.7.1. Stufe 1: HE-Routine-Färbung	47
3.1.2.7.2. Stufe 2: Immunhistochemie	48
3.2. Ergebnisse	49
3.2.1. Materialmenge	49
3.2.2. Rasse-, Alters- und Geschlechtsverteilung	49
3.2.2.1. Rassenverteilung	49
3.2.2.2. Altersverteilung	50
3.2.2.3. Geschlechtsverteilung	51
3.2.3. Betroffene Gesäugeleiste	51
3.2.4. Gruppeneinteilung der Tumoren nach ihrer Größe	52
3.2.5. HE-Diagnostik	52
3.2.5.1. Malignes Wachstum	52
3.2.5.2. Lymphknotenbeteiligung	54
3.2.5.3. Gefäßeinbrüche	55
3.2.5.4. Primäre Multiplizität	55
3.2.5.5. Grad- und Gruppeneinteilung der lymphozytären Infiltrate	55
3.2.5.5.1. Gradeinteilung	55
3.2.5.5.2. Gruppeneinteilung	56
3.2.5.5.3. Auswertungsschema der kombinierten Grad- und Gruppeneinteilung nach der HE-Routinefärbung	58
3.2.5.5.4. Bildteil	59
3.2.5.5.5. Aufteilung der Grade innerhalb der Gruppen	61
3.2.5.5.6. Einordnung des Einzeltieres in die Gruppen unter Berücksichtigung der Grade	61
3.2.5.6. Einteilung in die Hauptdiagnosegruppen	62
3.2.5.7. Verteilung der Hauptdiagnosen	63
3.2.5.8. Verteilung der Punkte	66
3.2.6. Zusammenhang zwischen Hauptdiagnose und weiteren Parametern	67
3.2.6.1. Diagnose und Rasse	67
3.2.6.2. Diagnose und Alter	68
3.2.6.3. Diagnose und Geschlecht	68
3.2.6.4. Diagnose und betroffene Gesäugeleiste	69
3.2.6.5. Diagnose und Probengröße	70
3.2.6.6. Diagnose und lymphozytäre Infiltrate (HE)	70
3.2.6.6.1. Hauptdiagnosegruppe und Gradeinteilung	70
3.2.6.6.2. Hauptdiagnosegruppe und Gruppeneinteilung	71
3.2.6.6.3. Auswertung der Stufe 1	72
3.2.6.7. Diagnose und Punkte	74
3.2.7. Verlauf	75
3.2.7.1. Dignitätsschwankungen	77
3.2.7.2. Überlebensrate in Monaten	79
3.2.7.3. Follow-Up-Status	80
3.2.7.3.1. Zusammenhang zwischen Follow-Up-Status und weiteren Parametern	81
3.2.7.3.1.1. Follow-Up-Status und Rasse	81
3.2.7.3.1.2. Follow-Up-Status und Alter	82
3.2.7.3.1.3. Follow-Up-Status und Geschlecht	82
3.2.7.3.1.4. Follow-Up-Status und betroffene Gesäugeleiste	83
3.2.7.3.1.5. Follow-Up-Status und makroskopische Probengröße	83
3.2.7.3.1.6. Follow-Up-Status und lymphozytäre Infiltrate (HE)	84
3.2.7.3.1.6.1. Follow-Up-Status und Gradeinteilung	84
3.2.7.3.1.6.2. Follow-Up-Status und Gruppeneinteilung	85
3.2.7.3.1.6.3. Zusammenhang zwischen Follow-Up-Status und kombinierter Grad- und Gruppeneinteilung	86
3.2.7.3.1.7. Follow-Up-Status und Punkte	88
3.2.7.3.1.8. Follow-Up-Status und Hauptdiagnose	88
3.2.8. Ergebnisse der Immunhistochemie-Vorversuche	89
3.2.8.1. T-Lymphozyten-Subpopulation	89
3.2.8.2. B-Lymphozyten-Subpopulation	89

