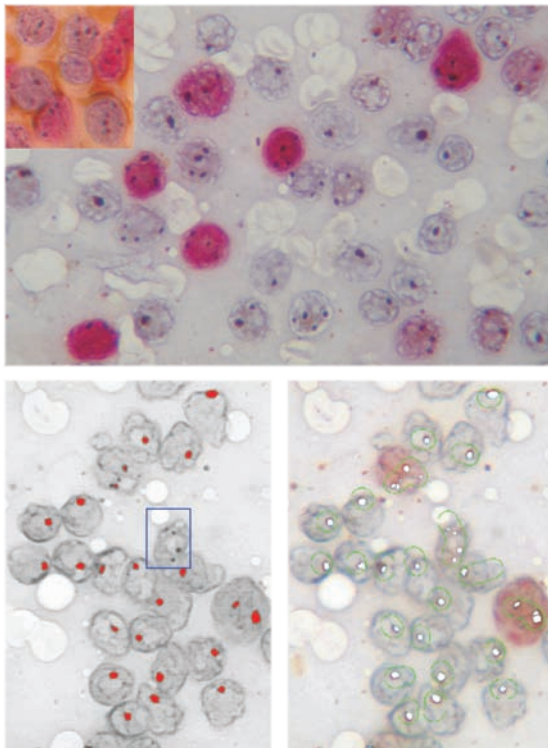


# Die Bedeutung der Proliferationsmarker AgNOR und Ki-67 zur Diagnose des kaninen Lymphoms

DANIELA ZERVOS



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere,  
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Moritz

## **Die Bedeutung der Proliferationsmarker AgNOR und Ki-67 zur Diagnose des kaninen Lymphoms**

### **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Daniela Zervos**

Tierärztin aus Linnich

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. A. Moritz  
Prof. Dr. M. Reinacher

Tag der Disputation: 15.06.2011

Meinen Eltern



1	EINLEITUNG .....	1
2	LITERATURÜBERSICHT .....	3
2.1	Die zytologische Untersuchung von kaninen Feinnadelaspiraten (FNAs) ....	3
2.1.1	Die diagnostische Bedeutung der zytologischen Untersuchung von FNAs in der Veterinärmedizin.....	3
2.1.2	Die Vorteile der Feinnadelaspiration .....	3
2.1.3	Die Indikation der zytologischen Untersuchung von Lymphknoten-FNAs	4
2.1.4	Die Gewinnung der FNAs aus Lymphknoten .....	5
2.1.5	Die Anfertigung der Ausstriche.....	6
2.1.6	Die diagnostischen Grenzen der May- Grünwald/ Giemsa- Färbung ....	8
2.1.7	Die zytologischen Beurteilungskriterien zur Diagnosestellung der Lymphadenopathien kaniner FNAs .....	9
2.2	Die Proliferationsmarker .....	11
2.2.1	Die wichtigsten Proliferationsmarker .....	12
2.2.2	Die Bedeutung des Proliferationsmarkers AgNOR (Argyrophile Nukleolus organisierende Regionen).....	13
2.2.3	Der Proliferationsmarker AgNOR .....	17
2.2.4	Der Proliferationsmarker Ki-67 .....	22
2.2.5	Die Einflüsse einer medikamentellen Vorbehandlung auf das Proliferationsverhalten bei Hunden mit Lymphomen .....	27
2.3	Klassifizierungsschemata und Prognose bei kaninen Lymphomen.....	28
2.3.1	Klassifizierungsschemata von Lymphomen und ihre Bedeutung für die Prognose von Lymphomen.....	28
2.3.2	B- bzw. T- Zell- Differenzierung von kaninen Lymphomen.....	32

2.3.3	Die Bedeutung der B- bzw. T- Zell- Differenzierung als prognostischer Parameter.....	34
2.3.4	Proliferationsmarker als prognostischer Parameter .....	34
2.4	Die Vorteile einer Doppelfärbung von AgNORs und Ki-67 .....	39
2.4.1	Die Bedeutung der Doppelfärbung von AgNORs und Ki-67 bei histologischen Präparaten in der Humanmedizin .....	39
2.4.2	Die tatsächliche Doppelfärbung von AgNORs und Ki-67 .....	40
3	MATERIAL UND METHODEN .....	45
3.1	Eigene Untersuchungen.....	45
3.2	Patientengut .....	45
3.3	Die klinische Untersuchung der Patienten.....	46
3.4	Geräte .....	47
3.5	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	48
3.5.1	Übersichtsfärbung für zytologische Diagnostik.....	48
3.5.2	AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung, sowie B- und T- Zell- Differenzierung.	48
3.6	Methodik.....	50
3.6.1	Etablierung der Methodik für die AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung .....	50
3.6.2	Beschreibung des Färbeverfahrens für die AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung .....	54
3.6.3	Konservierung der AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung.....	57
3.6.4	Etablierung der Methodik für die B- bzw. T- Zell- Differenzierung .....	58
3.6.5	Beschreibung des Färbeverfahrens für die B- bzw. T- Zell- Differenzierung .....	61
3.6.6	Beschreibung der Auswertung der AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung.....	62
3.7	Einteilung der Patienten in Gruppen (Patientenklassifizierung).....	66



3.7.1	Einteilung der Lymphompatienten.....	66
3.8	Statistische Auswertung .....	67
4	ERGEBNISSE .....	69
4.1	Die Ergebnisse der zytologischen Diagnosefindung der kaninen Lymphknoten- FNAs .....	69
4.2	Die Ergebnisse der Proliferationsmarker in FNAs kaniner Lymphknoten ...	70
4.2.1	Die Überprüfung der Korrelation der Proliferationsmarker untereinander 72	
4.3	Die Bedeutung der Proliferationsmarker für die Lymphomdiagnostik bei Hunden .....	74
5	DISKUSSION .....	78
5.1	Faktoren mit Einfluss auf Proliferationsmarker .....	79
5.1.1	Färbefaktoren .....	79
5.1.2	Zählmethode .....	81
5.1.3	Zellzahl.....	83
5.2	Die AgNOR Anzahl.....	84
5.3	Die 3 Proliferationsmarker .....	85
5.4	B- bzw. T- Zell- Differenzierung.....	89
5.5	Hunde mit Lymphomen von niedrigem bzw. hohem Malignitätsgrad .....	91
5.6	Die Receiver operating characteristic (ROC) Analyse.....	94
5.7	positive und negative prädiktive Werte.....	95
5.8	Grenzen .....	97
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	98
7	SUMMARY .....	100
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	102

9	DANKSAGUNG.....	120
---	-----------------	-----

### Im Text verwendete Abkürzungen

AgNORs	Argyrophile Nukleolus organisierende Regionen
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische- Phosphatase
APAAP	Alkalische- Phosphatase- Anti- Alkalische- Phosphatase
u. a.	unter anderem
AUC	Fläche unter den Kurven/ Area under the curve
BudR	Bromodeoxyuridin
°C	Grad Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Durchschnittl.	Durchschnittlich
FeLV	felines Leukosevirus
FIV	felines Immundefizienzvirus
FNA	Feinnadelaspirat
g	Gramm
Kap.	Kapitel
Lymphad.	Lymphadenitis
M	molar
MGG	May- Grünwald/ Giemsa
Min	Minute
ml	Milliliter
MW	arithmetisches Mittelwert
NCI	National Cancer Institute
NHL	Non- Hodgkin Lymphom
NORs	Nukleolus organisierende Regionen
NPW	negativer prädiktiver Wert
obB	ohne besonderen Befund
PCNA	Proliferationsantigen/ Proliferating Cell Nuclear Antigen
PPW	positiver prädiktiver Wert
proz.	Prozentual
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure

## Abkürzungsverzeichnis

---

Reakt. H.	reaktive Hyperplasie
RNA	Ribonukleinsäure
ROC Kurve	Receiver operating characteristic Kurve
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
Sens.	Sensitivität
Spez.	Spezifität
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris buffered saline, Verdünnungs- und Puffersubstanz
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation/ World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

## 1 EINLEITUNG

Die Entnahme von Feinnadelaspiraten (FNAs) wird in der Veterinärmedizin aufgrund der einfachen und schnellen Anwendung insbesondere zur Beurteilung von Neoplasien in der Routinediagnostik angewandt und stellt das Diagnostikum der ersten Wahl dar (MORITZ und BAUER, 2001). Das Ziel der zytologischen Untersuchung ist es, tumorös verändertes Gewebe von hyperplastischen und entzündlichen Veränderungen zu differenzieren (MORITZ und BAUER, 2001). Dies bereitet jedoch selbst erfahrenen Untersuchern zeitweise Schwierigkeiten, weshalb in der Humanmedizin insbesondere bei pathologisch- histologischen Untersuchungen weitere Parameter zur Diagnosestellung eingeführt wurden, die das Proliferationsverhalten von Geweben beschreiben. Argyrophile Nukleolus organisierende Regionen (AgNORs) wurden in der Tumorpathologie sowohl zu diagnostischen als auch zu prognostischen Zwecken angewandt (DERENZINI, 2000). Während die quantitative Bestimmung der AgNORs als einziger Proliferationsmarker eine Auskunft über die Kinetik der Zellproliferation ermöglicht (DERENZINI, 2000), ergänzt die quantitative Ki-67 Bestimmung diese durch die Bestimmung des Prozentsatzes proliferierender Zellen eines Gewebes (Wachstumsfraktion) (BROWN DC und GATTER KC, 1990a). In der vorliegenden Studie sollen diese beiden Proliferationsmarker Verwendung finden, da sie sehr gut korrelieren (HALL et al., 1988a) und sich in ihren Aussagen bezüglich der Tumorproliferation ergänzen (KIUPEL, 1999).

Bis jetzt wurden mittels zytologischer und histologischer Untersuchung entweder AgNORs (BRATULIC et al., 1996; HUNG et al., 2000; KIUPEL, 1999; KRAVIS et al., 1996; VAJDOVICH et al., 2004) oder Ki-67 (BROWN DC und GATTER KC, 1990b; RISHI et al., 1993; SCHWARTZ et al., 1989) in Lymphgeweben des Hundes bzw. humanen Non- Hodgkin Lymphomen (NHL) untersucht. VAJDOVICH et al. zeigten 2004 bei 26 kaninen Lymphknotenaspiraten, dass eine zytologische Unterscheidung von Lymphom- und Nicht- Lymphompatienten anhand der AgNOR Anzahl möglich ist (VAJDOVICH et al., 2004), jedoch war die „Kontrollgruppe“ in der Studie sehr klein (n=10) und bestand überwiegend aus Hunden mit reaktiver Hyperplasie (n=4), Lymphadenitis (n=4) und nur 2 Hunden mit unveränderten Lymphknoten. KIUPEL untersuchte 1999 die prognostische Anwendung der Proliferationsmarker Ki-67 und

AgNORs bei formalinfixierten Lymphknotenbiopsaten von Hunden, ohne jedoch auf die diagnostischen Möglichkeiten einzugehen (KIUPEL, 1999).

Das Ziel dieser prospektiven Studie war die Etablierung einer standardisierten AgNOR- und Ki-67- Doppelfärbung zur Charakterisierung des Proliferationsverhaltens von kaninen Lymphomen im Vergleich zu Hunden mit physiologischem Lymphknoten, reaktiver Hyperplasie und Lymphadenitis. Die AgNOR Färbung und Auswertung sollte hierbei den Richtlinien des *International Committee on AgNOR Quantitation* (AUBELE et al., 1994; OFNER et al., 1995), das ein standardisiertes Färbeprotokoll für die Silberfärbung vorgibt und die Verwendung einer automatischen Bildanalyse- Software zur Auswertung der AgNORs empfiehlt, entsprechen. Des Weiteren sollte die bereits von VAJDOVICH et al. (2004) untersuchte durchschnittliche AgNOR Anzahl mit der durchschnittlichen AgNOR Fläche und der prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen in FNAs kaniner Lymphknoten verglichen werden. Zusätzlich war von Interesse, ob die Proliferationsmarker AgNOR und Ki-67 als Screeningparameter zur Feststellung eines Lymphoms geeignet sind und somit eine Hilfestellung bei der Diagnose eines kaninen Lymphoms geben können.

## **2 LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Die zytologische Untersuchung von Kaninen**

#### **Feinnadelaspiraten (FNAs)**

##### **2.1.1 Die diagnostische Bedeutung der zytologischen Untersuchung von FNAs in der Veterinärmedizin**

Die zytologische Untersuchung von FNAs aus den unterschiedlichsten Organen, Umfangsvermehrungen und Flüssigkeiten aus Körperhöhlen erlangt in der Veterinärmedizin - wie zuvor in der Humanmedizin (BETSILL und HAJDU, 1980) - insbesondere in der Tumordiagnostik zunehmend an Bedeutung. Im Gegensatz zu Biopaten für pathologisch-histologische Untersuchungen, bei denen Gewebeverbände entnommen und die gesamte Gewebestruktur untersucht wird, erfolgt zur zytologischen Untersuchung der Ausstrich eines durch Feinnadelaspiration gewonnenen Punktes auf einen Objektträger (MISCHKE, 2005b; MORITZ und BAUER, 2001). Hierdurch ist eine gute Einzelzellbeurteilung allerdings unter Verlust der Gewebestruktur möglich (MISCHKE, 2005b; MORITZ und BAUER, 2001). Eine Studie an Hunden und Katzen mit Karzinomen, Sarkomen und Mastzelltumoren belegte, dass die Diagnose von Lymphknotenmetastasen mittels FNAs der regionalen Lymphknoten eine sensitive und spezifische Methode darstellt, die mit den Ergebnissen von histologischen Untersuchungen des gesamten Lymphknotens korrelierte (LANGENBACH et al., 2001).

