

4. Diskussion

Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung war es, unter Einsatz pathologisch-anatomischer, histopathologischer, elektronenmikroskopischer und immunhistochemischer Untersuchungen zur näheren Charakterisierung der Hautkarzinomatose beizutragen. Insbesondere sollten Erkenntnisse zur Histogenese und Dignität dieser Geschwulst ermittelt werden, die auch zur genaueren Klassifizierung dieses Tumors beitragen können.

4.1 Zur Prävalenz, Pathologie und Histogenese

Die Hautkarzinomatose der Jungmasthühner ist eine Geschwulsterkrankung, die weltweit verbreitet ist. Die ersten Fälle von Hautkarzinomatose wurden Anfang der sechziger Jahre in den USA beschrieben (TURNQUEST 1979). Frühere Veröffentlichungen beziehen sich auf das "Squamous cell carcinoma" von älteren Hühnern, das zu neoplastischen Veränderungen an Füßen, Beinen, Zunge und Ösophagus führt. Die Hautkarzinomatose der Jungmasthühner hingegen ist durch Läsionen im Bereich der befiederten Hühnerhaut charakterisiert. Da diese in der Regel keine klinischen Symptome verursachen, werden sie häufig erst im Geflügelschlachtbetrieb am bereits getöteten und entfederten Tier sichtbar.

In Deutschland trat die Hautkarzinomatose der Jungmasthühner in den siebziger Jahren nur sporadisch auf. Während bereits Anfang der achtziger Jahre ein deutlicher Anstieg betroffener Tiere zu beobachten war (BERGMANN et al. 1986), erreichte diese Geschwulsterkrankung 1991 ihre größte Häufigkeit: 0,22% der geschlachteten Jungmasthühner eines Geflügelschlachtbetriebes waren von Hautkarzinomatose betroffen (BERGMANN et al. 1995). Obwohl die Prävalenz in diesem Schlachtbetrieb in den darauffolgenden Jahren auf 0,002% zurückging, zeichnete sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme für die vorliegende Arbeit (1997 und 1999) ein erneuter Anstieg der Anzahl betroffener Tiere ab: 0,005% bzw. 0,004% der geschlachteten Jungmasthühner wiesen Hautkarzinomatose auf. Die genauen Ursachen hierfür waren nicht erkennbar.

Eine Langzeituntersuchung über die Verwurfsursachen bei Schlachtgeflügel in Deutschland ergab, daß zwischen 1975 und 1993 die Hauterkrankungen deutlich an Bedeutung gewannen (BERGMANN et al. 1995). Während in den 70er Jahren die Brustblasen (Bursitis sternalis) und die Hautform der Marekschen Krankheit unter den Verwurfsursachen an erster Stelle standen, nahmen in den darauffolgenden Jahren die phlegmonöse Dermatitis und die Hautkarzinomatose die ersten Plätze ein. Es ist anzunehmen, daß ein erhöhter Infektionsdruck in den Aufzuchtbetrieben die Entstehung der Hautkarzinomatose begünstigt haben könnte. Zahlreiche Wissenschaftler vermuten, daß die Ätiologie der Hauterkrankungen bei Schlachtgeflügel nicht einheitlich, sondern polyfaktoriell ist. Fütterungseinflüsse, der Einsatz verschiedener Linien, Veränderungen in der Tierhaltung (Besatzdichte, Keimbelastung, Stallklima) scheinen von ursächlicher Bedeutung zu sein (BERGMANN et al. 1995, WEINSTOCK et al. 1995). Möglicherweise ist der rückläufige Trend der Hautkarzinomatose seit 1991 auch auf eine Verkürzung der Mastdauer um sechs Tage zurückzuführen. Hierauf wird im letzten Kapitel dieser Diskussion ausführlicher eingegangen.

In der vorliegenden Untersuchung wurden 178 Jungmasthühner mit Hautkarzinomatose untersucht. Hierbei zeigte sich, daß diese Geschwulsterkrankung vorzugsweise in Form multipler Hautveränderungen auftritt. 102 der untersuchten Tiere, das entspricht 57,3%, wiesen mehr als eine Hautläsion auf. 7 Jungmasthühner entwickelten über zwanzig Hautveränderungen pro Tier, wobei diese häufig aus mehreren Einzelläsionen bestanden, die

nur schwer voneinander zu differenzieren waren. Im Durchschnitt wies jedes Jungmasthuhn vier Hautveränderungen auf. Da keine Anzeichen für Metastasierung nachweisbar waren, ist von einem primär multiplen Auftreten dieses Tumors auszugehen. Diese Meinung wird auch von früheren Untersuchern geteilt (TURNQUEST 1979, BERGMANN et al. 1995, HAFNER und GOODWIN 1997).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, daß 61,5% der tumorösen Hautveränderungen auf der dorsalen Körperoberfläche der untersuchten Jungmasthühner auftraten. Die kaudale Rückenregion sowie die Oberschenkel waren hiervon besonders betroffen. Dies deutet darauf hin, daß Staub oder Verletzungen (durch gegenseitige Belästigung hervorgerufen) die Entstehung der Hautkarzinomatose begünstigen. Etwa 32% der tumorösen Hautveränderungen waren im Bereich der ventralen Oberschenkel und der Brust nachweisbar. Ein vermehrtes Auftreten der Hautkarzinomatose in diesen Hautregionen könnte auf die hohe Kontamination mit Einstreu, Kot und Staub zurückzuführen sein. Ergebnisse aus früheren Untersuchungen lassen dies ebenfalls vermuten (HAFNER et al. 1993, HAFNER und GOODWIN 1997, PAYNE und FADLY 1997).

Darüber hinaus wurde beobachtet, daß zahlreiche Hautveränderungen in Verbindung mit Federfollikeln auftraten. Dies führte zu der Annahme, daß Federfollikel das Ausgangsgewebe der Hautkarzinomatose darstellen (BERGMANN et al. 1986, HAFNER et al. 1991 und 1993, WEINSTOCK et al. 1995).