3.2.8.3. Helfer-/Suppressorzellen (CD4/CD8)	90
3.2.8.4. Doppelmarkierung	91
3.2.8.5. Bildteil	92
3.2.9. Ergebnisse der Immunhistochemie-Hauptversuche	93
3.2.9.1. Auswertung der Stufe 2	93
3.2.9.2. Bildteil	95
3.2.9.3. Zusammenhang zwischen T/B-Zell-Identifikation und weiteren Parametern	98
3.2.9.3.1. T/B-Zell-Identifikation und Rasse	98
3.2.9.3.2. T/B-Zell-Identifikation und Alter	98
3.2.9.3.3. T/B-Zell-Identifikation und Geschlecht	99
3.2.9.3.4. T/B-Zell-Identifikation und betroffene Gesäugeleiste	100
3.2.9.3.5. T/B-Zell-Identifikation und makroskopische Probengröße	101
3.2.9.3.6. T/B-Zell-Identifikation und Punkte	101
3.2.9.3.7. T/B-Zell-Identifikation und Hauptdiagnose	102
3.2.9.3.8. T/B-Zell-Identifikation und Gradeinteilung	103
3.2.9.3.9. T/B-Zell-Identifikation und Gruppeneinteilung	104
3.2.9.3.10. Zusammenhang zwischen T/B-Zell-Identifikation und kombinierter Grad- und Gruppeneinteilung	105
3.2.9.3.11. T/B-Zell-Identifikation und Überlebensrate in Monaten	106
3.2.9.3.12. T/B-Zell-Identifikation und Follow-Up-Status	107
4. Diskussion	109
4.1. Rasse-, Alters- und Geschlechtsverteilung	109
4.2. Makroskopische Erhebungen	110
4.3. Befunde der HE-Diagnostik	110
4.4. Zusammenhänge zwischen den anamnestisch, makroskopisch und histopathologisch erhobenen Daten	112
4.5. Daten des Verlaufs	116
4.6. Zusammenhänge zwischen den anamnestisch, makroskopisch und histopathologisch erhobenen Daten und den Daten des Verlaufs	118
4.7. Vorversuche der Immunhistochemie	121
4.8. Zusammenhänge zwischen den anamnestisch, makroskopisch, histopathologisch und im Verlauf erhobenen Daten und den Ergebnissen der Immunhistochemie	123
4.9. Schlußfolgerungen	125
5. Zusammenfassung	128
6. Summary	131
7. Literaturverzeichnis	135
8. Anhang	152
8.1. Nationale der Hunde, Hauptdiagnose 1. Op, Prognose	152
8.2. Histologische Einzelfallbeschreibung der Mammaveränderungen	155

8.3. Einzelbefunde der Makroskopie sowie der HE- und Immunfärbungen der Tumoren	160
mit der jeweils höchsten Malignitätstufe der 1. E-Nr.	
8.4. Abkürzungsverzeichnis	164

Auszüge aus dieser Doktorarbeit wurden mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Univ.-Professor Dr. R. Berg, Vorsitzender der Promotionskommission im Fachbereich für Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, vorab veröffentlicht:

SCHULDEN, U.; K. GUTBERLET UND R. RUDOLPH (1997):

Differenzierung von Immunzell-Subpopulationen in caninen Mammatumoren. Vortrag, 40. Tagung der Fachgruppe „Pathologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Berlin, 19.05.-20.05.1997.

Zusammenfassung: Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 110, 295

SCHULDEN U.; J.H. WALTER; K. GUTBERLET UND R. RUDOLPH (1998a):

Beitrag zur immunhistochemischen Darstellung caniner T- und B-Lymphozyten am Paraffinschnitt. Vortrag, 41. Tagung der Fachgruppe „Pathologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Kassel, 02.06.-03.06.1998.