Die zytologische Diagnostik ist als wesentliches, weiterführendes Untersuchungsverfahren anerkannt und ist in vielen Praxen ein unverzichtbarer Bestandteil der täglichen Diagnostik geworden (MISCHKE, 2005b).

##### **2.1.2 Die Vorteile der Feinnadelaspiration**

Mit nur geringen instrumentellen Voraussetzungen kann aus den meisten Läsionen repräsentatives Probenmaterial gewonnen und ein Präparat für die zytologische Diagnostik hergestellt werden (MISCHKE, 2005b). Die Entnahme von FNAs

insbesondere aus Lymphknoten stellt eine schnelle, gut wiederholbare, kaum schmerzhaft und minimal invasive, einfache Technik dar, für die nur geringe Mengen an Untersuchungsmaterial benötigt werden. Weiterhin ist diese Methode ohne großen Kosten- und Zeitaufwand durchführbar und eine Narkose ist hierfür nicht erforderlich. Somit ist die zytologische Untersuchung in jeder Praxis mit Minimalaufwand anzuwenden und stellt ein risikoarmes und schonendes Verfahren dar, weshalb sie als Diagnostikum der ersten Wahl angesehen wird (MORITZ und BAUER, 2001).

### **2.1.3 Die Indikation der zytologischen Untersuchung von Lymphknoten- FNAs**

Zytologische Techniken sind besonders dann indiziert, wenn schon anhand der Beurteilung einzelner Zellen eine (relativ) sichere Aussage getroffen werden kann (MORITZ und BAUER, 2001). Deshalb sind sie zum Beispiel für die Diagnostik von hämatopoetischen Tumoren, d.h. von Leukosen, gut geeignet (MORITZ und BAUER, 2001). Die häufigste Form der lymphatischen Leukose beim Hund ist das Lymphom (Lymphosarkomatose), bei der es zur Ausbildung solider Tumoren vor allem der Lymphknoten kommt (MORITZ und BAUER, 2001). Der häufigste klinische Befund kaniner Lymphome ist neben einer Reihe von unspezifischen Symptomen eine periphere Lymphadenomegalie, die meist generalisiert auftritt, aber auch lokal einzelne Lymphknoten betreffen kann (OGILVIE und ANTONY, 1994). Eine Lymphknotenzytologie ist generell nicht hilfreich, wenn keine Lymphknotenvergrößerung vorliegt, andererseits indiziert und rechtfertigt jede Vergrößerung eines Lymphknotens die Entnahme von FNAs (MEINKOTH et al., 2008). Durch die zytologische Untersuchung von Lymphknoten- FNAs wird eine Differenzierung von Lymphompatienten gegenüber Hunden mit physiologischem Lymphknoten, reaktiver Hyperplasie oder Lymphadenitis ermöglicht. Die Unterscheidungskriterien hierfür werden an einer späteren Stelle genauer erläutert (s. Kap. 2.1.7.). Neben der Feststellung der Art des Tumors und den damit verbundenen diagnostischen Möglichkeiten können FNAs auch zur genaueren Einschätzung des Metastasierungsgrades (Grading) entnommen werden (MORITZ und BAUER, 2001) und somit zur Unterstützung von Prognose und Therapie von Neoplasien beitragen (OGILVIE und ANTONY, 1994). Der Ausbreitungsgrad des Tumors, charakterisiert



durch das sogenannte klinische Staging (CULMSEE, 2002), wird anhand einer klinischen Stadieneinteilung (Tab.1) des von der Weltgesundheitsordnung (World Health Organization/ WHO) aufgestellten Klassifizierungsschemas vorgenommen (OWEN, 1980). Das klinische Staging, beinhaltend insbesondere das Blut, Knochenmark und/ oder verschiedene Organe (Stage V), hat prognostische Bedeutung für die Rezidivrate sowie die vollständige Remission und Überlebenszeit von Lymphompatienten (TESKE et al., 1994a).

**Tabelle 1: Stadieneinteilung der WHO beim multizentrischen Lymphom (Owen, 1980)**

Stadium	Betroffene Strukturen
I	Ein Lymphknoten oder lymphatisches Gewebe eines Organs (außer Knochenmark)
II	mehrere Lymphknoten einer Region betroffen (+/- Tonsillen)
III	generalisierte Lymphknotenvergrößerung
IV	Leber oder Milz betroffen (+/- Stadium III)
V	Blut und Knochenmark und/ oder andere Organsysteme betroffen (+/- Stadium I- IV)

Jedes Stadium wird in Substadien unterteilt:

- (a) ohne klinische Symptome
- (b) mit klinischen Symptomen

Die Feinnadelaspiration ist die häufigste Methode zur Gewinnung von Probenmaterial für die zytologische Diagnostik und gleichzeitig auch die aussagekräftigste Methode zur Beprobung jedweder „Masse“ oder proliferativen Läsion (MISCHKE, 2005d). Die für eine Beprobung mit dieser Technik besonders geeigneten Gewebe sind neben Haut und Unterhaut die tiefen und oberflächlichen Lymphknoten (MISCHKE, 2005d).

#### **2.1.4 Die Gewinnung der FNAs aus Lymphknoten**

Zellen für die zytologische Diagnostik können von zahlreichen Materialien mit unterschiedlichen Methoden gewonnen und daraus Präparate angefertigt werden

(MISCHKE, 2005d). Zwei Techniken der Feinnadelpunktion werden derzeit unterschieden, die Aspirationstechnik (ohne Bewegung der Kanüle) und die Technik ohne Aspiration (MEINKOTH und COWELL, 2008; MISCHKE, 2005d). Bei der Standard-Aspirationstechnik wird durch Zurückziehen des Spritzenstempels ein Unterdruck in einer Spritze erzeugt, so dass die zu gewinnende Probe in die Nadel gesogen wird (MEINKOTH und COWELL, 2008; MISCHKE, 2005d). Bei der Nicht-Aspirationstechnik werden die zu gewinnenden Zellen mit der Nadel durch schnelles Vor- und Zurückziehen ausgestanzt, was den Vorteil hat, dass die Blutkontamination geringer als bei der Aspirationstechnik ist (MEINKOTH und COWELL, 2008; MISCHKE, 2005d). Um ein möglichst repräsentatives Bild der Lymphknotenzellpopulation zu erhalten, sollte die Feinnadelaspiration in mehrere Richtungen und in unterschiedlichen Tiefengraden vorgenommen (FOURNEL-FLEURY et al., 1994b), sowie ein Minimum von vier bis sechs Ausstriche pro Entnahmeorgan und Patient angefertigt werden (MEINKOTH und COWELL, 2008). FNAs des Mandibular- bzw. Mesenteriallymphknotens sind häufig aufgrund ihres Einzugsgebietes von Kopfbereich inklusive Mundhöhle bzw. Darm und der damit verbundenen konstanten Exposition Antikörpern gegenüber vergrößert und reaktiv, weshalb sie nach Möglichkeit gemieden werden sollten (BAKER und LUMSDEN, 2000b; RASKIN und MEYER, 2009). Die jeweils bevorzugte Technik zur Probengewinnung sowie zur Präparateherstellung hängt neben der anatomischen Lokalisation der Läsion, der Art und den Charakteristika des Gewebes und dem Patienten (insbesondere Umgänglichkeit) nicht zuletzt von der Vorliebe des Untersuchers ab (MISCHKE, 2005d).

### **2.1.5 Die Anfertigung der Ausstriche**

Die Zellen für die zytologische Diagnostik werden nach der Gewinnung unverzüglich auf Objektträger überführt. Dabei wird die von der Kanüle abgesetzte Spritze mit mindestens 3- 5 ml Luft gefüllt, anschließend wieder auf die Spritze aufgesetzt und der Kanüleninhalt durch „Ausblasen“ auf den Objektträger verbracht. Anschließend wird das Material sachgerecht verteilt (MISCHKE, 2005d), wobei unterschiedliche Ausstrichtechniken in der zytologischen Untersuchung angewandt werden können (MEINKOTH und COWELL, 2008). Ziel hierbei ist es, einen dünnen Ausstrich mit

guter Zellverteilung in Einzellagen ohne zerstörte Zellen anzufertigen, sowie einen limitierten Auszug von Material zu erhalten, das dem Ausgangsmaterial so repräsentativ wie möglich entspricht (FOURNEL- FLEURY et al., 1994a).

Die verschiedenen Ausstrichtechniken werden differenziert in Auseinanderzieh-technik („Quetschtechnik“= „Squash Preparation“), Blutausstrichtechnik und einer „Verteilung der Zellen mit spitzem Gegenstand“ (MEINKOTH und COWELL, 2008; MISCHKE, 2005d). Zur Gewinnung von Präparaten mit der Auseinanderziehtechnik wird durch vorsichtiges Gegeneinanderziehen zweier Objektträger gegebenenfalls unter leichter Druckausübung das gewonnene Untersuchungsmaterial ausgestrichen (MEINKOTH und COWELL, 2008; MISCHKE, 2005d). Lymphknotenaspirate weisen meist genug Gewebeflüssigkeit oder Blutbeimengungen auf, so dass zur Anfertigung der Ausstriche auch die Blutausstrichtechnik Anwendung finden kann (MEINKOTH und COWELL, 2008; MISCHKE, 2005d). Hierbei wird der Ausstrichobjektträger in einem 30- 45 Grad Winkel auf den mit einer Probenflüssigkeit versehenen unteren Objektträger aufgesetzt und auf die Auftragsstelle zubewegt. Nach Kontakt des Ausstrichobjektträgers mit der Probenflüssigkeit breitet sich diese durch Adhäsion hinter den Rand des Ausstrichobjektträgers aus und wird dann durch eine schnelle, aber gleichmäßige Vorwärtsbewegung des Objektträgers ausgestrichen (MEINKOTH und COWELL, 2008; MISCHKE, 2005d). Bei einer „Verteilung der Zellen mit spitzem Gegenstand“ wird die mit Probenmaterial angefüllte Nadel senkrecht zum Objektträger ausgespritzt und das Material mit einer Nadel sternförmig ausgezogen. Bei dieser Technik verbleibt allerdings meistens viel Gewebeflüssigkeit um die Zellen, wodurch ihre Ausbreitung unmöglich wird. Die so entstandenen dickeren Ausstriche sind aufgrund der fehlenden Zellverteilung in Einzellagen zur zytologischen Untersuchung von FNAs jedoch weniger geeignet (MEINKOTH und COWELL, 2008; MISCHKE, 2005d).

Geschicklichkeit und praktische Erfahrung sind die wichtigsten Voraussetzungen für die konstante Anfertigung diagnostisch aussagekräftiger FNAs. Die jeweils optimale Technik hängt von den Eigenschaften des Gewebes und naheliegenderweise auch hier von der Vorliebe des Untersuchers ab (MISCHKE, 2005d).

### **2.1.6 Die diagnostischen Grenzen der May- Grünwald/ Giemsa- Färbung**

Sobald die angefertigten Ausstriche auf dem Objektträger luftgetrocknet sind, kann die Anfärbung der FNAs zur diagnostischen Beurteilung beginnen. Die Färbung der Ausstriche erfolgt routinemäßig nach May- Grünwald/ Giemsa (Pappenheim), die standardisierte zytologische Färbung für die Hämatologie (FOURNEL- FLEURY et al., 1994b). Unter den konventionellen Färbetechniken vom Romanowsky- Typ ist diese Färbung, eine Kombination von Giemsa- und May- Grünwald- Lösung, in Deutschland am weitesten verbreitet (MISCHKE, 2005e). Die Färbung des Romanowsky- Typs wird bei luftgetrockneten Lymphknotenpräparaten bevorzugt (BAKER und LUMSDEN, 2000b), erlaubt eine in der Regel gute Beurteilung des Ausstrichs (MORITZ und BAUER, 2001) und ist einfach und preiswert in der Praxis anzuwenden (MEINKOTH und COWELL, 2008; MISCHKE, 2005d; MORITZ und BAUER, 2001).

Die Fixations- und Färbemethoden, insbesondere auch die Färbungen des Romanowsky- Typs, begünstigen jedoch merklich eine Artefaktbildung im Zusammenhang mit der Kernchromatinstruktur, d.h. sie wird weniger deutlich und charakteristisch dargestellt als die Form, Farbe und Größe von Zellkern und Zytoplasma (BAKER und LUMSDEN, 2000a). Charakteristische Chromatinstrukturen und die Chromatindichte können bei einer Entscheidungsfindung bezüglich der Beurteilung der Dignität des Gewebes unterstützend mitwirken (BAKER und LUMSDEN, 2000a). Generell gesagt, steigt mit zunehmender Grobkörnigkeit der Chromatinstruktur das Malignitätspotential an (TYLER et al., 1999).

Die Grenzen der zytologischen Diagnostik sind jedoch nicht ausschließlich in den Fixations- und Färbemethoden zu sehen, sondern auch in den zytologischen Beurteilungskriterien zur Unterscheidung der jeweiligen Lymphadenopathien zu suchen.

## **2.1.7 Die zytologischen Beurteilungskriterien zur Diagnosestellung der Lymphadenopathien kaniner FNAs**

Die zytologische Diagnosestellung von Ausstrichen lymphatischer FNAs unterscheidet neben dem physiologischen Lymphknoten drei generelle Prozesse, die eine Lymphknotenvergrößerung des Hundes verursachen können (MESSICK, 2008), die Lymphadenitis, die reaktive Hyperplasie und Neoplasien (ein Lymphom oder Metastasen). Diese werden im Folgenden kurz erläutert.

Liegt keine Lymphknotenvergrößerung vor, ist eine Lymphknotenzytologie generell nicht hilfreich, andererseits indiziert und rechtfertigt jede Vergrößerung eines Lymphknotens die Entnahme von FNAs (MEINKOTH et al., 2008).