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden die Hautveränderungen der Jungmasthühner in der vorliegenden Arbeit makroskopisch, histopathologisch, elektronenmikroskopisch und immunhistochemisch untersucht.

Hierbei zeigte sich, daß die Hautkarzinomatose in vier verschiedenen Manifestationsformen auftritt, die zugleich verschiedene, aufeinanderfolgende Stadien dieser Geschwulsterkrankung darstellen: neben *verdickten Federfollikeln* waren *knoten-*, *krater-* und *straßenförmige Hautveränderungen* nachweisbar.

Verdickte Federfollikel und *Knotenformen* stellen die Anfangsstadien der Hautkarzinomatose dar. Da in den Veröffentlichungen von TURNQUEST (1979), BERGMANN et al. (1986) und WEINSTOCK et al. (1995) ausschließlich von knotenförmigen Veränderungen berichtet wird, ist davon auszugehen, daß die verdickten Federfollikel im Geflügelschlachtbetrieb häufig übersehen oder nicht als Veränderungen der Hautkarzinomatose erkannt werden.

Histopathologisch stellten verdickte Federfollikel und Knoten dyskeratotisch proliferierende Federfollikel dar. Im Zentrum dieser Follikel fanden sich zystenähnliche Erweiterungen, die mit Hornzellen ausgefüllt waren. Obwohl bereits HAFNER et al. (1991) und WEINSTOCK et al. (1995) zystische Proliferationen in Verbindung mit Federfollikeln beobachteten, fehlten bislang eindeutige Hinweise, daß das Federfollikelepithel das Ursprungsgewebe der Hautkarzinomatose darstellt.

Durch den Verlust der oberflächlichen Epidermis und der zentralen Hornzyste im Schlachtprozeß entstehen aus den knotenförmigen Hautveränderungen *Krater*. Diese Manifestationsform der Hautkarzinomatose war mit etwa 77 Prozent am häufigsten vertreten. Die Mehrheit der Krater wies Durchmesser zwischen fünf und 20 Millimeter auf. Gelegentlich wurden auch Kraterdurchmesser bis 3,7 Zentimeter beobachtet. Dies stimmt mit den Angaben von HAFNER et al. (1993) überein.

Sämtliche kraterförmige Läsionen bildeten einen Randwall. Hier waren histopathologisch zahlreiche Geschwulstzellen nachweisbar. In einigen Krateranschnitten gab es Hinweise darauf, daß diese ihren Ausgang im Stratum basale des dyskeratotisch proliferierten

Federfollikel­epithels nehmen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten dies. Basale Federfollikel­epithel­zellen durchbrachen an zahlreichen Stellen die Basalmembran, um anschließend in Form von großen polygonalen oder stern- und spindelförmigen Tumorzellen das umliegende Bindegewebe zu infiltrieren. Geschwulstzellen, die in die angrenzende Skelettmuskulatur infiltrierten, wurden nicht gesehen. In der unmittelbaren Umgebung der Neoplasie fanden sich lymphozytäre Infiltrationen und Makrophagen.

In früheren Studien wurden auf Grund ihrer hohen Prävalenz bevorzugt Kraterformen untersucht (TURNQUEST 1979, WEINSTOCK et al. 1995). In diesen war, auf Grund von Brüh- und Entfederungsprozessen im Geflügelschlachtbetrieb, häufig kein Federfollikel­epithel mehr nachweisbar. Zahlreiche Hautproben wiesen stattdessen Anteile einer hyperplastischen Epidermis auf. Dies führte zu der Annahme, daß die Hautkarzinomatose ihren Ausgang in der Epidermis und nicht im Federfollikel­epithel nimmt. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich jedoch, daß eine hyperplastische Epidermis ausschließlich in der unmittelbaren Umgebung von veränderten Federfollikeln auftrat. Sie stellt den Übergang zur gesunden Hühnerhaut dar.

Straßenförmige Hautläsionen wurden nur bei sieben der insgesamt 178 untersuchten Jungmasthühner beobachtet. Diese entstehen, wenn benachbarte Krater miteinander konfluieren und im Anschluß daran abheilen. Auf diese Weise entwickeln sich aus den tiefen kraterförmigen Ulzerationen oberflächliche, die Hühnerhaut straßenförmig überziehende Veränderungen. Diese Manifestationsform wird von anderen Autoren nicht erwähnt.

Histopathologisch waren nur noch vereinzelt Tumorzellen nachweisbar. Stattdessen fanden sich reparative Veränderungen, die durch Fibroplasie, entzündliche Infiltrationen und Reepithelisierung charakterisiert wurden. Sie können als Anzeichen einer spontanen Tumorregression gedeutet werden.

Bereits Anfang der neunziger Jahre beobachteten HAFNER et al. (1991) bei zahlreichen Masthähnchen Regressionserscheinungen. Diese waren mit 45 Lebenstagen jedoch deutlich älter als die hier untersuchten Tiere. Somit ist das seltene Auftreten der Straßenform bei Jungmasthühnern vermutlich auf ihr geringes Schlachtagter zurückzuführen. HAFNER et al. (1991) führten ihre Untersuchungen an lebenden Hühnern durch. Sie ermittelten eine Regressionszeit von durchschnittlich 14 Tagen, was für eine schnelle Heilung dieser Geschwulsterkrankung spricht.

Um weitere Beweise dafür zu finden, daß die Hautkarzinomatose ihren Ausgang im hyperplastischen Federfollikel­epithel nimmt, wurden spezielle immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Zielsetzung dieser Untersuchungen war es, nach spezifischen Markern zu suchen, die Epithelzellen in der Hühnerhaut trotz weitgehender neoplastischer Entdifferenzierung immunhistochemisch differenzieren konnten. Hierfür erwies sich der Einsatz von Zytokeratinmarkern als besonders geeignet (QUINLAN et al. 1985, MADEWELL und THEILEN 1987, FUCHS 1995).

