

Abb. 17: Defekte Desmosomen, die zwei atypische Keratinozyten miteinander verbinden. Durch fehlende interzelluläre Zytokeratinverbindungen im Bereich der Desmosomen dense lines (**D**) erscheint der interzelluläre Zusammenhalt aufgelockert.
TEM-Präparat, (Vergrößerung: 27.590)

3.3.4 Bestimmung des Zytokeratinprofils

Zur weiteren Charakterisierung der Tumorzellen sollte deren Zytokeratingehalt immunhistochemisch bestimmt werden. Darüber hinaus wurde untersucht, ob mit Hilfe der Zytokeratinprofilbestimmung Hinweise auf die Histogenese dieser Geschwulst ableitbar sowie Rückschlüsse auf den histologischen Reifegrad der Geschwulstzellen möglich sind.

Insgesamt wurden neun verschiedene Zytokeratinmarker an der neoplastisch veränderten Hühnerhaut untersucht. Hierbei lieferten die Zytokeratinmarker **AE1** (CK10, CK14, CK16, CK19), **AE3** (CK1, CK5, CK8), **LP34** (CK6, CK18) und **LL002** (CK14) die besten Ergebnisse.

Der Zytokeratinmarker **KL1** (CK10/11) zeigte in der tumorös veränderten Hühnerhaut nur unspezifische Farbreaktionen. In der Hundehaut, die als Positivkontrolle diente, reagierte er sowohl in der Epidermis als auch in den Haarfollikeln suprabasal deutlich positiv.

Die Zytokeratinmarker **CAM5.2** (CK8/18), **Ks7.18** (CK7), **E3** (CK17) und **Ks19.1** (CK19), lieferten in den Vorversuchen weder in der Hühner- noch in der Hundehaut positive Färbeargebnisse. Daher wurden mit diesen Markern keine Hauptversuche durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle XV zusammenfassend dargestellt.

Die Negativkontrollen der Färbungen mit den Zytokeratinmarkern AE1, AE3, LP34, LL002, KL1, CAM5.2, Ks7.18, E3 und Ks19.1 zeigten keinerlei spezifische oder unspezifische Färbungen.

Tabelle XV: Zytokeratinverteilung in der Haut von Jungmasthühnern und Hunden

AK	AE1	AE3	LP34	LL002	KL1	CAM5.2	Ks7.18	E3	Ks19.1
CK	10, 14, 16, 19	1, 5, 8	6, 18	14	10 / 11	8 / 18	7	17	19
Huhn									
<i>gesunde befiederte Epidermis</i>									
basal	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
suprabasal	+	+++	-	-	-	-	-	-	-
Stratum corneum	-	++	-	+++	-	-	-	-	-
<i>hyperplastische Epidermis</i>									
basal	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
suprabasal	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-
Stratum corneum	-	++	-	+++	-	-	-	-	-
<i>hyperplastischer Federfollikel</i>									
basal	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
suprabasal	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-
Stratum corneum	-	++	-	+++	-	-	-	-	-
<i>Geschwulstzellen</i>									
weniger differenziert	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
höher differenziert	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-
verhornt	-	++	-	+++					
Hund									
<i>Epidermis</i>									
basal	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
suprabasal	+++	+++	+++	+	++	-	-	-	-
<i>Haarfollikel</i>									
basal	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
suprabasal	+++	+++	+++	+	++	-	-	-	-

In der Auswertung zeigten sowohl die **weniger differenzierten** als auch die **höher differenzierten Geschwulstzellen** eine positive Reaktion mit **AE1**. Dieser Zytokeratinmarker weist die Zytokeratine CK10, CK14, CK16 und CK19 nach. Während das Zytoplasma der genannten Zellen eine kräftige Rosafärbung aufwies, fiel die Farbreaktion in Tumorzellen mit ersten Anzeichen von Keratinisierung deutlich schwächer aus.

Die Zellen des Stratum basale der Epidermis sowie die Basalzellschicht der Federfollikel reagierten ebenfalls deutlich positiv mit AE1 (Abb.18). Die Zellen des Stratum intermedium und des Stratum transitivum, die in den weiteren Ausführungen zur *suprabasalen* Schicht zusammengefaßt werden, wiesen hingegen eine deutlich geringere Farbintensität auf.