Je nach zugrunde liegender Ursache kann eine einzelne oder multiple bis generalisierte Lymphknotenvergrößerung vorliegen (BAKER und LUMSDEN, 2000b).

Nachdem sich der Untersucher einen Überblick über die Qualität des auszuwertenden Präparates in bezug auf Zellgehalt und Unversehrtheit der Zellen, sowie der Qualität der Färbung hinsichtlich Intensität und Gleichmäßigkeit verschafft hat (MISCHKE, 2005e), kann die diagnostische Beurteilung der Zusammensetzung der vielzähligen unterschiedlichen Zellen erfolgen. Abhängig von der jeweiligen Lymphadenopathie liegt eine andere Gewichtung der dominierenden Zellpopulationen vor (MISCHKE, 2005c).

### **2.1.7.1 Der physiologische Lymphknoten und sein zytologischer Normalbefund**

Die Zellpopulation eines physiologischen Lymphknotens setzt sich aus einer überwiegenden Anzahl kleiner und auch mittlerer Lymphozyten (75- 95% der Gesamtzellzahl) zusammen (MESSICK, 2008).

Die übrigen Zellen sind lymphatische Blasten (< 10- 15%), Plasmazellen (< 3%) und in geringerer Anzahl auch Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie vereinzelt Mastzellen (MESSICK, 2008; MISCHKE, 2005a).

### **2.1.7.2 Die Lymphadenitis bei Lymphknoten- FNAs**

Charakteristisch für einen Entzündungsvorgang ist eine erhöhte Anzahl Granulozyten. Liegen mehr als fünf (bis zehn) Prozent neutrophile Granulozyten und mehr als drei Prozent eosinophile Granulozyten vor, handelt es sich um eine purulente beziehungsweise eosinophile Lymphadenitis (MESSICK, 2008). Finden sich weiterhin Makrophagen oder Bakterien neben lymphatischen Blasten, Plasmazellen und Immunblasten, wird das Bild abgerundet (MESSICK, 2008). Unter Beteiligung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Plasmazellen liegt eine gemischtzellige Entzündung vor (MESSICK, 2008).

### **2.1.7.3 Die reaktive Hyperplasie bei Lymphknoten- FNAs**

Zwischen dem zytologischen Bild eines physiologischen und hyperplastischen Lymphknotens besteht ein fließender Übergang (MISCHKE, 2005a) und folglich kann das zytologische Bild einer reaktiven Hyperplasie von der eines physiologischen Lymphknotens unter Umständen nicht zu unterscheiden sein (BAKER und LUMSDEN, 2000b). Hier hilft das Hinzuziehen des klinischen Bildes, denn ein Hund mit reaktiver Hyperplasie hat vergrößerte Lymphknoten (MESSICK, 2008). Häufig dominieren ebenfalls kleine reife Lymphozyten die Zellpopulation des reaktiv- hyperplastischen Lymphknotens (MESSICK, 2008; MISCHKE, 2005a). Bei deutlicher Hyperplasie zeigen sich typischerweise auch vermehrt andere lymphatische Zellen in verschiedenen Reifungsstadien (MISCHKE, 2005a), wie Plasmazellen (> 5- 10%), lymphatische Blasten (bis 15- 25% oder mehr), unreife Plasmazellen oder transformierte Lymphozyten und auch Makrophagen (> 2%) können vorgefunden werden (MESSICK, 2008; MISCHKE, 2005a). Es liegt also ein gemischtes „Zellbild“ mit einem höheren Anteil an mittelgroßen und großen lymphatischen Zellen vor (MISCHKE, 2005a).

Schwieriger ist die Unterscheidung einer reaktiven Hyperplasie von einem Lymphom im Anfangsstadium (MORITZ und BAUER, 2001).

### **2.1.7.4 Die Lymphknotenneoplasie/ das Lymphom bei Lymphknoten- FNAs**

Zytologische Präparate von Lymphomen zeigen charakteristischer Weise das Vorhandensein von mehr als fünfzig Prozent lymphatischer Blasten gemessen an der

Zellpopulation (MESSICK, 2008; MISCHKE, 2005a). Andererseits schließt ein deutlich niedrigerer Prozentsatz lymphatischer Blasten ein Lymphom nicht aus, denn es könnte genauso gut ein Lymphom im Frühstadium, sowie ein frühes Stadium einer Hyperplasie vorliegen (MISCHKE, 2005a). Blastenanteile von regelmäßig mehr als 80% erlauben eine eindeutige Diagnose des Lymphompatientens (MISCHKE, 2005a).

Eine weitere Schwierigkeit bei der Diagnosestellung ergibt sich bei gut differenzierten Lymphomen („low grade lymphoma“), die nicht auf blastären Zellen, sondern vielmehr einer Proliferation kleiner reifer Lymphozyten beruhen (MISCHKE, 2005a). Aufgrund des hohen Differenzierungsgrades der neoplastischen lymphatischen Zellen sind zytologische Präparate derart veränderter Lymphknoten auch im fortgeschrittenen Stadium nicht immer eindeutig von dem zytologischen Bild des physiologischen bzw. hyperplastischen Lymphknotens abzugrenzen (MISCHKE, 2005a). Die Diagnosesicherung dieser gut differenzierten Lymphomsubtypen erfordert weiterführende Untersuchungen (MISCHKE, 2005a).

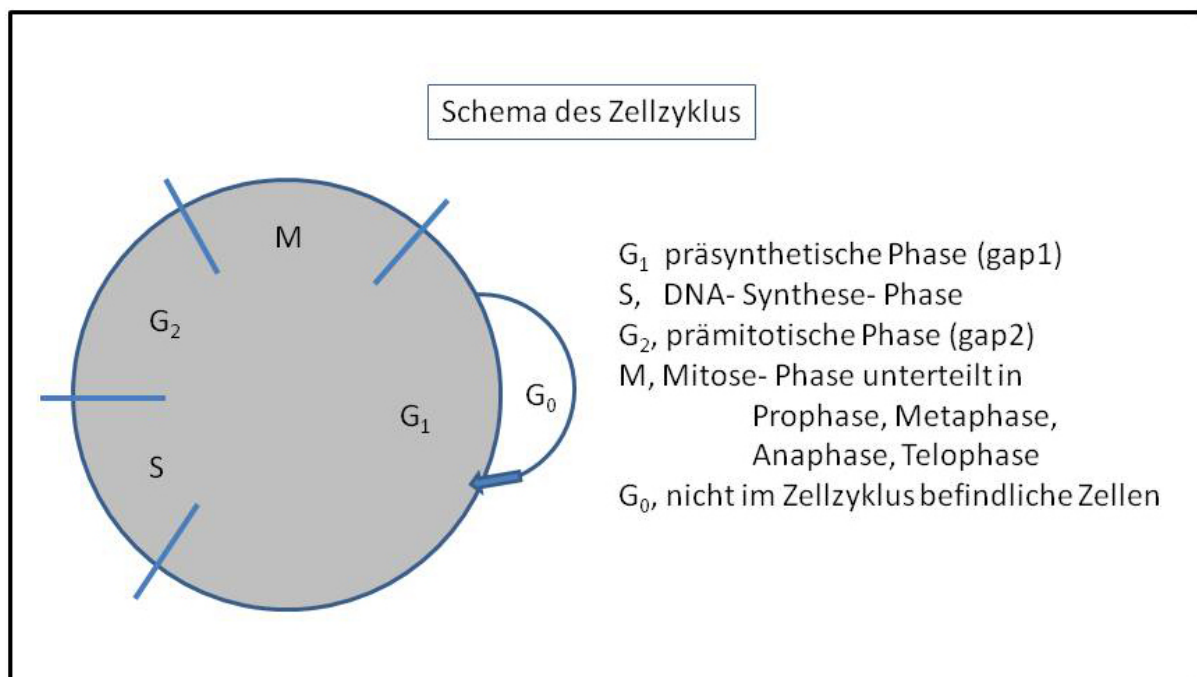
Die Diagnose der Lymphome und Differentialdiagnosen insbesondere zur Unterscheidung von reaktiven Hyperplasien sind die schwierigsten in der Routine der klinischen Pathologie (MESSICK, 2008). In nicht eindeutigen Fällen gilt deshalb immer noch eine Nachuntersuchung oder die histopathologische Untersuchung einer chirurgisch entnommenen Lymphknotenbiopsie als Referenzmethode (MISCHKE, 2005a).

## **2.2 Die Proliferationsmarker**

Da die Unterscheidung zwischen hyperplastischen und neoplastischen Veränderungen selbst für erfahrene Untersucher nicht immer sicher möglich ist, werden in der Human- und Veterinärmedizin insbesondere in der Pathohistologie weitere Parameter, sogenannte Proliferationsmarker, zur Diagnosestellung herangezogen, die das Proliferationsverhalten von Geweben charakterisieren.

### 2.2.1 Die wichtigsten Proliferationsmarker

Es wurden verschiedene Methoden und unterschiedliche Proliferationsmarker zur objektiven Quantifizierung der Proliferationsaktivität eingeführt, die im Folgenden beschrieben werden sollen. Einige Marker, die eine Bestimmung des Prozentsatzes proliferierender Zellen eines Gewebes ermöglichen, werden nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus nachgewiesen.



**Abbildung 1: Die Phasen des Zellzyklus nach BAYHUBER et al. (1989)**

**Tabelle 2: Der Nachweis der Proliferationsmarker in den Zellzyklusphasen**

Zellzyklusphasen	G1	S	G2	M	G0
Proliferationsmarker					
PCNA		X			
Bromodeoxyuridin		X			
Ki-67	X	X	X	X	
AgNORs	X	X	X	X	X

In der S- Phase des Zellzyklus erfolgt die Markierung der Proliferationsmarker PCNA (Proliferating cell nuclear antigen/ Proliferationsantigen) und Bromodeoxyuridin.



PCNA markiert proliferierende Zellen in der Synthese- Phase des Zellzyklus und Zellen, die eine DNA Reparatur durchmachen (BRUGAL, 1994; LÖHR et al., 1997).

Bromodeoxyuridin (BUdR) ist ein Thymidinanalogon, das von proliferierenden Zellen in der S- Phase in die DNA eingebaut wird (QUINN, 1990).

Das Antigen Ki-67 hat ein weitaus breiter gestreutes Wirkungsspektrum und wird im Zellkern aller proliferierenden Zellen nachgewiesen und ist somit in G1, S, G2 und Mitose sichtbar (GERDES et al., 1991).

Der Anteil von Zellen in einer der Phasen an der Gesamtpopulation von Tumorzellen kann demnach durch verschiedene Marker ermittelt werden. Mit dieser Aussage allein läßt sich die Proliferationsaktivität allerdings nicht vollständig 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). Die Proliferationsaktivität einer Neoplasie oder eines Gewebes wird also nicht nur durch die Anzahl der proliferierenden Zellen in einem Zellzyklus definiert, sondern ist ebenso abhängig von der Zyklusdauer (WRIGHT, 1984).

Während die oben beschriebenen Proliferationsmarker die Anzahl der proliferierenden Zellen widerspiegeln, wird keine Aussage über die Proliferationsgeschwindigkeit gemacht. Dies ist aber wichtig, da es Tumoren mit wenigen, aber schnell proliferierenden Zellen gibt und umgekehrt (KIUPEL et al., 1999). So ist zum Beispiel ein Tumor, in dem 80% der Zellen proliferieren und der Zellzyklus einen Monat dauert, aggressiver als eine Neoplasie mit 25% proliferierenden Zellen bei einem Zellzyklus von 2 Monaten (KIUPEL et al., 1999).

### **2.2.2 Die Bedeutung des Proliferationsmarkers AgNOR (Argyrophile Nukleolus organisierende Regionen)**

Die Proliferationsaktivität eines Tumors basiert auf sich im Zyklus befindenden Zellen und äußert sich im Wachstum des Tumors. Der Tumormechanismus wird also durch die Geschwindigkeit des Zellzyklus und der Anzahl sich im Zyklus befindender Zellen (Wachstumsfraktion) bestimmt (KIUPEL, 1999).

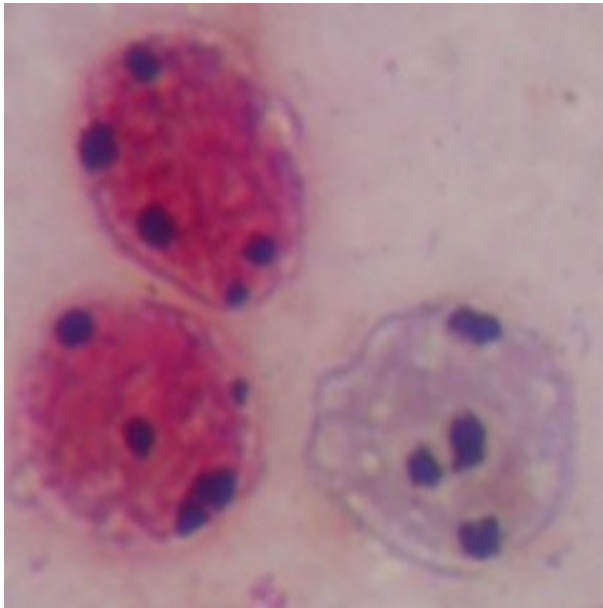
Die quantitative AgNOR Bewertung ist die einzige Methode, die Informationen über die Geschwindigkeit der Zellproliferation bei der Untersuchung von Gewebematerial ermöglicht (LORENZATO, 2000) und durch die somit eine Aussage über die Kinetik der Zellproliferation gewonnen werden kann (DERENZINI, 2000).