Zytokeratine sind schwefelhaltige Strukturproteine, die wesentliche Bestandteile des Intermediärfilamentnetzes epithelialer Zellen darstellen und sich während der Keratinisierung zu Keratinfilamenten zusammenlagern (GROSENBAUGH und HOOD 1992).

In der gut differenzierten Haut liegt ein komplexes Zytokeratinmuster vor. Während dieses beim Menschen (MOLL 1982) und bei einzelnen Tierarten, z.B. beim Hund (WALTER 1998) gut untersucht wurde, liegen bei Hühnervögeln bislang nur wenige Veröffentlichungen hierzu vor (DORTSCHY et al. 2000).

Immunhistochemisch lassen sich Zytokeratine durch die Reaktion monoklonaler Antikörper in Verbindung mit Differenzierungs- bzw. Funktionsmarkern des Zytoskeletts nachweisen (KÖHLER und MILSTEIN 1975, LOBECK 1991).

In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür die B-SA- (Biotin-Streptavidin-Amplifikations-) Methode verwendet, die auf der Grundlage der besonders starken Affinität zwischen Biotin und Streptavidin beruht. Im Vergleich zur früher häufig eingesetzten ABC- (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex) Methode (WALTER et al. 1989, BOURNE 1997) stellt die Biotin-Streptavidin-Bindung die stärkste aller nichtkovalenten Bindungen dar, woraus die höhere Empfindlichkeit bei der Anwendung dieser Methode resultiert (DENK 1986, BOENISCH 1997, CASALINI et al. 1997, IZRAILEV et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt neun verschiedene Zytokeratinmarker untersucht. Hierbei handelte es sich im einzelnen um die Marker AE1, AE3, LP34, LL002, KL1, CAM5.2, Ks7.18, E3 und Ks19.1, von denen am Paraffinschnitt nur AE1, AE3, LP34 und LL002 positive Färbeergebnisse lieferten.

In der Auswertung zeigte sich, daß sowohl die hornbildenden Geschwulstzellen als auch die Hornzellen des Stratum corneum der Epidermis und Federfollikel das Zytokeratin CK14 aufwiesen.

Die weniger differenzierten Tumorzellen enthielten die gleichen Zytokeratine wie die basalen Zellen der hyperplastischen Federfollikel und Epidermis. Sie wiesen neben den Zytokeratinen CK1, CK5 und CK8 die Zytokeratine CK10, CK14, CK16 und CK19 auf.

In den höher differenzierten Geschwulstzellen waren darüber hinaus die Zytokeratine CK 6 und CK18 nachweisbar. Diese wurden mit Hilfe des Zytokeratinmarkers LP34 dargestellt, der auch in den Suprabasalzellen der hyperplastischen Epidermis und Federfollikel deutlich positiv reagierte. In den Zellen der unveränderten Epidermis hingegen zeigte LP34 keine Farbreaktion. Dies wird durch die Untersuchungsergebnisse von DORTSCHY et al. (2000) bestätigt.

Unter Berücksichtigung der makroskopischen, histopathologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen lieferte die Tatsache, daß LP34 sowohl im hyperplastischen Federfollikelepithel als auch in den Geschwulstzellen, nicht aber in Zellen der Epidermis positiv reagierte, erstmalig den Nachweis, daß nicht, wie vielfach angenommen die Epidermis, sondern das hyperplastische Federfollikelepithel das Ursprungsgewebe der Hautkarzinomatose darstellt.

4.2 Zur Dignität und Klassifizierung

Nachdem der Nachweis erbracht war, daß es sich bei der Hautkarzinomatose der Jungmasthühner um eine Geschwulsterkrankung handelt, die ihren Ausgang im hyperplastischen Federfollikelepithel nimmt, sollte nun deren Dignität genauer untersucht werden. Hierzu wurden elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt sowie Untersuchungen zur Mitoserate und zur Proliferationsaktivität der Geschwulstzellen anhand zweier Proliferationsmarker angestellt. Weiterhin wurden mögliche Tumorzelleinbrüche in Gefäßbahnen (Metastasierung) geprüft und auf Spontanregression verweisende entzündliche Reaktionen analysiert. Aussagen zur Dignität sind sowohl für die Charakterisierung der Neoplasie als auch für ihre Klassifizierung von Bedeutung.

Bereits die histopathologischen Untersuchungen zeigten, daß die Hautkarzinomatose der Jungmasthühner verschiedene Tumorzelltypen aufweist. Ultrastrukturelle Untersuchungen bestätigten dies. Hierbei gelang der Nachweis, daß die basalen Zellen des hyperplastischen Federfollikelepithels die Basalmembran durchbrachen, um anschließend in Form von

polygonalen und *stern-* oder *spindelförmigen Geschwulstzellen* das angrenzende Bindegewebe zu infiltrieren.

Kennzeichnend für die *polygonalen Tumorzellen* waren ein großer unregelmäßiger Zellkern mit prominentem Kernkörperchen und zahlreiche freie und an endoplasmatisches Retikulum gebundene Ribosomen. Diese Tumorzellen infiltrierten häufig gruppenförmig das umliegende Gewebe. Geschwulstzellen, die sich im Zentrum dieser Zellgruppen befanden, wiesen zahlreiche Kertinfilamente Lipidtropfen und Reste lamellärer Organellen auf. Sie wurden zunehmend flacher, verhornten und bildeten auf diese Weise Hornperlen. Diese Beobachtung lieferte den Nachweis, daß es sich hierbei um *höher differenzierte Tumorzellen* handelte, die die Fähigkeit zur Verhornung besaßen.

Die *stern- und spindelförmigen Geschwulstzellen* hingegen infiltrierten einzeln oder in Form von dünnen Strängen das umliegende Gewebe. Mitotisch aktive Zellkerne sowie zahlreiche defekte Desmosomen deuteten auf ein schnelles Wachstum dieser Geschwulstzellen hin. Im Zytoplasma waren neben zahlreichen Mitochondrien freie und an endoplasmatisches Retikulum gebundene Ribosomen nachweisbar. Der Gehalt an Keratinfilamenten war gering. Hierbei handelte es sich um *weniger differenzierte Tumorzellen*, die nicht fähig waren, Horn zu bilden.