In der Hundehaut (Positivkontrolle) reagierten ausschließlich die suprabasalen Epithelzellen der Epidermis und der Haarfollikel AE1-positiv.

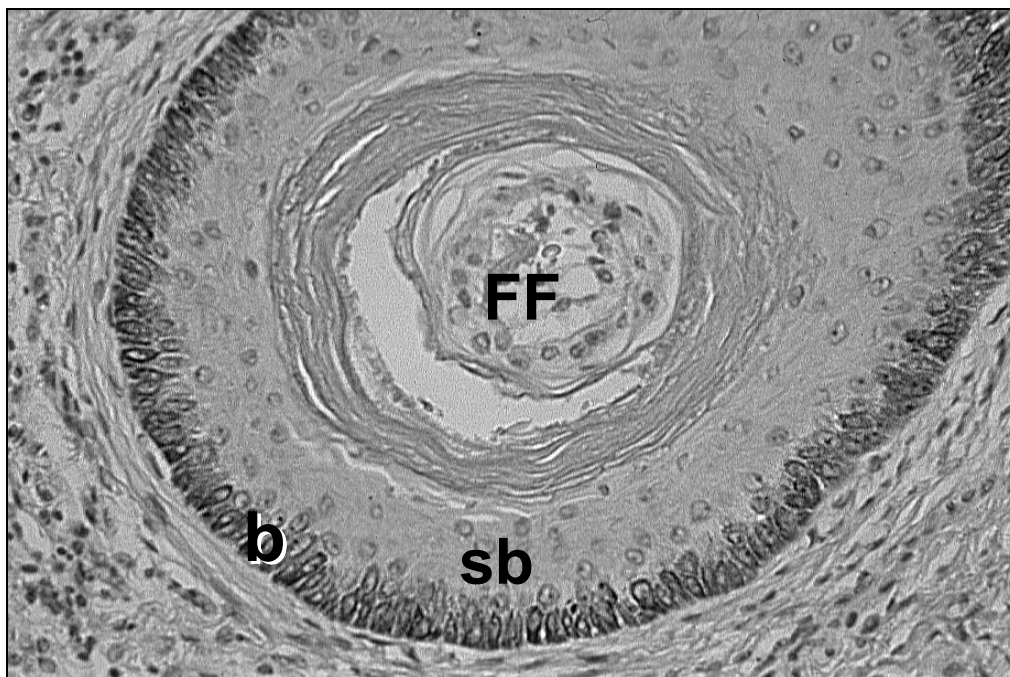


Abb. 18: Zytokeratindarstellung.

In den basalen (**b**) Zellen des Federfollikel­epithels sind die Zytokeratine CK10, CK14, CK16 und CK19 mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers AE1 nachweisbar.

FF= Federfollikel, **sb**= suprabasale Zellen des Federfollikel­epithels nicht ange­färbt
B-SA-Färbung, (Okular 10x, Objektiv 40x)

Das Epithel der Epidermis und der Federfollikel reagierte sowohl basal als auch suprabasal deutlich positiv mit dem Zytokeratinmarker **AE3** (CK1, CK5, CK8). **Sämtliche Geschwulstzellen** zeigten ebenfalls eine deutliche Rosafärbung.

Die kräftigste Farbreaktion wiesen jedoch die zellkernlosen, abgeflachten Epithelzellen mittlerer Verhornung auf, unabhängig davon, ob sie von der Epidermis, dem Federfollikel­epithel oder von den höher differenzierten Geschwulstzellen gebildet wurden.

Beim Hund reagierten das Epithel der Epidermis und der Haarfollikel sowohl basal als auch suprabasal AE3-positiv.

In der neoplastisch veränderten Hühnerhaut reagierten sowohl die suprabasalen Zellen der hyperplastischen Epidermis als auch der hyperplastischen Federfollikel deutlich positiv mit **LP34** (CK6 und CK18). Sie wiesen eine kräftige Rosafärbung auf. Auch die **höher differenzierten Geschwulstzellen** reagierten deutlich positiv mit LP34 (Abb.19). Die Zellen der gesunden Epidermis hingegen zeigten keine Reaktion mit diesem Marker.