NORs (Nukleolus organisierende Regionen) repräsentieren die Windungen der ribosomalen DNA (rDNA), die in den Nukleoli der Zellen in der Interphase vorkommen (MUNAKATA und HENDRICKS, 1993) und für die Transkription in ribosomale RNA (rRNA) verantwortlich sind. Ribosomale RNA Gene werden von der RNA Polymerase I transkribiert (RAVEENDRAN et al., 1994), die zusammen mit anderen NOR assoziierten Proteinen in der Lage ist, Silber zu binden und somit das Resultat Ag (silberfärbende= agyrophilic) NOR formen (LEEK et al., 1991).

Untersuchungen von In- vitro- Zelllinien unterschiedlicher Neoplasien, als auch In- vivo- Versuche bei diversen Tumoren haben gezeigt, dass die AgNOR Menge in der Interphase mit der Zellverdopplungszeit im Verhältnis steht (DERENZINI et al., 1990; DERENZINI und TRERE, 1994). Je schneller das Zellwachstum, desto größer ist die AgNOR Menge in der Interphase (DERENZINI und TRERE, 1994).

### **2.2.2.1 Die Silberfärbung zur Darstellung der AgNORs**

Die Färbemethode der AgNORs fand ihre erste Anwendung in der Histologie bevor sie Einzug in die zytologischen Untersuchungsmethoden hielt (SMITH und CROCKER, 1988). Die Technik, NORs mittels einer Silberfärbung (Ag) nachzuweisen, wurde erstmals 1975 von GOODPASTURE und BLOOM in einem Färbeprotokoll mit 2 Färbeschritten, dem sogenannten Zwei- Phasen- Modell beschrieben (GOODPASTURE und BLOOM, 1975). HOWELL und BLACK entwickelten 1980 daraus eine Ein- Schrittmethode (HOWELL und BLACK, 1980), die letztendlich 1986 von PLOTON und Mitarbeiter modifiziert (PLOTON et al., 1986) und 1993 durch das *International Committee on AgNOR Quantitation* standardisiert wurde (AUBELE et al., 1994). 1995 wurde dieses Färbe- und Auswertprotokoll noch weiter konkretisiert (OFNER et al., 1995).



**Abb. 2: AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung:**  
positiv rot gefärbte Lymphozyten mit schwarzen AgNORs und negativ blau gefärbte Lymphozyten mit schwarzen AgNORs

Mit Hilfe der Silberfärbung werden die AgNORs als schwarze Punkte in den Nukleoli sichtbar (XU und WANG, 1992). Die eigentliche Versilberungsreaktion verläuft in enger Anlehnung an den photographischen Grundprozess in den zwei theoretischen Phasen, der Imprägnierungsphase und der Entwicklungsphase (GOODPASTURE und BLOOM, 1975; TRERE, 2000). Zuerst erfolgt die Imprägnierung des Zellmaterials mit Silbernitrat und nachfolgender spezifischer Bindung der Silberionen an die oben genannten argyrophilen Non- Histon- Proteine. Die Entwicklung des bis jetzt latenten Bildes erfolgt durch Zugabe eines Reduktionsmittels (z.B. Ameisensäure), welches das ionische Silber in atomares Silber überführt und somit zu einem sichtbaren Silberniederschlag führt (GOODPASTURE und BLOOM, 1975; TRERE, 2000). Bei der heute angewandten Ein- Schritt- Methode laufen beide Phasen simultan ab (TRERE, 2000).

#### **2.2.2.2 Die Anwendung und Probleme der Auswertung von AgNORs**

Die Silberfärbung Nukleolus- organisierender Regionen wird in der Tumorpathologie zur Dignitätsdiagnose und Prognoseeinschätzung eingesetzt (RÜSCHOFF et al., 1994). Als ein zentrales Problem der AgNOR Untersuchung wurde die mangelnde Standardisierung am Routinematerial von histologischen Gewebeproben angesehen (RÜSCHOFF et al., 1994). Das Fehlen von standardisierten Färbvorschriften war eine der Ursachen, dass numerische Angaben der AgNOR Anzahl des gleichen

Tumortyps durch unterschiedliche Arbeitsgruppen zu sehr divergierenden Ergebnissen führten und somit nicht vergleichbar waren (TRERE, 1994). Beispielsweise berichten SMITH und CROCKER (SMITH und CROCKER, 1988) und DERVAN et al. (DERVAN et al., 1989) über eine mehr als doppelt so hohe AgNOR Anzahl in histologischen Präparaten von Mammatumoren als RAYMOND und LEONG (RAYMOND und LEONG, 1989). Ähnliche Resultate beschrieb TRERE in einer kleineren Übersicht für Melanome und Zervixtumoren beim Menschen (TRERE, 1994).

Eine mögliche Erklärung für die zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse zwischen einigen Studien, in denen das Proliferationsverhalten der gleichen Neoplasie mittels AgNORs untersucht wurde, sind die Folge von unterschiedlicher Fixation, Präparation und Silberfärbung (insbesondere Färbezeit und -temperatur) (HUFNAGL und GUSKI, 1994; SMITH, 1988), die einen deutlichen Einfluss auf die Größe und Färbung der AgNORs haben.

Zur Erzielung untereinander vergleichbarer und reproduzierbarer Ergebnisse in verschiedenen Laboratorien wurden 1993 vom *International Committee on AgNOR Quantitation* Richtlinien zur AgNOR Quantifizierung erstellt, die ein standardisiertes Färbe- und Auswertprotokoll für zytologische und histologische Präparate festlegten (AUBELE et al., 1994; OFNER et al., 1995).

Bis zum heutigen Zeitpunkt liegen nach Kenntnis der Autorin jedoch keine veterinärmedizinischen Studien über die Anwendung des standardisierten Protokolls der Silberfärbung an zytologischen Präparaten vor. In der Histopathologie hingegen wurde das Färbeprotokoll des *International Committee on AgNOR Quantitation* bei kaninen Mastzelltumoren erfolgreich angewandt (SCASE et al., 2006).

### **2.2.2.3 Die Quantifizierung der AgNORs**

Neben dem Färbeprotokoll hat aber auch die Zählmethode der AgNORs einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis.

Die einfachste Form der Quantifizierung von AgNORs ist die direkte visuelle Zählung der schwarzen AgNOR Punkte pro Nukleus durch den Untersucher am Mikroskop (GIRI et al., 1989b; RÜSCHOFF, 1990). Die Zählung der für das Auge kleinen Einzelpunkte unter dem Lichtmikroskop unterliegt jedoch einem subjektiven Einfluss und führt zu einer schnellen Ermüdung des Untersuchers (GIRI et al., 1989a; GIRI et

al., 1989b). Das größte Problem dieser bei FNAs angewandten Technik beinhaltet die Zusammenlagerung der Zellen zu dreidimensionalen Aggregaten („Clustern“). Das Trennen der zusammengelagerten AgNORs innerhalb der silberbindenden Nukleoli ist jedoch Untersucherabhängig und somit subjektiv, was die reproduzierbare Beurteilung erschwert (GIRI et al., 1989a). Allerdings ist diese Herangehensweise trotz ihrer Zeitaufwendigkeit überaus einfach durchführbar und an keinen großen apparativen Aufwand geknüpft.

Zur Erzielung untereinander vergleichbarer und reproduzierbarer Ergebnisse in verschiedenen Laboratorien ist jedoch das standardisierte Auswertprotokoll des *International Committee on AgNOR Quantitation* (AUBELE et al., 1994; OFNER et al., 1995), das die Verwendung einer automatischen Bildanalyse- Software empfiehlt, einer manuellen Zählung der AgNORs vorzuziehen.

#### **2.2.2.4 Die digitale Bildanalyse der AgNORs**

Die Anwendung der computergestützten digitalen Bildanalyse gilt heute als Methode der Wahl für die AgNOR Analyse in zytologischen und histologischen Verfahren (OFNER et al., 1995; TRERE, 2000).

Die AgNORs verschiedener Zellen unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Anzahl, sondern auch in ihrer Größe, Verteilung und Intensität der Färbung. Letztere Parameter lassen sich natürlich nicht mehr durch das Auge des Untersuchers evaluieren. Die quantitative Auswertung mit Hilfe eines automatischen Bildanalyse-Systems ermöglicht es dem Untersucher, die Zellkerne inklusive der sich darin befindenden AgNORs zu segmentieren, auszumessen und zu zählen, wobei eine hohe Präzision und Reproduzierbarkeit erlangt werden kann (HUFNAGL et al., 1994).

### **2.2.3 Der Proliferationsmarker AgNOR**

Die AgNOR Technik hat sich in den verschiedenen Bereichen der Tumorphistopathologie, insbesondere in der Diagnosefindung - einschließlich der Einteilung in Malignitätsgraden - von Non- Hodgkin Lymphomen (NHL) als brauchbar erwiesen (BOLDY et al., 1989; CROCKER, 1987; CROCKER und EGAN, 1988; MUNAKATA und HENDRICKS, 1993). Sie soll nicht nur helfen, eine Entscheidung in

benigne und maligne Neoplasien zu untermauern, sondern auch maligne Tumore unterschiedlicher Herkunft einzuteilen und die Prognose einiger Tumore zu beurteilen (XIUYUN, 1995; XU und WANG, 1992). In der Regel weisen Lymphome eine größere AgNOR Anzahl bei einer gleichzeitig kleineren AgNOR Fläche und einem kleineren maximalen AgNOR Durchmesser auf als benigne Lymphadenopathien (XU und WANG, 1992). Die Anzahl und die räumliche Verteilung der AgNORs im Zellkern sind eng verbunden mit der rRNA und mit der Genregulation für Zellwachstum und Differenzierung (XIUYUN, 1995).

Wichtige Kriterien für die quantitative Bewertung der AgNORs stellen die AgNOR Anzahl und/ oder Größe dar.

### **2.2.3.1 Die Bedeutung der AgNORs als Proliferationsmarker in der Humanmedizin**

Die Anzahl der AgNORs ist bei Lymphomen im Vergleich zu reaktiven Hyperplasien und entzündlichen Veränderungen bei FNAs humaner Lymphknoten signifikant erhöht, wohingegen die Größe der AgNORs bei FNAs von Lymphom- gegenüber Lymphadenitispatienten signifikant erniedrigt ist (XU und WANG, 1992). Hochmaligne Neoplasien weisen anhand dieser Studie somit eine größere AgNOR Anzahl und eine kleinere AgNOR Fläche auf als solche, die benigne oder weniger maligne sind (XU und WANG, 1992). XIUYUN (1995) bestätigte diese Resultate anhand pathologisch- histologischer Untersuchungen humaner NHL und reaktiver Hyperplasien der Lymphknoten nur in Bezug auf die AgNOR Anzahl, aber nicht auf die AgNOR Fläche, die sich zwischen histologischen Präparaten von Patienten mit reaktiver Hyperplasie und solchen mit NHL von niedrigem Malignitätsgrad nicht signifikant unterschied (XIUYUN, 1995). Signifikante Unterschiede in der AgNOR-Anzahl und -Fläche waren jedoch innerhalb der NHL Gruppe, Lymphome von niedrigem gegenüber hohem Malignitätsgrad, zu finden (CROCKER, 1987; XIUYUN, 1995). Mit Erhöhung des Malignitätsgrades stieg die Anzahl der AgNORs, wohingegen sich die AgNOR Fläche dieser Patienten erniedrigte, d.h. innerhalb der NHL Gruppe korrelierte die AgNOR Anzahl negativ mit der AgNOR Fläche (CROCKER, 1987; XIUYUN, 1995).

Dagegen haben Untersuchungen anderer humanmedizinischer Arbeitsgruppen an formalinfixierten Tumorbiopsaten ergeben, dass mit Ausnahme von Melanokarzi-

men und neoplastischen/ reaktiven Zellen in humanen Thoraxergüssen in pathologisch- histologischen Präparaten maligner Tumoren zwar statistisch gesehen eine deutlich höhere AgNOR Anzahl vorliegt, isolierte Betrachtungen jedoch in 30% der Fälle benigner und maligner Tumoren Überschneidungen der AgNOR Werte aufwiesen (DERENZINI und PLOTON, 1994).

Während die Bedeutung der AgNORs zur Differenzierung von malignen und benignen Prozessen in der Literatur kontrovers diskutiert wird, ist unumstritten, dass die Bewertung der AgNORs zur Beurteilung der Prognose von Tumorerkrankungen hilfreich ist (DERENZINI, 2000).

### **2.2.3.2 Die Bedeutung der AgNORs bei histologischen Präparaten in der Veterinärmedizin**

In der Literatur finden sich zahlreiche Veröffentlichungen über pathologisch-histologische NHL Studien in der Humanmedizin, die die Diagnosefindung und Prognoseeinschätzung der AgNOR Methode untersuchen. Die Anzahl veterinärmedizinischer Studien über AgNOR Untersuchungen bei histologischen Präparaten von Hunden (BRATULIC et al., 1996; ETTINGER et al., 2006; HUNG et al., 2000; KIUPEL et al., 1998b; KIUPEL et al., 1998a; KIUPEL, 1999) und Katzen ist weitaus geringer und wird sehr überschaulich, betrachtet man nur die Veröffentlichungen über Katzen (MOONEY und MAHONY, 1989; RASSNICK et al., 1999; VAIL et al., 1998). Mögliche Ursachen hierfür könnten die Unterschiede zwischen Hunden und Katzen mit Lymphomen bei klinischer Betrachtung der Erkrankung darstellen. In der Regel weisen kanine Lymphompatienten meist eine periphere Lymphadenopathie der regionalen Lymphknoten auf, während die periphere Lymphknoteninvolvierung bei Lymphomerkranken Katzen weniger häufig vorkommt (BAKER und LUMSDEN, 2000b). Hierdurch gestaltet sich die Probenentnahme bei der Katze schwieriger als bei Hunden. Lymphomerkrankungen der Katze werden weiterhin mehr von unspezifischen Symptomen begleitet (BAKER und LUMSDEN, 2000b; CARTER et al., 1988), was die Diagnosestellung auch in Hinblick auf die Infektionskrankheiten erschwert. Die Infektionskrankheiten, wie das feline Leukosevirus (FeLV) und das feline Immundefizienzvirus (FIV), können bei der Katze eine maligne Transformation lymphatischer Zellen auslösen (TESKE, 2000)

und so das Risiko für Lymphomerkrankungen erhöhen bzw. zu einem erhöhten Tumorrisiko führen (BAKER und LUMSDEN, 2000b; TESKE, 2000).