Um nähere Angaben über das Wachstumsverhalten der Hautkarzinomatose zu erhalten, wurde der Anteil der sich in Mitose befindlichen Geschwulstzellen bestimmt. Die *Mitoserate* der Hautkarzinomatose betrug durchschnittlich 3,2, wobei im tumorösen Gewebe zwischen 1 und 10 mitotische Figuren pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung nachgewiesen wurden. Dies deutet auf eine verhältnismäßig geringe Wachstumsgeschwindigkeit dieser Neoplasie hin. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß auf Grund ihrer hohen Prävalenz bevorzugt Kraterformen untersucht wurden. In den verdickten Federfollikeln und Knotenformen hingegen waren deutlich mehr mitotisch aktive Tumorzellen nachweisbar. Dies spricht für ein schnelles Wachstum der Hautkarzinomatose bevorzugt in den Anfangsstadien.

In diesem Zusammenhang wurde auch die *Proliferationsaktivität* der Geschwulstzellen näher untersucht. Während der Proliferationsmarker MIB-1 (Dianova, Ki-67) alle sich im Zellzyklus befindlichen Zellen markiert, wurden mit Hilfe von PC-10 (Dako, PCNA) alle sich in der S-Phase des Zyklus befindlichen Zellen erfaßt.

In den kraterförmigen Hautveränderungen reagierten etwa 40 Prozent der Tumorzellen Ki-67- und etwa 30 Prozent PCNA- positiv. Hierbei handelte es sich vorwiegend um *weniger differenzierte Geschwulstzellen*. Diese traten bevorzugt in verdickten Federfollikeln und Knotenformen auf, was ebenfalls für ein schnelles Wachstum der Hautkarzinomatose in den Anfangsstadien spricht.

In der Literatur wurde versucht, ein Zusammenhang zwischen der Proliferationsaktivität und der Malignität einer Geschwulst herzustellen. Beim Hund wurden z. B. Mammatumoren (CANESE et al. 1994), Mastzelltumoren (SIMOES et al. 1994) und testikuläre Tumoren (SARLI et al. 1994) untersucht.

KIUEPEL (1999) führte Untersuchungen an caninen malignen Lymphomen durch und ermittelte einen Anteil an PCNA- positiven Zellen zwischen 9 und 86%. Der Anteil Ki-67- positiver Zellen betrug zwischen 8 und 82%. Insgesamt zeigte sich, daß die Malignität einer Geschwulst nur zu einem geringen Grad über den Anteil proliferierender Zellen bestimmt werden kann. Wesentliche Malignitätskriterien hingegen stellen laut KIUEPEL (1999) Invasivität und Infiltration dar. Somit ist nicht allein auf Grund der Tatsache, daß bei der Hautkarzinomatose der Jungmasthühner zwischen 15 und 45% der Tumorzellen PCNA- und zwischen 20 und 60% dieser Zellen Ki-67-positiv reagierten, auf den Malignitätsgrad dieser

Geschwulst zu schlußfolgern. Eindeutige Hinweise hierauf liefern vielmehr die histomorphologischen Untersuchungen.

Um dennoch einen Hinweis auf den Malignitätsgrad dieser Geschwulst zu erhalten, wurden zahlreiche Haut- und Gewebeschnitte auf Tumorzeleinbrüche in Gefäße untersucht.

Maligne, infiltrierend wachsende Tumorzellen durchbrechen häufig die Wände von Lymph- und Blutgefäßen und zeigen damit die Erscheinung der Invasion. Wenn sie nach ihrer Verschleppung an Gefäßwänden haften bleiben und auswachsen, entstehen Tochtergeschwülste bzw. Metastasen. Da der Einbruch von Krebszellen in Gefäße in Routinefärbungen meist nur ungenügend zu erkennen ist (SVANHOLM et al. 1984, ORDONEZ et al. 1987, GUTBERLET 1994), wurde das Gefäßendothel immunhistochemisch mit Antikörpern gegen den von- Willebrand- Faktor (vWF) gefärbt (näheres hierzu bei MC COMB et al. 1982). Ebenso wurde die eindeutige Farbmarkierung auch von Einzelzellen durch Zytokeratinmarker herangezogen, um mögliche Gefäßeinbrüche von Tumorzellen zu ermitteln.

In der Auswertung wies keiner der untersuchten Hautschnitte eindeutige Tumorzeleinbrüche in Lymph- oder Blutgefäße auf. Dies stimmt mit den Untersuchungsergebnissen von BERGMANN et al. (1986) überein.

Im Rahmen der Zytokeratinbestimmung der neoplastisch veränderten Hühnerhaut waren ebenfalls keine Tumorzeleinbrüche in Gefäße nachweisbar.

Metastasen traten weder in den untersuchten Leber- noch in den Nieren- und Lungenproben auf, so daß von keiner hämatogenen bzw. lymphogenen Streuung der Tumorzellen auszugehen ist. Vielmehr deuten die vorliegenden Untersuchungsergebnisse auf ein primär multiples Auftreten dieser Geschwulsterkrankung hin.

In den krater- und straßenförmigen Hautveränderungen traten peripher der Geschwulstzellen zunehmend Fibrosierungen und entzündliche Reaktionen unter Bildung von follikelähnlichen Lymphozytenherden in den Vordergrund. Obwohl bereits in früheren Veröffentlichungen von lymphozytären Infiltrationen im Bereich der Tumorzellen berichtet wurde, lagen bislang keine Angaben zur B- oder T-Zellzugehörigkeit dieser Zellen vor (HAFNER et al. 1991, WEINSTOCK et al. 1995). In diesem Zusammenhang erfolgte die Charakterisierung der Entzündungszellpopulationen im Tumorbereich:

Lymphozyten exprimieren wie zahlreiche andere Leukozyten verschiedene Moleküle auf ihrer Zelloberfläche (CHEN et al. 1982, CHEN und COOPER 1987, PEAULT et al. 1987, OLSEN und EWERT 1990). Diese können mit Hilfe monoklonaler Antikörper, auch Differenzierungsmarker genannt, immunhistochemisch differenziert werden. Da für eine eindeutige Differenzierung von B- und T-Lymphozyten routinemäßig verwendete Färbemethoden nicht ausreichend sind, wurde für diese Untersuchung ebenfalls die B-SA-Methode verwendet. Die Immunglobulinmarker IgG und IgM sowie der T-Lymphozytenmarker CD3 (Biozol) lieferten an Kryostatschnitten der Hühnerhaut die besten Farbeergebnisse.