Sowohl das basale als auch das suprabasale Epithel der Epidermis und der Haarfollikel des Hundes reagierten LP34-positiv.

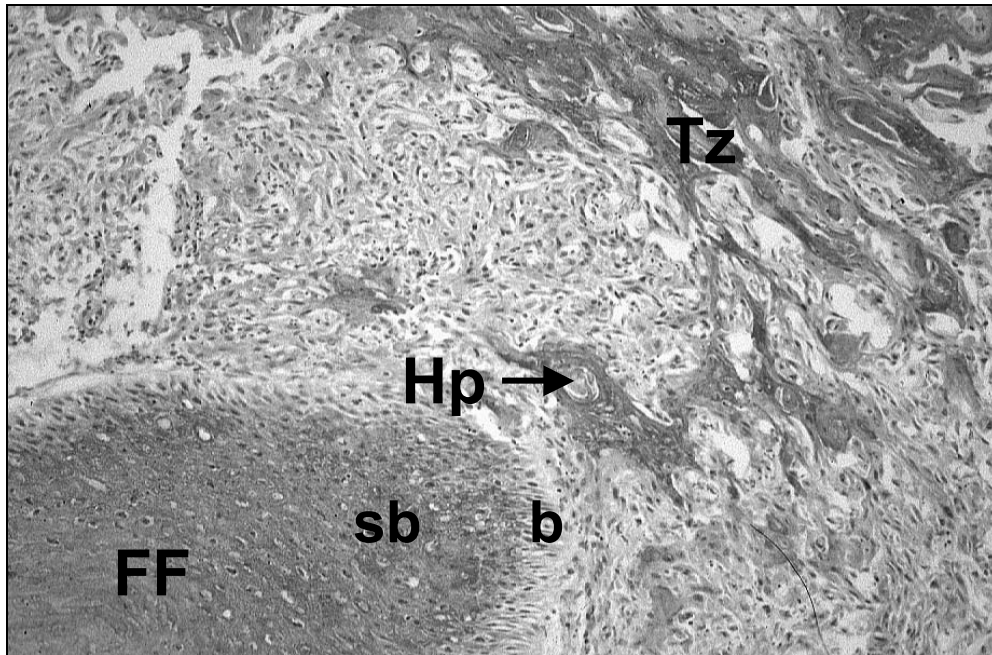


Abb. 19: Zytokeratindarstellung.

Sowohl in den suprabasalen (**sb**) Zellen des Federfollikel­epithels als auch in den infiltrativ wachsenden Tumorzellen (**Tz**) sind die Zytokeratine CK6 und CK18 mit Hilfe des Zytokeratinmarkers LP34 nachweisbar.

FF= Federfollikel, **b**= basale Zellen des Federfollikel­epithels nicht angefärbt, **Hp**= Hornperle,

B-SA-Färbung, (Okular 10x, Objektiv 20x)

In der neoplastisch erkrankten Haut der Jungmasthühner konnte sowohl im Stratum corneum der Epidermis als auch der Federfollikel unter Verwendung des Zytokeratinmarkers **LL002** das Zytokeratin CK14 nachgewiesen werden (Abb.20). Auch die **verhornten Geschwulstzellen** reagierten deutlich positiv mit LL002 und zeigten eine kräftige Rosafärbung.

Die Haut des Hundes reagierte in den suprabasalen Epithelien der Epidermis und Haarfollikel nur mäßig positiv auf LL002. Die basalen Regionen zeigten eine deutliche Farb­reaktion.