Eine Untersuchung der prognostischen Bedeutung von AgNORs an 31 feline intestinalen Lymphomen zeigte, daß die AgNOR- Anzahl und -Fläche bei histologischen Präparaten der Katze keine wertvollen prognostischen Faktoren darstellen (RASSNICK et al., 1999). Dies wurde durch eine weitere histologische Studie an 145 Katzen mit Lymphomen bestätigt (VAIL et al., 1998). Im Gegensatz zu Katzen stellt der Proliferationsmarker AgNOR bei Hunden einen der wichtigsten Parameter zur Abschätzung der Prognose einer Tumorerkrankung dar (DERENZINI, 2000).

In der Veterinärmedizin wird - wie in der Humanmedizin - die Bedeutung der AgNOR- Anzahl und -Fläche für die Diagnosefindung und Prognoseeinschätzung von Neoplasien diskutiert, jedoch wurden Biopate von Hunden mit Lymphomen nach Kenntnis der Autorin histologisch bevorzugt im Hinblick auf ihr prognostisches Potential untersucht (KIUPEL et al., 1999; KIUPEL, 1999). Die quantitative Bestimmung der AgNOR- Anzahl und -Fläche in histologischen Präparaten von kaninen Mastzelltumoren, Perianaldrüsenadenomen und -karzinomen, sowie Fibrosarkomen tragen - wie in der Humanmedizin - zur Differenzierung in maligne und benigne Tumoren bei. Eine signifikante Unterscheidung zwischen Mastzelltumoren mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad ist jedoch nur anhand der AgNOR Anzahl möglich, da sich die AgNOR Fläche innerhalb der einzelnen Gruppen überschneidet (HUNG et al., 2000). Des Weiteren zeigten sich ähnliche Resultate bezüglich der AgNOR Anzahl bei der statistischen Analyse kaniner Mammatumoren (BRATULIC et al., 1996). Die Untersuchung von AgNOR Anzahl und histologischem Malignitätsgrad ergab ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen Sarkomen mit geringem Malignitätsgrad (Grad I) und hochmalignen Sarkomen (Grad III) (ETTINGER et al., 2006).

Während quantitative Bewertungen der AgNORs bei Tumoren in der Veterinärmedizin anhand von Gewebepreparaten etabliert sind, fanden erste Untersuchungen dieses Proliferationsmarkers bei zytologischen Präparaten von kaninen Lymphomen viel später statt.



### **2.2.3.3 Die Bedeutung der AgNORs bei zytologischen Präparaten in der Veterinärmedizin**

Die erste zytologische Beurteilung von AgNORs bei Hunden mit Lymphomen (n=33) wurde 1997 in der Veterinärmedizin veröffentlicht (VAIL et al., 1997). VAIL et al. (1997) entdeckten ein lineares Verhältnis der AgNOR Anzahl in FNAs und Biopaten von Lymphompatienten und folglich war die AgNOR Anzahl in FNAs ein ebenso wertvoller Marker zur Bestimmung der Proliferation und Prognose in kaninen Lymphomen wie die AgNOR Anzahl bei Biopaten (VAIL et al., 1997). Später untersuchte eine ungarische Arbeitsgruppe (2004) anhand der AgNOR Anzahl unterschiedliche Methoden der Probengewinnung von kaninen Lymphknoten (n=26) und kam ebenfalls zu dem Resultat, dass die AgNOR Anzahl ein guter Proliferationsmarker in FNAs kaniner Lymphknoten darstellt (VAJDOVICH et al., 2004). Anhand der AgNOR Anzahl konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe, die jedoch sehr klein (n=10) war und überwiegend aus Hunden mit reaktiver Hyperplasie (n=4), Lymphadenitis (n=4) und nur 2 Hunden mit unveränderten Lymphknoten bestand, und der Lymphomgruppe (16 Patienten mit B-Zell- Lymphomen) bei zytologischen und histologischen Gewebeproben festgestellt werden (VAJDOVICH et al., 2004). Hunde mit Lymphomen wiesen eine signifikant höhere AgNOR Anzahl/ Zelle auf als Patienten aus der inhomogenen Kontrollgruppe (VAJDOVICH et al., 2004). Die Kontrollgruppe wurde diesbezüglich nicht näher differenziert und untersucht. Weiterhin war die AgNOR Anzahl der Lymphompatienten signifikant höher in FNAs und Abklatschpräparaten als in extirpierten Lymphknoten und Lymphknotenbiopsien ( $r= 0,60$ ) (VAJDOVICH et al., 2004). Die AgNOR Anzahl der Kontrollgruppe hingegen war in zytologischen und histologischen Präparaten ähnlich ( $r= -0,47$ ) (VAJDOVICH et al., 2004). VAIL et al. (1997) ermittelten, dass die AgNOR Anzahl in kaninen Lymphom- FNAs, die ebenfalls eng mit denen der Biopate korrelierte, generell um 0,5 höher waren als ihr chirurgisches Pendant (VAIL et al., 1997).

Bei einer Untersuchung der Malignitätsgrade bei Hunden mit B- Zell- Lymphomen wiesen diese Patienten eine signifikant höhere AgNOR Anzahl pro Zelle bei Lymphomen mit hohem Malignitätsgrad gegenüber niedrigem Malignitätsgrad auf (VAJDOVICH et al., 2004). Eine weitere kanine Studie mit ähnlichen Ergebnissen bei zytologischen Präparaten von Mastzelltumoren wurde 1996 vorgestellt (KRAVIS et

al., 1996). Die AgNOR Anzahl von Patienten mit Mastzelltumoren korrelierte ebenfalls in zytologischen Präparaten und Biopaten, als auch mit dem histologischen Grad des Tumors. Undifferenzierte (Grad III) Mastzelltumoren wiesen eine signifikant höhere AgNOR Anzahl als gut und mäßig differenzierte (Grad I und II) Tumoren auf (KRAVIS et al., 1996).

In einer vergleichenden humanmedizinischen Untersuchung der Anwendung von AgNORs an Abklatschpräparaten und Biopsien bei lymphatischem Gewebe konnte ebenfalls demonstriert werden, dass die zytologischen Abklatschpräparate wesentlich mehr und deutlichere AgNORs aufwiesen als die Biopate (BOLDY et al., 1989). Die bessere Detailerkennbarkeit im zytologischen Präparat beruht im Wesentlichen darauf, dass die Kerne und das Zytoplasma weiter ausgebreitet sind und sich die gesamte Zelle auf dem Objektträger befindet, während in der Histologie bei Schnittstärken von 3 µm nur eine Scheibe derselben zur Untersuchung gelangt (BOLDY et al., 1989; MISCHKE, 2005b; VAIL et al., 1997).

Somit wird die Feinnadelaspiration in Bezug auf die Auswertung von AgNORs am lymphatischen Gewebe als die Methode der Wahl angesehen (BOLDY et al., 1989).

Insgesamt hat sich die AgNOR Anzahl als ein wichtiger Parameter zur Bestimmung der Zellproliferation in kaninem lymphatischem Gewebe erwiesen (VAJDOVICH et al., 2004).

#### **2.2.4 Der Proliferationsmarker Ki-67**

Während die quantitative Bestimmung der AgNORs eine Auskunft über die Kinetik der Zellproliferation gibt (DERENZINI, 2000), ergänzt die quantitative Ki-67 Bestimmung diese durch die Bestimmung des Prozentsatzes proliferierender Zellen eines Gewebes (BROWN DC und GATTER KC, 1990a). Der 1983 von GERDES et al. entwickelte (GERDES et al., 1983) monoklonale Antikörper Ki-67 ist eine zuverlässige und einfache Möglichkeit der exakten Einschätzung der Wachstumsfraktion einer gegebenen Zellpopulation (SCHOLZEN und GERDES, 2000) humaner und auch kaniner Neoplasien (BROWN DC und GATTER KC, 1990a).

Eine der größten Barrieren für den Gebrauch von Ki-67 in der Grundlagenforschung stellte die limitierte Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers Ki-67 gegen das Protein Ki-67 (pKi-67) dar, denn der Prototyp Antikörper wies das Protein Ki-67 nur in Proben von Menschen und Primaten nach (BROWN DC und GATTER KC, 2002). Erst mit der Produktion von MIB-1 (Molecular Immunology Borstel) wurde diese Kreuzreaktivität um einige Säugetiere wie Hund, Pferd und Schaf erweitert (BROWN DC und GATTER KC, 2002). Insgesamt ist wenig über die Funktion des Proteins pKi-67 bekannt, jedoch scheint es von essentieller Bedeutung für die Zellproliferation zu sein, da seine Entfernung diese verhindert (BROWN DC und GATTER KC, 2002). Der Proliferationsmarker Ki-67 reagiert mit einem humanen nukleären Antigen, das in proliferierenden Zellen anwesend ist, aber in inaktiven Zellen fehlt (GERDES et al., 1991). Eine detaillierte Zellzyklusanalyse hat ergeben, dass das Ki-67 Antigen während aller aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird und folglich in G1, S, G2 und Mitose sichtbar ist (GERDES et al., 1991). Dies macht den Antikörper für die Bestimmung der so genannten Wachstumsfraktion eines Gewebes, d.h. die Anzahl der proliferierenden und somit Ki-67 positiven Zellen im Zellzyklus von physiologischem, reaktivem und neoplastischem Gewebe (BROWN DC und GATTER KC, 1990a) brauchbar, so dass eine Unterscheidung von benignen und malignen Zellpopulationen möglich ist (GERDES et al., 1986).

#### **2.2.4.1 Die immunzytologische Ki-67 Färbung**

Die immunzytologische Ki-67 Färbung stellt eine in der Anwendung einfache, aber durchaus kosten- und zeitintensive Färbung dar (SCHOLZEN und GERDES, 2000). Eine exakte Quantifizierung der eindeutig roten Ki-67 positiven und blaugefärbten Ki-67 negativen Zellen ermöglicht selbst unerfahrenen Untersuchern eine schnelle unkomplizierte Auswertung, die durch einfaches Auszählen der Zellen ohne hoch entwickelte technisch ausgereifte und teure Gerätschaften möglich ist (COSTA et al., 1999; JANMOHAMED et al., 1990; MUNAKATA und HENDRICKS, 1994; ZÖLLER et al., 1993). Grenzen in der Evaluierung der Proliferationsaktivität werden deutlich, wenn die immunologische Ki-67 Färbung alleine angewandt wird (FOURNEL-FLEURY et al., 1997b). Von 92 pathologisch- histologisch untersuchten kaninen NHL Präparaten konnte bei 11 Proben (12%) entweder keine Ki-67 Markierung oder eine nicht interpretierbare Zytoplasmafärbung nachgewiesen werden, und somit waren

diese Präparate von Hunden mit NHL nicht auswertbar (FOURNEL- FLEURY et al., 1997b). Diese Misserfolge bei der Ki-67 Anfärbbarkeit von Lymphknotengewebe waren möglicherweise das Resultat von Problemen in der Färbetechnik oder Zerstörung des Ki-67 Antigens, z.B. durch eine inkorrekte Fixierung, sowie eine Abwesenheit der Expression des nukleären Antigens, wie bereits in der Humanmedizin festgestellt wurde (FOURNEL- FLEURY et al., 1997b; VAN BOCKSTAELE et al., 1991). Unter Berücksichtigung dieser Problematik wird die Notwendigkeit der Anwendung eines standardisierten Färbeprotokolls für den Proliferationsmarker Ki-67 deutlich.

Trotz methodischer Probleme bei der Anfärbung von Lymphknotengewebe durch den Proliferationsmarker legte die Ki-67 positive Färbung der restlichen 80 Präparate von NHL Hunden und die einfache Interpretation dieser Methode in 88% der angefärbten Fälle nahe, dass es sich hierbei um eine nützliche Methode zur Beurteilung von Lymphompatienten mit niedrigem und hohem Malignitätsgrad handelt (FOURNEL- FLEURY et al., 1997b).

#### **2.2.4.2 Die Bedeutung von Ki-67 als Proliferationsmarker in der Humanmedizin**

Die immunologische Ki-67 Färbung, sowie die Bedeutung von Ki-67 als Proliferationsmarker wurde sowohl bei zytologischen als auch bei histologischen Präparaten von humanen NHL Patienten in der Literatur eingehend beschrieben. In einer humanmedizinischen Studie von RISHI et al. (1993) wurde die Anwendung von Ki-67 bei Biopaten und zytologischen Präparaten benigner und maligner Tumoren im Vergleich untersucht (RISHI et al., 1993). Es zeigte sich, dass die Anzahl Ki-67 positiver Tumorzellen bei zytologischen Präparaten gut mit den Ki-67 positiven Zellen der korrespondierenden (gefrorenen) Gewebebiopate korrelierte (RISHI et al., 1993). BROWN und GATTER (1990) bestätigten dies durch Untersuchungen von 21 FNAs im Vergleich zu Biopaten humaner NHL Patienten (BROWN DC und GATTER KC, 1990b). Weiterhin war die Anzahl Ki-67 positiver Zellen bei zytologischen Präparaten und Gewebebiopaten in malignen Tumoren signifikant höher als bei benignen (RISHI et al., 1993).