Anhand der vorliegenden, auf Auszählung der Zellen im histologischen Schnitt beruhenden Untersuchungen, wurden etwa 25% der Lymphozyten als B-Zellen differenziert. Als Vorstufen der immunkompetenten antikörpersezernierenden Plasmazellen, die ebenfalls in geringer Anzahl nachweisbar waren, deuten sie auf das Vorliegen einer spezifischen Immunreaktion hin. Die negative Reaktion des B-Lymphozytenmarkers CD79 α wird auf dessen Unspezifität zurückgeführt.

Etwa 75% der infiltrierten Lymphozyten stellten T-Zellen dar. Diese sind Hauptträger der zellvermittelten Immunität. Der Versuch, immunhistochemisch zwischen T- Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen zu differenzieren, gelang nicht. Stattdessen waren mit Hilfe der

ANAE- Färbung inmitten der lymphozytären Infiltrationen enzymhistochemisch zahlreiche Makrophagen nachweisbar. Diese phagozytieren Antigene und AG-AK-Komplexe, um sie anschließend Entzündungszellen wie Lymphozyten zu präsentieren. Das gemeinsame Auftreten von Makrophagen und Lymphozyten lieferte einen weiteren Hinweis auf das Vorliegen einer spezifischen Immunreaktion. Die Entzündungszellen traten ausschließlich in der unmittelbaren Umgebung der Geschwulstzellen auf. Dies könnte einerseits für das Vorliegen einer Infektion, andererseits für eine Abwehrreaktion gegen die Neoplasie sprechen.

Zusammenfassend zeigte sich, daß das hyperplastisch proliferierende Federfollikel-epithel das Ursprungsgewebe der Hautkarzinomatose darstellt. Einige der erst 34 Tage alten Jungmasthühner wiesen bereits alle vier Manifestationsstadien dieser Geschwulsterkrankung auf, was für ein schnelles Wachstum dieser Geschwulst besonders in den Anfangsstadien spricht.

Verdickte Federfollikel und Knotenformen enthielten zahlreiche Tumorzellen, die die Basalmembran durchbrachen, um anschließend einzeln oder in Form von dünnen Zellsträngen das umliegende Bindegewebe zu infiltrierten. Diese weniger differenzierten Geschwulstzellen wiesen eine relativ hohe Mitose- und Proliferationsaktivität auf. Dies kann als Anzeichen eines prinzipiell malignen Charakters dieser Neoplasie angesehen werden.

In den Krater- und Straßenformen hingegen waren zahlreiche höher differenzierte Geschwulstzellen nachweisbar. Diese zeigten ein expansives Wachstum, lagerten sich häufig gruppenförmig aneinander und bildeten auf diese Weise Hornperlen. Die Straßenformen wiesen Regressionserscheinungen auf, die schließlich zur narbigen Abheilung dieser Geschwulst führten. Dies spricht für einen gutartigen Charakter dieser Neoplasie.

Da sich nicht alle Geschwülste eindeutig gut- oder bösartig verhalten, sondern intermediäres Verhalten und graduelle Unterschiede aufweisen, ist bei dieser Geschwulst der Jungmasthühner durch fehlende Metastasierung und die Fähigkeit zur hohen Differenzierung und Regression von einer *geringen Malignität* auszugehen. Anders gesehen entspricht dieser Geschwulsttyp in mehreren Eigenschaften dem Typ des *semimalignen* Tumors. Dieser ist durch lokal invasives, destruierendes Wachstum und durch Rezidivneigung gekennzeichnet und zeigt in der Regel keine Metastasierung (RIEDE et al. 1986, GRUNDMANN 1989, PSCHYREMBEL 2002). Die Bezeichnung „semimaligne“ gilt jedoch als ungenau (EDER 1990). Für die genauere Klassifizierung einer Geschwulst ist daher die exakte Charakterisierung ihres Wachstumverhaltens erforderlich.

Das doppeldeutige Verhalten dieser Geschwulst der Jungmasthühner führte zu Schwierigkeiten bei der **Klassifizierung**: In zahlreichen Veröffentlichungen wurde sie als „Verhornendes Plattenepithelkarzinom“, „Hautkarzinomatose“ (Dermal squamous cell carcinoma) oder als „Aviäres Keratoakanthom“ bezeichnet (TURNQUEST 1979, BERGMANN et al. 1986, GOOD 1991, HAFNER et al. 1991, LANGHEINRICH 1991, PRANGE 1992, PAYNE und FADLY 1997). Ferner fanden die Bezeichnungen „Epithelioma spinocellulare cutaneum“ (CARTELLI et al. 1993) und „Squamous epithelioma“ (WEINSTOCK et al. 1995) Verwendung.

Das *Plattenepithelkarzinom* (Squamous cell carcinoma) des Menschen stellt laut WHO-Definition eine maligne Geschwulst der Epidermis dar, die Anzeichen epithelialer Differenzierung zeigt (HEENAN et al. 1996). Sie tritt ebenso wie das Keratoakanthom bevorzugt in der sonnenexponierten Haut älterer hellhäutiger Menschen auf. Neben Ulzeration und Infiltration kommen verschiedene Wachstumsformen und Differenzierungsgrade vor. Die meisten dieser Karzinome bestehen aus Zellen mit nur

geringgradiger Pleomorphie. Diese weisen ein eosinophiles Zytoplasma sowie scharfe Zellgrenzen auf und neigen zur Bildung von Hornperlen. In anderen Fällen sind die Tumorzellen weniger differenziert und stärker pleomorph. Sie zeigen keine Anzeichen von Keratinisierung und infiltrieren in schmalen Verbänden das angrenzende Bindegewebe. Beim Menschen bilden Plattenepithelkarzinome der Haut in bis zu 5% der Fälle Metastasen. Nach chirurgischer Entfernung werden gelegentlich Rezidive beobachtet (NOLTENIUS 1987, HEENAN et al. 1996).