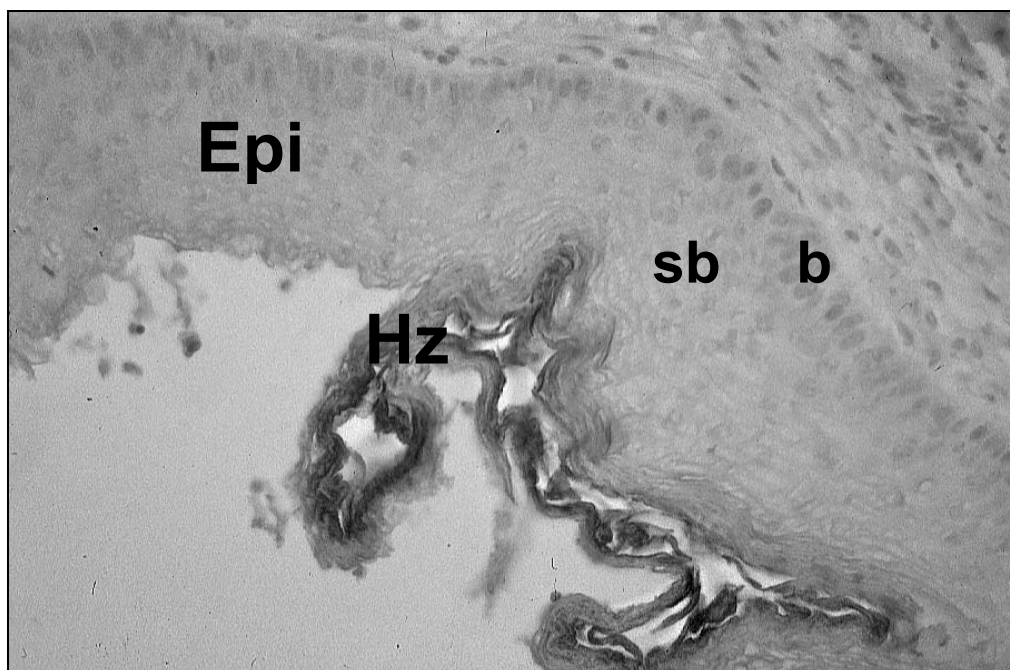


Abb. 20: Zytokeratindarstellung.

In den abgeschilferten Hornzellen (**H_z**) der hyperplastischen Epidermis (**E_{pi}**) ist das Zytokeratin CK14 mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers LL002 darstellbar.

b= basale und **sb**= suprabasale Zellen der hyperplastischen Epidermis nicht angefärbt

B-SA-Färbung, (Okular 10x, Objektiv 40x)

Zusammenfassend läßt sich sagen:

Von neun untersuchten Zytokeratinmarkern reagierten in der neoplastisch veränderten Hühnerhaut vier Marker positiv. Während die Zytokeratinmarker AE1, AE3 und LL002 sowohl in den Zellen des hyperplastischen Federfollikelepithels als auch in der gesunden Epidermis positiv reagierten, zeigte LP34 in der gesunden Epidermis keine Reaktion. Die Zellen des Tumorgewebes hingegen reagierten ebenso wie die Zellen des hyperplastischen Federfollikelepithels sowohl mit den Zytokeratinmarkern AE1, AE3 und LL002 als auch mit LP34 deutlich positiv. Dies ist als Hinweis dafür anzusehen, daß die untersuchte Geschwulst ihren Ausgang im hyperplastischen Federfollikelepithel nimmt.

3.3.5 Untersuchungen zur Mitoserate und Proliferationsaktivität der Neoplasie

Im Rahmen der histopathologischen Untersuchungen wurden nur gelegentlich Mitosen nachgewiesen. Dies deutet auf eine geringe Wachstumsgeschwindigkeit dieser Neoplasie hin. Um diese Aussage zu überprüfen, sollte zunächst anhand der Auszählung mitotischer Figuren die **Mitoserate** Hautkarzinomatose ermittelt werden.

Diese betrug im tumorösen Gewebe durchschnittlich **3,2**, wobei zwischen 1 und 10 mitotische Figuren pro Gesichtsfeld bei 400- facher Vergrößerung gezählt wurden.

Hierbei ist zu berücksichtigen, daß sich die Anzahl mitotisch aktiver Tumorzellen (Abb.21) in den verschiedenen Manifestationsformen der Hautkarzinomatose unterscheidet. In den verdickten Federfollikeln und Knotenformen wurden im Durchschnitt etwa 4 Mitosen pro Gesichtsfeld erfaßt. In den Kraterformen waren pro Gesichtsfeld etwa 3 mitotisch aktive

Zellkerne nachweisbar. In den Straßenformen fanden sich nur vereinzelt Tumorzellen mit Mitoseaktivität.