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass zytologische Präparate zur immunzytochemischen Beurteilung der Wachstumsfraktion von Neoplasien mittels Ki-67 Immunfärbung geeignet sind (BROWN DC und GATTER KC, 1990b; RISHI et

al., 1993). Der hohe Grad an Übereinstimmung zwischen den Resultaten der Gewebeschnitte und FNAs von NHL Patienten bekräftigt weiterhin, dass diese bei zytologischem Material angewandte Technik für Menschen von Bedeutung ist (BROWN DC und GATTER KC, 1990b).

Viele humanmedizinische Studien haben bei Biopaten von NHL erkrankten Patienten eine exzellente Korrelation zwischen Ki-67 Immunfärbung und histologischem Grad der NHL dokumentieren können (BROWN DC und GATTER KC, 1990b; GERDES et al., 1984; HALL et al., 1988b; PILERI und GERDES, 1987; SCHWARTZ et al., 1989; SCOTT et al., 1988; VENERONI et al., 1988; WEISS und STRICKLER, 1987). Im Allgemeinen waren bei Biopaten von Patienten mit NHL von geringem Malignitätsgrad die geringste Anzahl Ki-67 positiver Zellen nachweisbar und Lymphompatienten mit Tumoren von hohem Malignitätsgrad wiesen die höchste Zahl Ki-67 positiver Zellen auf (SCHWARTZ et al., 1989).

Die Ki-67 Bewertung ist des Weiteren bei der pathologischen Untersuchung von Lymphomen hilfreich, denn die Verteilung der proliferierenden Zellen im Lymphknotengewebe unterstützt die Unterscheidung zwischen reaktiven follikulären Hyperplasien und follikulären Lymphomen, in welchen die neoplastischen Lymphknotenfollikel eine mehr homogene Verteilung der Ki-67 positiven Zellen aufweisen (BROWN DC und GATTER KC, 2002).

#### **2.2.4.3 Die Bedeutung von Ki-67 bei histologischen Präparaten in der Veterinärmedizin**

Die diagnostische Bedeutung von Ki-67 als Proliferationsmarker bei histopathologisch entnommenen Präparaten von kaninen Lymphomen wurde im Gegensatz zur prognostischen Bedeutung (KIUPEL et al., 1999; KIUPEL, 1999) nach Kenntnis der Autorin noch nicht untersucht, aber es liegen Ergebnisse zu anderen Tumoren von Hunden vor.

ETTINGER et al. (2006) berichteten bei 60 Hunden über eine signifikante positive Korrelation zwischen der Anzahl Ki-67 positiver Zellen und dem histologischen Malignitätsgrad von formalinfixierten Sarkomen (ETTINGER et al., 2006). Der Vergleich von Ki-67 Index, d.h. die Anzahl Ki-67 positiver Zellen (dividiert durch die Summe der Ki-67 negativen und positiven Zellen) von insgesamt 1000 ausgezählten Zellen, und histologischem Grad des Tumors von 91 kaninen Mastzelltumoren ergab

des Weiteren auch einen signifikanten Unterschied zwischen gut (Grad I) und mäßig differenzierten (Grad II) Tumoren, sowie zwischen mäßig differenzierten (Grad II) und undifferenzierten (Grad III) Mastzelltumoren (SAKAI et al., 2002).

Obwohl die Anzahl Ki-67 positiver Zellen bei einigen Tumorarten signifikant mit dem Malignitätsgrad korreliert, ist eine sichere Unterscheidung zwischen malignen und benignen Neoplasien nicht immer möglich. So konnten LÖHR et al. (1997) bei Hunden mit Mammatumoren zwar eine signifikante Erhöhung des Ki-67 Indexes bei höherer Tumormalignität feststellen, nichtsdestoweniger wurde eine beachtliche Überschneidung zwischen den histopathologischen Tumorarten u.a. bei dem Proliferationsmarker Ki-67 gesehen, die es letztendlich unmöglich machte, einen spezifischen Cut- off- Wert zur Abgrenzung von malignen gegenüber benignen Tumoren festzulegen (LÖHR et al., 1997).

Auch wenn eine sichere Differenzierung von benignen und malignen Neoplasien histologischer Präparate in der Literatur kontrovers diskutiert wird, so steht doch außer Frage, dass aufgrund der schonenderen Anwendung und der engen Korrelation zum Proliferationsmarker Bromodeoxyuridin, dem bisherigen Goldstandard zur Analyse der Zellkinetik von Mastzelltumoren, der Ki-67 Index ebenfalls als Goldstandard der Proliferationsmarker angesehen wird (SAKAI et al., 2002).

#### **2.2.4.4 Die Bedeutung von Ki-67 bei zytologischen Präparaten in der Veterinärmedizin**

In der Veterinärmedizin wurden bisher sehr wenige Studien an zytologischen Präparaten zur Bedeutung von Ki-67 als Proliferationsmarker durchgeführt. Eine Untersuchung von 92 kaninen formalinfixierten NHL Biopaten und 30 FNAs bzw. Tumorabklatschpräparaten wies eine hoch signifikante Korrelation zwischen dem Ki-67 Index und dem histologischen Grad der Neoplasien nach, d.h. der Ki-67 Index ist hoch in hochmalignen und niedrig in niedrigmalignen Lymphompatienten (FOURNEL- FLEURY et al., 1997b). Mit einigen wenigen Ausnahmen erschien in der Lymphomgruppe von hohem Malignitätsgrad die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen zudem proportional zur Zellgröße unabhängig des Phänotyps (FOURNEL- FLEURY et al., 1997b). Weiterhin zeigte die Ki-67 Markierung eine gute Übereinstimmung zwischen den histologischen und zytologischen Daten, jedoch erwies sich die

Auszählung des zytologischen Materials als einfacher (FOURNEL- FLEURY et al., 1997b). Die bessere Detailerkennbarkeit im zytologischen Präparat beruht im Wesentlichen darauf, dass die Kerne und das Zytoplasma weiter ausgebreitet sind und sich die gesamte Zelle auf dem Objektträger befindet, während in der Histologie bei Schnittstärken von 3 µm nur eine Scheibe derselben zur Untersuchung gelangt (BOLDY et al., 1989; MISCHKE, 2005b).

Der hohe Grad an Übereinstimmung zwischen den Resultaten der Gewebeschnitte, FNAs und Abklatschpräparate von NHL Patienten belegt, dass diese bei zytologischem Material angewandte Technik für Hunde von Wert ist (FOURNEL- FLEURY et al., 1997b).

## **2.2.5 Die Einflüsse einer medikamentellen Vorbehandlung auf das Proliferationsverhalten bei Hunden mit Lymphomen**

Das Proliferationsverhalten von Geweben und damit auch die Beurteilung der Zellproliferation in kaninem lymphatischem Gewebe anhand von Proliferationsmarkern kann durch die Gabe von bestimmten Medikamenten beeinflusst werden, wodurch die Diagnosestellung, d.h. die Unterscheidung zwischen hyperplastischen und neoplastischen Veränderungen bzw. einer benignen und malignen Zellpopulation, erschwert wird.

### **2.2.5.1 Die Einflüsse einer Glukokortikosteroidvorbehandlung bei Hunden mit Lymphomen**

Wachstum und Zellteilung werden durch Glukokortikosteroide beeinflusst.

Die DNA- Synthese und die Zellteilung in einer Reihe von Geweben, wie Fibroblasten, Magenschleimhaut, Epidermis, Thrombozyten u.a., wird durch Glukokortikosteroide gehemmt (FORTH et al., 1992). Des Weiteren hemmen Glukokortikosteroide die Proliferationsaktivität in lymphozytärem Gewebe (BITTNER und WIELCKENS, 1988). Dieser Effekt scheint jedoch selektiv zu sein, da andere Gewebe, wie Knochenmark und Darmschleimhaut, nicht betroffen sind (FORTH et al., 1992).

### **2.2.5.2 Einflüsse einer Vorbehandlung mit Chemotherapeutika bei Hunden mit Lymphomen**

Arzneimittel, die zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt werden, hemmen ebenfalls die Zellproliferation. Sie wirken daher nicht nur auf die Tumorzellen schädigend, sondern auch auf die normalen, proliferierenden Zellen (NEAL und STAHLMANN, 1995). Folglich ist eine korrekte Beurteilung des Proliferationsverhaltens kaniner Tumoren anhand von Proliferationsmarkern nicht möglich, wenn die Patienten mit Chemotherapeutika vorbehandelt sind.

Das Ausmaß der Zellschädigung hängt von der jeweiligen Phase des Zellteilungszyklus ab. Die meisten Zellen in normalen Geweben stehen in der Ruhephase G0 oder in der postmitotischen Ruhephase G1 und sind relativ unempfindlich gegenüber Zytostatika (LÖSCHER et al., 1994). Nur ein Teil der Zellen eines Gewebes, die Wachstumsfraktion, teilt sich (BRUNE, 1996). Empfindliche Phasen für Zytostatika stellen deshalb insbesondere die S-(DNA-Synthese)Phase und die M-(Mitose-)Phase dar, wobei in Tumorgewebe die Wachstumsfraktion der Zellen höher als in den meisten anderen Geweben ist (LÖSCHER et al., 1994).

## **2.3 Klassifizierungsschemata und Prognose bei kaninen**

### **Lymphomen**

Neben diversen bereits erläuterten Varianten kanine Lymphome zu diagnostizieren, ist auch die prognostische Seite insbesondere im Hinblick auf die Therapie der Tumoren von Bedeutung. Prognostische und diagnostische Kriterien lassen sich aber nicht immer ohne Weiteres klar voneinander trennen, sondern gehen teilweise fließend ineinander über.

#### **2.3.1 Klassifizierungsschemata von Lymphomen und ihre Bedeutung für die Prognose von Lymphomen**

Eine Einteilung bezüglich der Prognose der Erkrankung anhand von Klassifizierungsschemata sollte helfen, das klinische Verhalten von Lymphompatienten zu beurteilen und damit eine prognostische Aussage treffen zu können (KIUPEL,



1999). Hierzu wurden die vorhandenen humanmedizinischen NHL Klassifizierungen auf den Hund übertragen und zur Charakterisierung von Lymphomen in der Veterinärmedizin angewandt (CARTER et al., 1986; FOURNEL- FLEURY et al., 1994b; FOURNEL- FLEURY et al., 1997a; FOURNEL- FLEURY et al., 1997b; PONCE et al., 2004; PONCE et al., 2010; STANSFELD et al., 1988). Die „Working Formulation“ des National Cancer Institute (NCI) (CARTER et al., 1986; NCI, 1982) und die „Aktualisierte Kiel Klassifikation der NHL“ (LENNERT, 1975; LENNERT und FELLER, 1990; STANSFELD et al., 1988) können zur zytomorphologischen Differenzierung von kaninen Lymphomen angewandt werden (FOURNEL- FLEURY et al., 1997a; PONCE et al., 2010; TESKE et al., 1994b), denn die Klassifizierung der Lymphome in niedrige und hochmaligne Tumorgrade hat prognostische Bedeutung für diese Fälle (TESKE et al., 1994a). Der Vorteil der „Aktualisierten Kiel Klassifikation der NHL“ ist die zusätzliche Einbeziehung von immunphänotypischen Kriterien, die eine Unterteilung der Lymphome in B- und T- Zell- Tumoren ermöglicht. Klassifizierungen basierten meist auf histologische Untersuchungen von chirurgisch entnommenen Neoplasien (TESKE und VAN HEERDE, 1996). Vergleichsweise durchgeführte Studien an zytologischen und histologischen Lymphknotenpräparaten von Hunden mit Lymphomen wiesen eine gute Korrelation zwischen der zytologischen und histologischen Klassifizierung von kaninen Lymphomen bei Anwendung der „Aktualisierten Kiel Klassifikation der NHL“ nach (TESKE und VAN HEERDE, 1996). Ähnliche Ergebnisse über vergleichsweise untersuchte zytologische und histologische NHL Klassifizierungen wurden bei humanmedizinischen Studien dargelegt (CARTER et al., 1988; SPIELER und SCHMIDT, 1978; VAN HEERDE et al., 1984).

Weiterhin konnten in TESKE und VAN HEERDE's Studie (1996) gute inter- und intra-Untersucher- Reproduzierbarkeiten bei zytologisch untersuchten FNAs von Hunden mit Lymphomen nachgewiesen werden, deren Ergebnisse ebenfalls mit den histologischen Resultaten korrelierte (TESKE und VAN HEERDE, 1996). Somit ist die „Aktualisierte Kiel Klassifikation der NHL“ zur zytologischen Klassifizierung von kaninen Lymphomen geeignet (FOURNEL- FLEURY et al., 1997a; TESKE und VAN HEERDE, 1996).

FOURNEL- FLEURY et al. (1997) modifizierten die bestehende „Aktualisierte Kiel Klassifikation der NHL“ und adaptierten diese für den Hund (FOURNEL- FLEURY et



(FOURNEL- FLEURY et al., 1994b; FOURNEL- FLEURY et al., 1997a; FOURNEL- FLEURY et al., 1997b; PONCE et al., 2010). Die Übertragung des humanen Klassifizierungsschemata auf den Hund birgt jedoch auch morphologische und immunphänotypische Schwierigkeiten (FOURNEL- FLEURY et al., 1997b), wird die geringe Anzahl der Hunde mit Lymphomen von niedrigem Malignitätsgrad berücksichtigt, sowie die von FOURNEL- FLEURY et al. entdeckte Gruppe der niedrigmalignen mittelgroßen, makronukleolären Zellen (MMC), die kein Equivalent in der Humanmedizin haben (FOURNEL- FLEURY et al., 1997a; FOURNEL- FLEURY et al., 1997b).