Das Plattenepithelkarzinom des Menschen und die Hautkarzinomatose des Huhnes weisen trotz zahlreicher Gemeinsamkeiten (Ulzeration, Infiltration, verschiedene Wachstumsformen und Differenzierungsgrade) Unterschiede auf:

Die Hautkarzinomatose

- tritt bei sehr jungen Tieren auf, die keiner Sonnenlichtexposition ausgesetzt sind
- findet ihren Ursprung in den basalen Zellen des hyperplastisch proliferierenden Federfollikel-epithels und nicht in der Epidermis
- weist keine Rezidive nach chirurgischer Entfernung auf und metastasiert nicht

Eine Bezeichnung dieser Geschwulsterkrankung als Plattenepithelkarzinom oder Hautkarzinomatose (*Dermal squamous cell carcinoma*) ist ungenau und nicht hinreichend charakterisierend.

Das *Keratoakanthom* (Keratoacanthoma) des Menschen ist laut WHO- Definition eine epidermale Geschwulst, die in ihrem Zentrum eine kraterähnliche keratingefüllte Einziehung aufweist (HEENAN et al. 1996). Sie entsteht bevorzugt in der sonnenexponierten Haut älterer hellhäutiger Menschen und tritt sowohl solitär als auch multipel auf. Die harten, oft ulzerierten oder eingedellten Knoten können einen Durchmesser von 1- 2 cm erreichen. Der zentrale Krater, der sich im Zentrum der verdickten Epidermis entwickelt, ist mit Kreatin ausgefüllt. Die Verdickung der Epidermis ist teilweise so erheblich, daß ein infiltrierendes Wachstum in das darunter liegende Gewebe vorgetäuscht und die differenzialdiagnostische Abgrenzung gegen ein infiltrierendes hoch differenziertes Plattenepithelkarzinom nötig wird. Im Randbereich dieser Neoplasie lassen sich häufig Infiltrationen neutrophiler Granulozyten nachweisen. Nach chirurgischer Entfernung des Keratoakanthoms sind Rezidive möglich (NOLTENIUS 1987, HEENAN et al. 1996).

Anhand dieser Beschreibung werden zahlreiche Unterschiede zwischen dem Keratoakanthom des Menschen und der Hautkarzinomatose der Jungmasthühner deutlich:

Die *Hautkarzinomatose* tritt bereits bei sehr jungen Tieren auf, die keiner Sonnenlichtexposition ausgesetzt sind. Während das Keratoakanthom des Menschen seinen Ursprung in der Epidermis findet, geht die Hautkarzinomatose von den basalen Zellen des hyperplastisch proliferierenden Federfollikel-epithels aus. Diese durchbrechen an zahlreichen Stellen die Basalmembran, um anschließend das umgebende Gewebe zu infiltrieren. Dieses maligne Verhalten spricht gegen eine Klassifizierung dieser Geschwulst als Keratoakanthom. In den Untersuchungen von RUDOLPH (1983) wurden Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den spontanen Keratoakanthomen von Mensch, Hund, Schaf und *Mastomys natalensis* ermittelt. Es zeigte sich, daß es auch hier neben übereinstimmenden Merkmalen, die durchaus für die Verwendung eines gleichen Tumornamens bei Mensch und Tier sprechen, eine Reihe von Unterschieden gibt, die eine andere Bezeichnung des Keratoakanthoms bei Tieren rechtfertigen. So wird das Keratoakanthom beim Hund, das anders als beim Menschen vom Infundibulum bzw. Isthmus der Haarfollikel ausgeht, heute auch als *Intracutaneous cornifying epithelioma* (ICE) bezeichnet. Diese Geschwulst weist kein infiltrierendes Wachstum auf (PULLEY und STANNARD 1990).

CARTELLI (et al. 1993) und WEINSTOCK (et al. 1995) schlugen die Bezeichnungen „Epithelioma spinocellulare cutaneum“ bzw. „Squamous epithelioma“ vor. Diese kennzeichnen jedoch das Tumorsprungsgewebe nur unzureichend.

Die eigenen Untersuchungen und die Angaben der Literatur lassen zusammenfassend folgende Aussage zur Klassifizierung zu:

Bei der hier untersuchten Geschwulst der Jungmasthühner handelt es sich um eine Neoplasie des Federfollikelepithels. Diese ist durch infiltratives, destruierendes Wachstum gekennzeichnet und weist daher maligne Eigenschaften auf. Weder Invasion von Tumorzellen in Gefäße noch Metastasierung waren mit Sicherheit feststellbar. Stattdessen fanden sich Regressionserscheinungen und gut differenzierte Tumorzellen mit der Fähigkeit zur Verhornung, so daß von einer geringgradigen Malignität dieser Geschwulst ausgegangen werden kann. Für ihre genauere Klassifizierung ist daher die Bezeichnung „**hochdifferenziertes Federfollikelkarzinom**“ zu empfehlen.

4.3 Zur Ätiologie

Die Ätiologie der Hautkarzinomatose konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Seit einigen Jahren wird vermutet, daß für die Entstehung dieser Geschwulsterkrankung verschiedene Faktoren von Bedeutung sind. Neben einer genetischen Prädisposition wurden eine infektiöse Genese sowie Probleme in der Tierhaltung, -fütterung und im Herdenmanagement vermutet (BERGMANN et al. 1995, HAFNER und GOODWIN 1997).