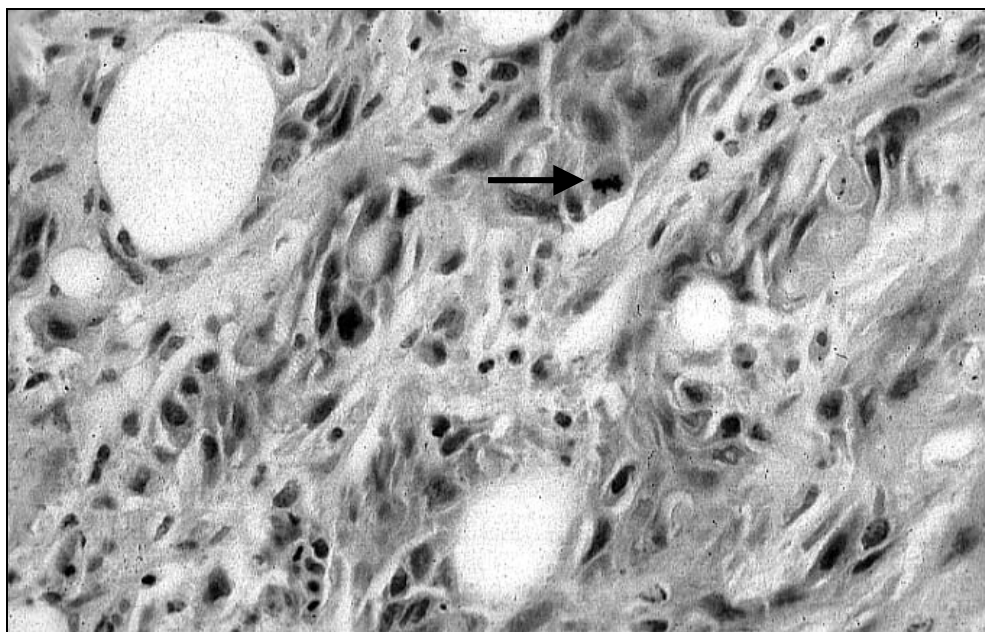


Abb. 21: Polygonale, wenig differenzierte Tumorzellen zeigen mitotische Aktivität (→).
HE-Färbung, (Okular 10x, Objektiv 40x)

In einer weiteren Untersuchung sollte die **Proliferationsaktivität** dieser Geschwulst näher untersucht werden. Hierfür wurden die Proliferationsmarker PC-10 und MIB-1 verwendet. Da diese im Vorversuch an Paraffinschnitten nur unbefriedigende Ergebnisse lieferten, wurden die Hauptversuche ausschließlich an Kryostatschnitten durchgeführt.

In der Auswertung zeigte sich, daß PC-10 (Dako) einen geeigneten Marker für **PCNA-positive** Zellen in der Hühnerhaut darstellt. Um ausschließlich die Zellen in der S- Phase zu erfassen, wurden nur die stark dunkelbraunen, granulierten Zellen ausgezählt. Der Anteil der PCNA- positiven Geschwulstzellen betrug zwischen **15 und 45 Prozent**. Hierbei handelte es sich um **weniger und höher differenzierte Tumorzellen**. Die verhornten Geschwulstzellen hingegen wiesen keine positive PCNA- Reaktion auf. Ähnlich verhielt es sich mit den Epithelzellen der hyperplastischen Epidermis. Während die Zellkerne der wenig differenzierten Basalzellen PCNA-positiv reagierten, fanden in den Schichten des Stratum intermedium und corneum keine Farbreaktionen statt. Auch die nukleären Strukturen der Fibroblasten, die das jungen Bindegewebe bildeten, reagierten PCNA-positiv. Die Fibrozyten hingegen zeigten keine Reaktion mit PC-10.

Die Negativkontrollen und einige Hautschnitte wiesen schwache Hintergrundreaktionen auf. Diese hatten jedoch keinen Einfluß auf die Auswertung der Untersuchung.

Der Antikörper **MIB- 1** (Dianova) erwies sich als geeigneter Marker für Ki-67- positive Zellen in der Hühnerhaut. Im Gegensatz zu PCNA war der Kontrast zwischen Ki-67- positiven und Ki-67-negativen Zellen deutlicher, so daß keine Hilfsmittel zur Auszählung benötigt wurden. Der Anteil der Ki-67-positiven Zellen betrug zwischen **20 und 60 Prozent**. Hierbei reagierten die **weniger und höher differenzierten Geschwulstzellen**, die basalen Zellen der hyperplastischen Epidermis und Federfollikel sowie die Fibroblasten des jungen Bindegewebes Ki-67-positiv. Eine Differenzierung von proliferierenden und hyperplastischen Zellen erfolgte nicht.