Im Gegensatz zu älteren Klassifizierungsschemata legte die französische Arbeitsgruppe nicht so großen Wert auf die histologische Architektur des zu untersuchenden Lymphknotenmaterials (FOURNEL- FLEURY et al., 1997a; FOURNEL- FLEURY et al., 1997b). Diese Herangehensweise ist insbesondere zur Beurteilung von Tieren mit Neoplasien von Bedeutung, da die meisten Hunde eine diffuse Infiltration von neoplastischem Lymphgewebe zeigten (DOBSON, 2004). Somit ist diese Klassifikation insbesondere zur Beurteilung von Hunden mit Lymphomen geeignet.

PONCE et al. (2004) erweiterten die von FOURNEL- FLEURY et al. auf den Hund übertragene „Aktualisierte Kiel Klassifikation der NHL“, indem sie zusätzlich die Überlebenszeit der Hunde bei den verschiedenen Subtypen von B- und T- Zell-Lymphompatienten untersuchten (PONCE et al., 2004). Sie kamen zu dem Resultat, dass eine klinisch- morphologische Beurteilung dieser Erkrankung sowohl für den Menschen als auch für den Hund gerechtfertigt ist (PONCE et al., 2004).

### **2.3.1.1 Die „Aktualisierte Kiel Klassifikation der NHL“**

Die „Aktualisierte Kiel Klassifikation der NHL“ (STANSFELD et al., 1988) wurde von FOURNEL- FLEURY et al. auf den Hund übertragen und differenziert kanine Lymphome nach zytomorphologischen und immunphänotypischen Kriterien (FOURNEL- FLEURY et al., 1994b; FOURNEL- FLEURY et al., 1997a). Morphologisch wird der Tumorgrad durch den Mitoseindex und die Zellgröße determiniert (RASKIN und MEYER, 2009). Der Mitoseindex wird hierfür durch Auszählen von 5 Gesichtsfeldern bei einer 400- 500 fachen Vergrößerung am Mikroskop bestimmt (RASKIN und MEYER, 2009). Der Mitoseindex ist gering bei

einer Anzahl von 0- 1 Mitosefiguren in 5 Gesichtsfeldern, moderat bei einer Anzahl von 2- 3 Figuren und hoch bei mehr als 5 Mitosefiguren in 5 Gesichtsfeldern.

Die Zellgröße wird im Vergleich zur zytologischen Größe von Erythrozyten beurteilt (RASKIN und MEYER, 2009). Kleine Zellen sind 1- 1,5x so groß wie Erythrozyten, mittlere sind 2- 2,5x so groß wie Erythrozyten und große Zellen entsprechen mehr als 3x der Erythrozytengröße (RASKIN und MEYER, 2009).

Als zusätzliche zytologische Kriterien können weiterhin der Zellkern (Nukleus), der Nukleolus und das Zytoplasma in die Beurteilung einbezogen werden (RASKIN und MEYER, 2009).

Zusammengefasst liegt bei einem niedrigen Mitoseindex und einer überwiegenden Anzahl kleiner Zellen ein geringer Tumorgrad vor, sowie eine moderate oder große Anzahl von Mitosefiguren und große Zellen einen hohen Tumorgrad beschreiben (RASKIN und MEYER, 2009).

Ein weiteres Kriterium neben der zytomorphologischen Beurteilung der „Aktualisierten Kiel Klassifikation der NHL“ ist die immunphänotypische Untersuchung von Lymphomen (FOURNEL- FLEURY et al., 1994b; FOURNEL- FLEURY et al., 1997a).

### **2.3.2 B- bzw. T- Zell- Differenzierung von kaninen Lymphomen**

Zur Immunphänotypisierung werden die Lymphome von Hunden mittels spezifischer Antikörper in B- und T- Zell- Lymphome differenziert (CULMSEE, 2002). Die immunzytologische Färbung erfolgt durch Inkubation mit einem primären Antikörper wie z.B. CD79a zur B- Zell- und CD3 zur T- Zell- Darstellung, der durch einen sekundären, an einen Alkalische- Phosphatase- Anti- Alkalische- Phosphatase- Komplex gekoppelten Antikörper sichtbar gemacht wird (APAAP- Methode). Bei der Immun- Alkalische- Phosphatase- Färbemethode spaltet die Alkalische- Phosphatase (AP) Naphtholphosphatase (Substrat) hydrolytisch in Phenolverbindungen und Phosphatase (BOENISCH et al., 2003). Die Phenole reagieren mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogen) und bilden so unlösliche Azofarbstoffe (BOENISCH et al., 2003). Als Substrat- Chromogen für die AP können sowohl Neufuchsin als auch Fast Red verwendet werden, jedoch ist die Farbintensität von Neufuchsin stärker als bei Fast Red (BOENISCH et al., 2003). Die APAAP- Methode ist

besonders geeignet für die immunphänotypische Markierung von zytologischen Präparaten, da das leuchtend rote Endprodukt einer positiven Färbereaktion sehr einfach durch das menschliche Auge erkannt wird und selbst geringe Anzahlen veränderter Zellen nachgewiesen werden können (CORDELL et al., 1984). Eine weitere Studie weist auf eine exzellente Korrelation der Ergebnisse von immungefärbten zytologischen und histologischen Präparaten bei Hunden mit Lymphomen hin (FISHER et al., 1995).

DALQUEN's Studie (1995) über die „Leistungsfähigkeit der Immunzytochemie in der zytopathologischen Tumordiagnostik“ kam zu dem Ergebnis, dass immunzytologische Zusatzuntersuchungen mittels Antikörper die Anfangsdiagnose insbesondere bei humanen NHL (n=60) wesentlich ergänzen bzw. bestätigen (DALQUEN, 1995). Der gezielte Einsatz von Antikörpermarkierungen ist also bei NHL Patienten eine wertvolle Ergänzung der zytologischen Tumordiagnose (DALQUEN, 1995).

In der Literatur finden sich unterschiedliche numerische Angaben inbezug auf den Anteil des B- bzw. T- Zell- Immunphänotyps von kaninen Lymphompopulationen. Von 175 untersuchten Hunden mit Lymphomen wiesen 76% der Tiere ein B- Zell- und 21,5% ein T- Zell- Lymphom auf. Weiterhin fanden sich bei 2% der Hunde Null Zellen, d.h. diese Zellen zeigten keine spezifische Reaktion mit einem kaninen Lymphozyten- Antikörper (RUSLANDER et al., 1997). Ähnliche Ergebnisse bei der immunphänotypischen Differenzierung von kaninen Lymphomen konnten in anderen Studien demonstriert werden (CARTER et al., 1986; FERRER et al., 1993; FOURNEL- FLEURY et al., 1997a). PONCE et al. (2010) haben bei einer in Frankreich durchgeführten Untersuchung an 608 Hunden eine geringgradig höhere Anzahl der T- Zell- Lymphome mit 35,4% festgestellt und nur 63,8% der Tiere wiesen ein B- Zell- Lymphom auf (PONCE et al., 2010). Ähnliche Resultate bezüglich der B- bzw. T- Zell- Differenzierung bei Hunden mit Lymphomen zeigten TESKE et al. in einer früheren Publikation (TESKE et al., 1994b).

Unabhängig von dem zahlenmäßig umstritten Verhältnis von Hunden mit B- zu T- Zell- Lymphomen, steht außer Frage, dass der überwiegende Anteil der kaninen Lymphome B- Zell- Tumore sind (BAKER und LUMSDEN, 2000b; GREENLEE et al., 1990).

### **2.3.3 Die Bedeutung der B- bzw. T- Zell- Differenzierung als prognostischer Parameter**

Die Immunphänotypisierung der Lymphompatienten in B- und T- Zell- Tumoren kann unterstützend bei der Prognosebestimmung von kaninen Lymphomen mitwirken (RUSLANDER et al., 1997; TESKE et al., 1994a). So wiesen Hunde mit T- Zell- Lymphomen eine signifikant höhere Rezidivrate und kürzere Überlebenszeiten verglichen mit B- Zell- Lymphomen unter Therapie auf (GREENLEE et al., 1990; RUSLANDER et al., 1997). Generell wurde erwartet, dass T- Zell- Lymphome ein maligneres biologisches Verhalten als B- Zell- Lymphome zeigten, und deshalb mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden (PONCE et al., 2004). Neuere Studien legten aber dar, dass die Gruppe der B- und T- Zell- Lymphome zahlreiche Untergruppen beinhalten (FOURNEL- FLEURY et al., 1997a; FOURNEL- FLEURY et al., 1997b; PONCE et al., 2004; PONCE et al., 2010; STANSFELD et al., 1988), die auch auf eine chemotherapeutische Behandlung unterschiedlich reagieren (PONCE et al., 2004). Letztendlich ist die Bedeutung des Immunphänotyps alleine für die Einschätzung der Prognose fraglich, jedoch in Kombination mit Proliferationsmarkern bewertet, sind der Immunphänotyp und AgNORs die wichtigsten prognostischen Marker für die Behandlung kaniner Lymphome (KIUPEL, 1999). Schon unter Einsatz dieser Parameter ist eine Trennung zwischen Risikohunden mit niedrigen Überlebenschancen und Hunden mit Überlebenszeiten von bis zu drei Jahren unter Einsatz von Chemotherapie möglich (KIUPEL, 1999).

### **2.3.4 Proliferationsmarker als prognostischer Parameter**

Histologische und zytologische Lymphompräparate können mit verschiedenen Techniken ausgewertet werden, die den Immunphänotyp (B- versus T- Zell- Lymphome), den Tumograd (niedrig oder hoch) und die Tumorproliferationsrate (AgNORs, Ki-67) sowohl als diagnostisches als auch als prognostisches Hilfsmittel ermitteln. Nach Kenntnis der Autorin existieren jedoch keine Studien, die alle drei Faktoren bei zytologischen Präparaten von Hunden mit Lymphomen beurteilt haben.

#### **2.3.4.1 Die Bedeutung von Ki-67 als prognostischer Parameter**

Neben dem diagnostischen Potential findet auch der Proliferationsmarker Ki-67 Anwendung als prognostischer Indikator (BROWN DC und GATTER KC, 2002). So korreliert der Ki-67 Index bei Patienten mit Lymphomen (n= 138) eng mit der Überlebens- und Rezidivrate (HALL et al., 1988b). Patienten mit Lymphomen von hohem Malignitätsgrad und niedrigem Ki-67 Index wiesen eine geringere Rezidivrate auf als solche mit hohem Ki-67 Index (HALL et al., 1988b). Weiterhin waren Lymphome von niedrigem Malignitätsgrad und hohem Ki-67 Index mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten assoziiert als solche mit niedrigeren Ki-67 Indizes (HALL et al., 1988b; SCHRAPE et al., 1987). Im Gegensatz dazu wiesen Lymphompatienten mit Tumoren von hohem Malignitätsgrad und hohem Ki-67 Index eine bessere Überlebensrate auf als solche mit niedrigeren Ki-67 Indizes (HALL et al., 1988b). Diese vermeintlich scheinbare paradoxe Entdeckung wurde ebenfalls von GERDES et al. (1987) festgestellt (GERDES et al., 1987). Vermutlich reflektiert die bessere Überlebenszeit die erhöhte Sensitivität dieser schnell proliferierenden Tumoren gegenüber einem aggressivem Therapieregime (HALL et al., 1988b). Im Gegensatz dazu berichteten GROGAN et al. (1988) über schlechtere Überlebenszeiten bei Menschen (n=105) mit diffusen großzelligen Lymphomen, die nach der Kieler Klassifikation als hochmaligne eingeteilt wurden und eine hohe Ki-67 Anzahl aufwiesen (GROGAN et al., 1988).

Untersuchungen an 6 humanen Patienten mit postthymischen T- Zell- Lymphomen und 4 mit lymphoblastischen T- Zell- Lymphomen haben dagegen keine Korrelation zwischen der Ki-67 Expression und der Überlebenszeit gezeigt (ODERMATT et al., 1987). Die Aussagefähigkeit dieser Studie kann jedoch aufgrund der geringen Probandenzahl und Berücksichtigung weniger Lymphom- Subtypen in Frage gestellt werden.

BROWN und GATTER (1990) haben die Bedeutung von Ki-67 als prognostischer Parameter von humanen NHL und anderen Neoplasien (Tumoren des zentralen Nervensystems, der Brust, der Haut, des Gastrointestinaltraktes, der Lunge, des Genitaltraktes etc.) in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst (BROWN DC und GATTER KC, 1990a). Hierbei ist zu beachten, dass die prognostische Bedeutung von Ki-67 innerhalb der Gruppe von NHL durch die Heterogenität der unterschiedlichen Subtypen dieser Erkrankung kompliziert wird, die dann unklare und

widersprüchliche Aussagen zur prognostischen Bedeutung von Ki-67 als Proliferationsmarker bei Lymphomen hervorrufen können (BROWN DC und GATTER KC, 2002).

Insgesamt scheint der Proliferationsmarker Ki-67 in der Humanmedizin wertvolle prognostische Informationen insbesondere bei lymphoproliferativen Erkrankungen zur Verfügung zu stellen (BROWN DC und GATTER KC, 1990a).

Nach Kenntnis der Autorin sind nur wenige veterinärmedizinische Studien über Ki-67 bei Hunden mit Lymphomen veröffentlicht worden, die zudem meist in Verbindung mit dem Proliferationsmarker AgNOR beurteilt wurden und deshalb auch an späterer Stelle erläutert werden.