Die Hautkarzinomatose wurde bisher nur bei Jungmasthühnern beschrieben. Männliche Tiere waren hiervon besonders betroffen (HAFNER et al. 1993). Obwohl dies auf eine genetische Prädisposition hindeutet, liegt bislang kein Nachweis hierfür vor (WEINSTOCK et al. 1995). Legehennen, Enten, Gänse und Puten weisen keine Hautkarzinomatose auf. Dies könnte auf das höhere Schlachalter dieser Tiere zurückzuführen sein. Es ist nicht ausgeschlossen, daß sie Hautläsionen bilden, die zum Zeitpunkt der Schlachtung bereits abgeheilt sind. Hierüber könnten weiterführende Untersuchungen Aufschluß geben.

Die Hautkarzinomatose findet ihren Ursprung im hyperplastischen Federfollikelepithel. Es ist weiterhin annehmbar, daß genetische Defekte in einzelnen Federanlagen zur follikulären Dyskeratose und Proliferation führen.

HAFNER et al. (1993) äußerten die Vermutung, daß das Auftreten der Läsionen in verschiedenen Federtrakten mit der Reife der Federn und ihrem Austausch während der Mauser in Verbindung steht. So ist das Fehlen einer proportionalen Anzahl von Veränderungen im Flügeltrakt möglicherweise auf den frühen Austausch dieser Federn zurückführbar.

Der deutliche Rückgang der Hautkarzinomatose in den letzten Jahren könnte auch auf verkürzte Mastzeiten und höhere Wachstumsraten zurückzuführen sein, da hierdurch sowohl die Ausbildung von Federfluren als auch das Befiederungstempo und die Struktur der Unterhaut beeinflußt werden können (BERGMANN 1995).

Häufig wurde vermutet, daß die gangähnlichen Veränderungen in der Hühnerhaut auf Einwirkungen von Larven des glänzenschwarzen Getreideschimmelkäfers (*Alphitobius diaperinus*) zurückzuführen sind (PRANGE 1992). Zahlreiche Untersuchungen ergaben jedoch, daß diese Larven weder vitale noch frisch tote oder moribunde Tiere befallen (HEIMBUCHER und KUTZER 1979, KRONTHALER 1980, RUSCHER 1981).

Zahlreiche Geschwülste der Hühner werden durch Viren induziert (PRANGE 1992). Als Erreger der Marekschen Krankheit wurde ein Gammaherpesvirus ermittelt, das die Proliferation des lymphoretikulären Gewebes zu lymphomartigen Neoplasien verursacht. Die Hautform dieser Erkrankung führt zu neoplastisch veränderten Federfollikeln, die sich jedoch deutlich von den Veränderungen der Hautkarzinomatose unterscheiden.

Aviäre Retroviren verursachen ebenfalls eine breite Palette von Neoplasien beim Huhn (PRANGE 1992). Die zu dieser Virusfamilie gehörenden aviären Leukoseviren induzieren bei infizierten Vögeln lymphoide Leukose, Osteopetrose, Erythroblastose und Sarkome (BRENDA 1988).

BEARD (1980) beobachtete 28 Tage nach Injektion des aviären Leukosevirus MC29 die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms in der Hühnerhaut. Dies war ein ernstzunehmender Hinweis, daß ALV für die Entstehung der Hautkarzinomatose von Bedeutung sein könnten. Bislang ist es nicht gelungen, dieses Experiment erfolgreich zu wiederholen (HAFNER et al. 1993).

Um den Hinweisen auf eine infektiöse Genese des Hautkarzinomatose nachzugehen, wurden in der vorliegenden Untersuchung 26 neoplastisch veränderte und neun gesunde Hautproben elektronenmikroskopisch untersucht. Sowohl in sechs veränderten als auch in einer gesunden Hautprobe waren virusähnliche Partikel nachweisbar, die morphologisch aviären Leukoseviren ähnelten. Diese traten sowohl innerhalb als auch in der unmittelbaren Umgebung der Geschwulstzellen auf.

Zur näheren Differenzierung dieser Viruspartikel wurde ein Antigen-ELISA an Haut- und Kloakentupferproben von erkrankten Jungmasthühnern durchgeführt. Diese Untersuchungsmethode beruht auf dem Nachweis des Core-Proteins p27, das aviäre Leukoseviren aller Subtypen und auch endogene Viren besitzen.

In der Auswertung zeigte sich, daß sowohl die untersuchten Hautprobenpools als auch 50% der Kloakentupferproben p27-positiv reagierten. Dies erhärtete den Verdacht, daß es sich bei den elektronenmikroskopisch dargestellten Viren tatsächlich um aviäre Leukoseviren handelte.

Als Gegenprobe wurden Haut- und Blutproben von Jungmasthühnern untersucht, die keine krankhaften Hautveränderungen aufwiesen, aber aus Herden mit Hautkarzinomatose stammten. 60% der Haut- und 36% der Vollblutproben reagierten ebenfalls p27-positiv. Dieses Ergebnis läßt verschiedene Interpretationen zu:

- Zwischen dem Auftreten von aviären Leukoseviren und Hautkarzinomatose besteht kein kausaler Zusammenhang.
- Die positiv getesteten Tiere der Kontrollgruppe waren latent virusinfiziert, was auch ein Fehlen der Hautveränderungen erklären würde.
- Die aviären Leukoseviren fungieren als Cofaktoren, die gemeinsam mit anderen Einflußfaktoren zur Entstehung der Hautkarzinomatose beitragen. Auf diesen Aspekt wird am Ende dieses Kapitels noch genauer eingegangen.

HAFNER et al. (1991) führten ebenfalls elektronenmikroskopische Untersuchungen an neoplastisch veränderter Hühnerhaut durch. Sie konnten jedoch keine Viruspartikel nachweisen. Dies könnte auf einen geringeren Probenumfang und das hohe Alter der untersuchten Tiere zurückzuführen sein:

Die Wissenschaftler führten ihre Untersuchungen an acht Hühnern durch, von denen fünf Tiere 45 - 46 Tage und drei 82 Tage alt waren. Die Haut dieser Hühner wies bereits lymphozytäre Infiltrationen, Plasmazellen und Fibroplasie als deutliche Kennzeichen für Regression auf, was für kein akutes Infektionsgeschehen spricht.