Bei der Verwendung des Proliferationsmarkers MIB-1 waren sowohl in der Hühnerhaut als auch in den Negativkontrollen schwache Hintergrundreaktionen erkennbar. Diese hatten jedoch keinen Einfluß auf die Auswertung der Ergebnisse. Die lymphatischen Zellen der Hundetonsillen (Positivkontrollen) wurden ebenfalls deutlich von den Antikörpern gegen PCNA und Ki-67 angefärbt.

Vergleich Ki-67 und PCNA:

Insgesamt reagierten etwa ein Drittel aller Geschwulstzellen der Hautkarzinomatose mit den Proliferationsmarkern PCNA bzw. Ki-67 positiv. Während durch PC-10 alle Zellen in der S-Phase erfaßt wurden, markierte MIB-1 alle sich im Zyklus befindlichen Zellen. Da auch die PCNA-positiven Zellen jeweils positiv für Ki-67 sein müßten, war eine generell höhere Anzahl Ki-67-positiver Zellen zu erwarten. Dies traf bei der Hautkarzinomatose der Jungmasthühner auch zu. Während maximal 45% der Tumorzellen PCNA-positiv reagierten, zeigten bis zu 60% der Geschwulstzellen eine Ki-67-positive Reaktion. Generell erfassen PCNA und Ki-67 jedoch verschiedenen Proliferationsparameter, so daß ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

3.3.6 Untersuchungen zur metastatischen Aktivität der Tumorzellen

Weder die makroskopischen noch die histopathologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen lieferten einen Hinweis darauf, daß die Hautkarzinomatose der Jungmasthühner metastastatische Aktivität besitzt.

Für den Nachweis von Gefäßeinbrüchen durch Tumorzellen wurden immunhistochemische Färbungen unter Verwendung des **von-Willebrand-Faktors (vWF)** durchgeführt.

3.3.6.1 Darstellung von Gefäßeinbrüchen

Mit Hilfe des **von-Willebrand-Faktors** wurden die Endothelien der Blut- und Lymphgefäße in der neoplastisch veränderten Hühnerhaut (Abb.22) sowie die Endothelien der Blutgefäße in Lunge, Leber und Niere deutlich dargestellt. Weder in den 25 untersuchten Hautproben, noch in den untersuchten Lungen-, Leber- und Nierenproben waren Einbrüche von Tumorzellen in Gefäße nachweisbar. Eine metastastatische Aktivität der Hautkarzinomatose wurde nicht beobachtet.

Die Gefäßendothelien der Positivkontrollen waren deutlich angefärbt. Die Negativkontrollen waren negativ und zeigten keinerlei spezifische oder unspezifische Färbungen.