Zusammenfassung: Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 111, 402

SCHULDEN, U.; J.H. WALTER; K. GUTBERLET AND R. RUDOLPH (1998b):

Immunohistochemical identification of B lymphocytes in canine lymphnodes embedded in paraffin wax by using an antibody to CD79a antigen.

Europ. J. of Vet. Pathol., Vol. 4, No. 2, 81-83

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Professor Dr. R. Rudolph für die Überlassung des Themas, sowie für die jederzeit gewährte Unterstützung und Beratung bei der Abfassung der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. K. Gutberlet und Herrn PD Dr. J.H. Walter für die oft nützlichen und klärenden Gespräche.

Danke den ehemaligen Mitdoktoranden des Institutes für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin, insbesondere Frau Dr. Andrea Golombiewski und Herrn Dr. Ulrich Arnicke, die mir jederzeit mit Rat und Tat, aber auch mit konstruktiver Kritik zur Seite standen. Im Besonderen möchte ich mich bei Frau Dr. Andrea Golombiewski für das freundschaftliche und angenehme Arbeitsklima bei der gemeinsamen Bearbeitung des Probenmaterials herzlich bedanken.

Ebenfalls danke ich Herrn Robert Stark für die Lösung der letzten computertechnischen Probleme.

Frau Petra Nehrig gilt mein Dank für die immer gewährte Hilfe bei allen organisatorischen Problemen.

Darüberhinaus danke ich meinen Eltern und Geschwistern, die mich jederzeit ermutigt und unterstützt haben.

Meine besondere Dankbarkeit gilt meinem Ehemann und Berufskollegen Herrn Markus Gilles, der mich während des Studiums und der Promotion geduldig ertragen und durch sein freundschaftliches und fachliches Interesse zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Diese Arbeit wurde dankenswerterweise gefördert durch ein Forschungsstipendium der Akademie für Tiergesundheit e.V. (AfT) sowie durch ein Promotionsabschlußstipendium nach dem Nachwuchsförderungsgesetz (NaFöG).

Lebenslauf

Name:	Ute Gilles, geb. Schulden
Geburtsdatum:	09.09.1964
Geburtsort:	Stolberg/Rhld.
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind
Eltern:	Peter Schulden Anna-Margarete Schulden, geb. Lersch
1970 - 1974	Katholische Grundschule Kreuzau
1974 - 1983	Burgau-Gymnasium Düren
18.06.1983	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
01.08.1983-31.07.1985	Ausbildung zur Tierarzhelferin und Arzhelferin
01.08.1985-31.07.1986	Berufstätigkeit als Tierarzhelferin
Oktober 1988	Beginn des Studiums der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
26.01.1995	Abschluß der Tierärztlichen Prüfung
03.02.1995	Approbation als Tierärztin
seit März 1995	Doktorandin am Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin
22.03.1995	Zulassung zum Promotionsverfahren
Okt. 1995-Feb. 1996:	Lehrbeauftragte am Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin zur Durchführung der Lehrveranstaltung: „Pathologisch-histologischer Kurs“
01.07.1996-30.06.1997	Forschungsstipendiatin der Akademie für Tiergesundheit e.V. (AfT)
20.05.1997	wissenschaftlicher Vortrag auf der 40. Tagung der Fachgruppe „Pathologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft in Berlin
03.06.1998	wissenschaftlicher Vortrag auf der 41. Tagung der Fachgruppe „Pathologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft in Kassel
01.04.1998-31.03.1999	Promotionsstipendiatin nach dem Nachwuchsförderungsgesetz

Ute Gilles
Monumentenstr. 23
10965 Berlin

Tel.: 030 / 78 99 26 41

Berlin, 1.12.1999

Betr.: Selbständigkeitsversicherung nach § 8, Abs. 3 der Promotionsordnung

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit versichere ich, alle Hilfsmittel und Hilfen angegeben und auf dieser Grundlage die Arbeit selbständig verfaßt zu haben.

Die Arbeit ist noch nie in einem früheren Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt worden.

Mit freundlichen Grüßen

(Ute Gilles)