HAFNER et al. (1991) gaben an, daß Leukose mit der Hautkarzinomatoseprävalenz bei Hühnern negativ korreliert ist. In dieser Untersuchung erfolgte jedoch keine Differenzierung der Leukosevirus-Untergruppe.

Das aviäre Leukosevirus und dessen onkogenen Varianten werden auf Grund ihrer unterschiedlichen Antigenstrukturen in den Glykoproteinen der Virushülle in acht Untergruppen unterteilt. Man bezeichnet diese mit den Buchstaben A bis G und J (VOGT und ISHIZAKI 1965 und 1966, DUFF und VOGT 1969, CRITTENDEN 1975, PURCHASE et al. 1977, BENDA 1988, LAMICHHANE et al. 1997). Die meisten der spontan vorkommenden aviären Onkovirusstämme gehören zu den Untergruppen A und B. In vielen Ländern gewinnt gegenwärtig auch die Untergruppe J als Pathogen in Broilereltern-tierbeständen an ökonomischer Bedeutung (PAYNE et al. 1997, FADLY 1998).

Um die Untergruppe der nachgewiesenen Leukoseviren näher zu bestimmen, wurde in der vorliegenden Untersuchung ein Antikörpernachweis mittels ELISA durchgeführt. Die Problematik besteht darin, daß Infektionen mit ALV nur bei infektionsempfänglichen und immunkompetenten Hühnern zur Bildung von spezifischen Antikörpern gegen die typischen Hüllantigene der verschiedenen ALV-Untergruppen führen (ISHIZAKI und VOGT 1966, WITTER et al. 1966). Diese sind laut VON DEM HAGEN und LÖLIGER (1972) bei einer exogenen ALV-Infektion im frühen Kükenalter erst ab der 6. bis 8. Lebenswoche nachweisbar.

Der ELISA- Antikörpernachweis wurde an Vollblutproben von elf Jungmasthühnern durchgeführt. Da die Hautveränderungen im Geflügelschlachtbetrieb häufig erst an den bereits gebrühten und entfederten Hühnern sichtbar werden, erfolgte die Blutprobenentnahme von Junghühnern, die keine Hautveränderungen aufwiesen, aber aus Herden mit Hautkarzinomatose stammten.

Die Auswertung zeigte, daß im Blut der fünf Wochen alten Tiere keine spezifischen Antikörper gegen die ALV-Untergruppen A, B und J sowie gegen Retikuloendothelioseviren nachweisbar waren. Dies könnte zum einen auf das geringe Schlachtalter dieser Hühner zurückzuführen sein. Zum anderen ist auch eine vertikale Virusinfektion dieser Tiere nicht ausgeschlossen.

Obwohl diese Untersuchungen vornehmlich orientierenden Charakter besaßen und durch gezielte Untersuchungen weitergeführt werden sollten, deutet der elektronenmikroskopische Nachweis von retrovirusähnlichen Partikeln innerhalb der Tumorzellen auf eine mögliche infektiöse Ätiologie dieser Geschwulsterkrankung hin.

Von zahlreichen Wissenschaftlern wurde eine deutliche Zunahme der Hautkarzinomatoseprävalenz in den Wintermonaten beobachtet (TURNQUEST 1979, HAFNER et al. 1991, WEINSTOCK et al. 1995). Ähnlich wie der Mensch, so weisen auch Tiere im Winter vermehrt Infektionserkrankungen auf, was ebenfalls für eine infektiöse Genese dieser Geschwulst spricht.

BERGMANN et al. (1995) ermittelten, daß der Anstieg an Hautkarzinomatose erkrankter Hühner 1991 mit einer deutlichen Zunahme der Verwurfsrate insgesamt einherging. Neben Serosen- und Luftsackentzündungen wiesen die Tiere verstärkt Hauterkrankungen wie phlegmonöse Dermatis und Schorfigkeit auf. Auch HAFNER et al. (1991) ermittelten einen deutlichen Anstieg der Hautkarzinomatoseprävalenz in Verbindung mit Luftsackentzündungen. Dies deutet auf einen erhöhten Infektionsdruck in den Aufzuchtbetrieben hin, der die Entstehung dieser Geschwulsterkrankung begünstigt haben könnte.

In den Untersuchungen von HAFNER et al. (1991) zeigten die Hühner ab dem 48. Lebensstag eine deutliche Verringerung der Tumorprävalenz. Mit diesem Alter erlangen die Tiere ihre immunologische Kompetenz (VON DEM HAGEN und LÖLIGER 1972). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Hautkarzinomatose bevorzugt von Hühnern gebildet wird, die noch keine voll ausgebildete Immunabwehr besitzen.

GOOD (1991) beobachtete ein vermehrtes Auftreten der Hautkarzinomatose bei Jungmasthühnern aus staubigen Ställen. Dies spricht dafür, daß schlechte Haltungsbedingungen die Entstehung der Hautkarzinomatose begünstigen. Obwohl auch Probleme in der Fütterung und im Herdenmanagement von Jungmasthühnern vermutet werden, liegen hierfür bislang keine Nachweise vor (BERGMANN 1995, WEINSTOCK et al. 1995).

Aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen zur Ätiologie lassen sich folgende Schlußfolgerungen ableiten:

- Ätiologisch scheint die Hautkarzinomatose aus Dyskeratosen des Federfollikelepithels hervorzugehen. Aus diesem Grund sind nähere Analysen des Federwechsels und der Dyskeratosenausbildung erforderlich.
- Die Untersuchungen zur infektiösen Genese dieser Geschwulsterkrankung sollten fortgeführt werden, wobei einer ätiologischen Bedeutung von ALV nachzugehen ist. Dies könnte u. a. durch eine Feststellung von Virus-Genomsequenzen mit Hilfe der PCR im hyperplastisch proliferiertem Federfollikelepithel erfolgen. In diesem Zusammenhang wären weiterhin Aspekte der Immunabwehr bei Jungmasthühnern von Interesse.