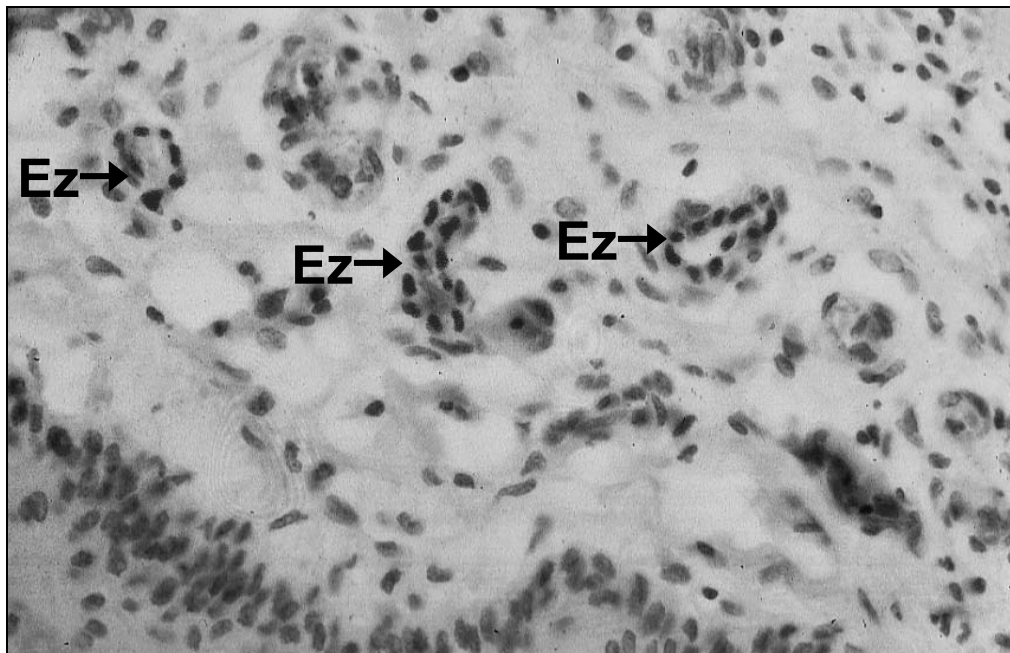


Abb. 22: Mit Hilfe des von-Willebrand-Faktors markierte Endothelzellen (**Ez**) in der neoplastisch veränderten Hühnerhaut. Einbrüche von Tumorzellen in Gefäße sind nicht nachweisbar.
B-SA-Färbung, (Okular 10x, Objektiv 40x)

3.3.7 Charakterisierung der Entzündungszellpopulationen im Tumorbereich

Histopathologisch waren in der unmittelbaren Umgebung der Geschwulstzellen Ansammlungen zellulärer Infiltrationen nachweisbar. Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung war es, diese Entzündungszellpopulationen näher zu charakterisieren.

3.3.7.1 Differenzierung zwischen B- und T-Lymphozyten

Einige Zellansammlungen wiesen im Anschnitt einen Durchmesser von 200-400 μm auf. Sie wurden von etwa 200 bis 500, selten über 600 Entzündungszellen gebildet. Um diese vorwiegend rundkernigen Zellen genauer differenzieren zu können, wurden zunächst die T-Lymphozytenmarker **CD3 (Dako)** und **CD3 (Biozol)** in der Hühnerhaut untersucht. Anschließend sollte mit Hilfe der T-Lymphozytenmarker **CD4** und **CD8 β** eine funktionelle Differenzierung der T-Lymphozyten erfolgen, da T- Helferzellen ein CD4- Molekül und zytotoxische T-Zellen ein CD8-Molekül auf ihrer Zellmembran besitzen (CHAN et al. 1988, LYDYARD und GROSSI 1991).

Zur Bestimmung der B-Lymphozyten wurden der B-Lymphozytenmarker **CD79 α** sowie die Immunglobulinmarker **IgG** und **IgM** verwendet.

Der huhnenspezifische Antikörper **CD3 (Dako)** wurde in der Verdünnung 1 : 40 am Paraffinschnitt unter Verwendung verschiedener Vorbehandlungsmethoden untersucht. CD3 markiert die Membranproteine von T-Zellen. Diese weisen bei einer positiven Reaktion an ihrer Oberfläche eine deutliche Rosafärbung auf.

In den untersuchten Hautproben reagierten etwa **75 Prozent** der infiltrierten Lymphozyten CD3-positiv. Da während der Vorversuche unspezifische Hintergrundreaktionen zu beobachten waren, wurden mit diesem Antikörper keine Hauptversuche durchgeführt.

Der huhnsspezifische Antikörper **CD3 (Biozol)** wurde ebenfalls zur Differenzierung der T-Lymphozyten eingesetzt. Dieser führte im Hauptversuch (am Kryostatschnitt in der Verdünnung 1 : 10 und einer Entwicklungszeit von 20 Minuten) bei etwa **75 Prozent** der infiltrierten Lymphozyten zu einer positiven Reaktion (Abb.23). Die Zellen waren peripher deutlich rosa gefärbt. Unspezifische Hintergrundreaktionen traten nicht auf.

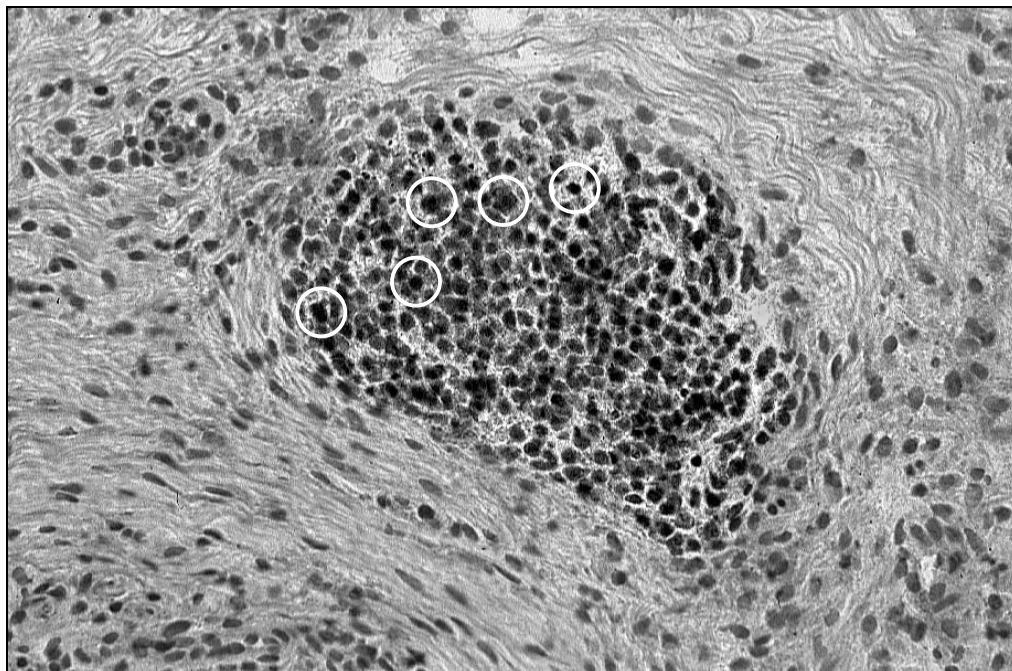


Abb. 23: Nachweis von T-Lymphozyten.

Der T-Zellmarker CD3 (Biozol) führt bei T-Lymphozyten (eingekreiste Zellen) zu einer deutlichen Anfärbung.

B-SA-Färbung, (Okular 10x, Objektiv 40x)

Der huhnsspezifische T-Lymphozytenmarker **CD4** wurde im Vorversuch am Kryostatschnitt in der Verdünnung 1 : 10 untersucht. Eine positive Reaktion war nicht erkennbar. Auch der T-Lymphozytenmarker **CD8 β** (huhnsspezifisch) reagierte nicht.

Der B-Zellenmarker **CD79 α** , ein huhnunspezifischer Antikörper, wurde an Paraffinschnitten der Hühnerhaut untersucht. Er zeigte in allen Präparaten ein negatives Ergebnis.

Der Immunglobulinmarker **IgG** wurde zum Nachweis der B-Lymphozyten im Hauptversuch am Kryostatschnitt in der Verdünnung 1 : 100 und einer Entwicklungszeit von 30 Minuten eingesetzt. In der Auswertung am Lichtmikroskop wiesen etwa **20 Prozent** der freien oder in Ansammlungen angeordneten Lymphozyten eine kräftig rosagefärbte Zelloberfläche auf.

Auch der Immunglobulinmarker **IgM** wurde im Hauptversuch am Kryostatschnitt in der Verdünnung 1 : 100 und einer Entwicklungszeit von 30 Minuten untersucht. Hierbei reagierten etwa **5 Prozent** der untersuchten Lymphozyten IgM-positiv. Ihre Oberfläche war deutlich rosa angefärbt.

Zusammenfassend zeigte sich, daß in der neoplastisch veränderten Hühnerhaut etwa **75 %** der infiltrierten Lymphozyten CD3- positiv reagierten. Diese stellten **T-Zellen** dar. Etwa **25%** der infiltrierten Lymphozyten reagierten IgG- bzw. IgM-positiv. Hierbei handelte es sich um **B-Zellen**. Einige der IgG-positiven Zellen stellten **Plasmazellen** dar. Ihr maximaler Anteil betrug etwa **3%**.