#### **2.3.4.2 Die Bedeutung von AgNORs als prognostischer Parameter**

Während die Bedeutung von Ki-67 als prognostischer Parameter in der Literatur diskutiert wird, ist in der Humanmedizin unumstritten, dass die Bewertung der AgNORs zur Beurteilung der Prognose von Tumorerkrankungen hilfreich ist (DERENZINI, 2000). Der AgNOR Parameter hat sich als zuverlässiges Hilfsmittel zur Abgrenzung des klinischen Krankheitsbildes von Neoplasien gegenüber anderen nicht tumorösen Erkrankungen bewährt, da er ein unabhängiger prognostischer Faktor für viele Tumorarten ist (DERENZINI, 2000). AgNORs ermöglichen eine Information über die Tumorstadiumsrate zum Zeitpunkt der Diagnose und sind somit ein guter Marker zur Feststellung des Krankheitsverlaufes und Etablierung geeigneter Therapieprotokolle (DERENZINI, 2000).

Die Beurteilungen der quantitativen Verteilung von AgNORs wurden in der Tumorpathologie sowohl zu diagnostischen als auch zu prognostischen Zwecken angewandt (DERENZINI, 2000).

Zahlreiche humanmedizinische Studien haben bei verschiedenen Neoplasien eine signifikante Korrelation zwischen der AgNOR Anzahl in Biopsien und der Überlebenszeit humaner Patienten nach der Operation eines malignen Tumors bzw. unter Chemotherapie aufgezeigt, die in einer ausführlichen Übersichtsarbeit von PICH et al. (2000) beschrieben wurde (PICH et al., 2000).

In der Veterinärmedizin ermöglicht die Silberfärbung ebenfalls die quantitative AgNOR Untersuchung als prognostischen Indikator zu verwenden (BOSTOCK et al.,



1989; SIMOES et al., 1994). KIUPEL et al. (1999) untersuchten periphere Lymphknotenbiopate von Hunden mit Lymphomen unter Chemotherapie und konnten zeigen, dass AgNORs auch zur Einschätzung des Behandlungserfolges von kaninen Lymphomen wertvolle prognostische Marker sind (KIUPEL et al., 1999). Nicht nur die AgNOR Anzahl, die mit der Rezidivrate korreliert, sondern auch die AgNOR Fläche, welche mit der Überlebenszeit korreliert, waren von Bedeutung (KIUPEL et al., 1999). Ähnliches gilt für kanine Mastzelltumoren. Hier konnte bei FNAs und Biopaten zusätzlich eine Korrelation der AgNOR Anzahl mit der Überlebenszeit nach chirurgischem Eingriff, dem histologischen Differenzierungsgrad des Tumors (KRAVIS et al., 1996) und der Remission oder Metastasenbildung des Tumors festgestellt werden (BOSTOCK et al., 1989; SIMOES et al., 1994). Insgesamt sind AgNORs ein wertvoller prognostische Marker zur Beurteilung von humanen und kaninen Lymphomen und deren Behandlungserfolg (DERENZINI, 2000; KIUPEL et al., 1998a; KIUPEL, 1999).

#### **2.3.4.3 Vergleichende Untersuchungen der Bedeutung von AgNORs und Ki-67 als prognostischer Parameter in der Veterinärmedizin**

Während das prognostische Potential von AgNORs in der Veterinärmedizin bei diversen Studien untersucht wurde, finden sich diesbezüglich für den Proliferationsmarker Ki-67 nur wenige vergleichende Untersuchungen mit dem Proliferationsmarker AgNOR.

KIUPEL et al. (1999) demonstrierten bei 122 kaninen Lymphknotenbiopaten, dass der Proliferationsmarker Ki-67 nur für einzelne Gruppen von Hunden mit Lymphomen - und zwar solche mit weniger als 20% bzw. 40- 60% Ki-67 positiven Zellen - prognostisch signifikant war (KIUPEL, 1999). Die prognostisch bedeutendsten Parameter für die Behandlung kaniner Lymphome waren in dieser Studie jedoch der Immunphänotyp und die durchschnittliche AgNOR- Anzahl und -Fläche, denn der Einsatz dieser drei Parameter machte eine Trennung zwischen Risikohunden mit niedrigen Überlebenschancen und Hunden mit Überlebenszeiten von bis zu drei Jahren unter Einsatz von Chemotherapie möglich (KIUPEL, 1999).

ETTINGER et al. (2006) untersuchten die prognostische Bedeutung der AgNOR Anzahl und der Anzahl Ki-67 positiver Zellen bei histologischen Präparaten von Sarkomen (n=60) in Bezug auf die Überlebenszeit (ETTINGER et al., 2006).

Ungünstig auf das Überleben der erkrankten Tiere wirkte sich hierbei aus, wenn die AgNOR Anzahl/ Zelle eines Patienten die mediane AgNOR Anzahl der Studiengruppe überschritt, bzw. wenn die Anzahl Ki-67 positiver Zellen eines Probanden höher als die mediane Anzahl Ki-67 positiver Zellen war (ETTINGER et al., 2006). Des Weiteren konnte eine verkürzte Überlebenszeit bei Hunden mit einer erhöhten AgNOR Anzahl/ Zelle, ebenso sowie bei Sarkompatienten mit einer erhöhten Anzahl Ki-67 positiver Zellen nachgewiesen werden (ETTINGER et al., 2006). Die Ergebnisse der multivarianten Überlebensanalyse nach „Cox proportional hazard regression model analyses“ zeigten aber, dass die erhöhte AgNOR Anzahl bei Hunden mit Sarkomen der einzige prognostische Faktor für eine kürzere Überlebenszeit war (ETTINGER et al., 2006).

WEBSTER et al. demonstrierten 2007 und 2008 in Studien bei Gewebeschnitten von Hunden mit Mastzelltumoren (n=56), dass auch hier eine Erhöhung der AgNOR Anzahl/ Zelle, sowie der Anzahl Ki-67 positiver Zellen ein signifikant geringeres Überleben der Probanden bedingte (WEBSTER et al., 2007; WEBSTER et al., 2008). SCASE et al. zeigten dies bereits 2006, jedoch waren in ihrer Studie die AgNOR Anzahl/ Zelle, sowie die Anzahl Ki-67 positiver Zellen bei Hunden mit Mastzelltumoren (n=121) in der univarianten und multivarianten Analyse signifikante Marker für die Überlebenszeit (SCASE et al., 2006). Anhand der Cox Regressionsanalyse war der Proliferationsmarker Ki-67 sogar besser geeignet für die Vorhersage des Ablebens bei Mastzelltumorpatienten als der AgNOR Marker (SCASE et al., 2006).

Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Untersuchung bei 33 testikulären Tumorbioptaten kein signifikanter Unterschied zwischen der Ki-67 Proliferationsaktivität von Hunden mit Seminomen, Sertoli- und Leydig- Zelltumoren festgestellt werden (SARLI et al., 1994).

Diese Studien demonstrieren, dass die Bedeutung des Proliferationsmarkers Ki-67 im Gegensatz zu humanmedizinischen Untersuchungen und im Vergleich zur AgNOR- Anzahl und -Fläche als prognostischer Marker in der Veterinärmedizin kontrovers diskutiert wird.

## **2.4 Die Vorteile einer Doppelfärbung von AgNORs und Ki-67**

Die Proliferationsaktivität eines Tumors oder Gewebes wird bestimmt durch die Wachstumsfraktion und die Zeit, die gebraucht wird, um den Zellzyklus zu beenden (WRIGHT, 1984). Die quantitative AgNOR Bewertung ist die einzige Methode, die Informationen über die Geschwindigkeit der Zellproliferation in der Routineuntersuchung von Gewebematerial ermöglicht. Dieser Parameter zusammen mit den Parametern, die die Anzahl der proliferierenden Zellen anzeigen (z.B. Ki-67), kann eine zuverlässige Information über die Tumorstadiumsrate zum Zeitpunkt der Diagnose liefern, und deshalb sehr nützlich sein, um das klinische Erscheinungsbild einer Tumorerkrankung zu definieren (LORENZATO, 2000). In Kombination mit dem Proliferationsmarker Ki-67 sollen also zusätzliche Informationen über das Proliferationsverhalten von kaninen Lymphomen erhalten werden.

Untersuchungen des Proliferationsverhaltens von Ki-67 und AgNORs sind aber nur aussagekräftig, wenn dieselben Bereiche eines Präparates untersucht werden.

Erst die Anfärbung der gleichen Zellen mit dem jeweiligen Proliferationsmarker ermöglicht einen Vergleich dieser unterschiedlichen Marker. Die Anwendung einer Doppelfärbetechnik schafft somit die Voraussetzungen für eine Analyse dieser unterschiedlichen Marker in der gleichen Zelle (COSTA et al., 1999).

Im Rahmen der histologischen Gewebeschnitte - mit einer durchschnittlichen Dicke von 3µm - sind mehrere Schnitte als zellgleich zu bewerten, und infolgedessen kann ein Präparat mit Ki-67 und das andere gleichwertige mit der Silberfärbung für AgNORs angefärbt werden. Zytologisch betrachtet bedeutet dies jedoch, dass eine Doppelfärbung mit dem Ki-67 Antikörper und AgNORs notwendig ist, denn die Zellen eines jeden Präparates differieren aufgrund der Entnahmetechnik.

### **2.4.1 Die Bedeutung der Doppelfärbung von AgNORs und Ki-67 bei**

#### **histologischen Präparaten in der Humanmedizin**

Doppelfärbungen von Ki-67 und AgNORs sind in der Literatur vorwiegend bei pathologisch- histologischen Präparaten beschrieben (HALL et al., 1988a). Hierfür wurden in zwei Studien jeweils gefrorene humane Gewebeschnitte von an NHL erkrankten Patienten mit der Ki-67 Methode, sowie das zugehörige paraffinfixierte

Lymphgewebe mit der Silberfärbung für AgNORs angefärbt (HALL et al., 1988a; OKABE et al., 1991). Die Untersuchungen von 80 Patienten mit NHL haben eine gute Korrelation zwischen der durchschnittlichen AgNOR Anzahl und der Anzahl Ki-67 positiver Zellen ergeben ( $r= 0,86$ ,  $P<0,001$ ) (HALL et al., 1988a). In einer anderen histologischen Studie wurde bei 25 Menschen mit unbehandelten NHL eine mäßige lineare Korrelation zwischen der durchschnittlichen AgNOR Anzahl/ Zelle und dem Verhältnis der NHL Zellen, die mit Ki-67 reagierten, beobachtet ( $r= 0,48$ ,  $P< 0,05$ ) (OKABE et al., 1991).

Humane Gewebeschnitte diverser anderer neoplastisch veränderter Organe wurden auch jeweils nur mit einem Proliferationsmarker angefärbt und mit einem weiteren Proliferationsmarker des korrespondierenden Schnittes verglichen (TRERE et al., 1991). Die neoplastisch veränderten Organe umfassten Haut- (ANSAI und KOSEKI, 1995) und Schleimhäute (ZÖLLER et al., 1993), Atmungsapparat (TRERE et al., 1991), Magen- Darm- Trakt inklusive Lymphknoten (KAKEJI und KORENAGA, 1991; RODOLICO et al., 2003), Anhangsorgane/ Leber (SUTO et al., 1998), Harn- (PICH et al., 1991) und Geschlechtsorgane (CANEPA et al., 1990; DERVAN et al., 1989; DI STEFANO et al., 1991; NIELSEN und NYHOLM, 1994), sowie das Gehirn (HARA et al., 1990). Alle aufgeführten pathologisch- histologischen Präparate wiesen eine gute Korrelation von AgNORs und Ki-67 auf. Obwohl viele Studien eine gute Korrelation zwischen der AgNOR Anzahl oder der AgNOR Fläche und den Ki-67 positiven Zellen in unterschiedlichen Neoplasien gezeigt haben, wurden die Proliferationsmarker in den meisten Untersuchungen nicht simultan d.h. auf dem gleichen Präparat angefärbt und beurteilt, so dass die für die einzelnen Proliferationsmarker ermittelten Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar sind.

#### **2.4.2 Die tatsächliche Doppelfärbung von AgNORs und Ki-67**

Tatsächliche Doppelfärbungen, in denen die Ki-67 Färbung und die Silberfärbung nacheinander auf dem gleichen histologischen Präparat angewandt wurden, finden sich nur in wenigen Studien (COSTA et al., 1999; JANMOHAMED et al., 1990; MUNAKATA und HENDRICKS, 1994; NAGAO und ISHIDA, 1995).

#### **2.4.2.1 Die Auswirkungen einer tatsächlichen Doppelfärbung auf die AgNORs und die Anzahl Ki-67 positive Zellen (bei histopathologischen Präparaten in der Humanmedizin)**

Die Doppelfärbung ermöglicht eine Analyse der unterschiedlichen Proliferationsmarker in denselben Zellen (COSTA et al., 1999), ohne jedoch einen messbar negativen Einfluss auf die individuellen Parameter AgNOR Anzahl und Ki-67 Index auszuüben (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994). Zur Bestimmung der Auswirkungen einer Doppelfärbung auf die AgNORs bzw. die Ki-67 positiven Zellen in humanem Tonsillengewebe wurde jeweils ein Proliferationsmarker alleine, sowie in der dualen Färbung angefärbt und beurteilt (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994). Es zeigte sich, dass die Silberfärbung keine demonstrierbaren Auswirkungen auf die vorausgegangene Ki-67 Immunfärbung hat (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994). Der Proliferationsmarker Ki-67 ist ein intranukleärer Antikörper, dessen Anfärbung eine Mikrowellenbehandlung erfordert, die wiederum die darauffolgende Silberfärbung beeinflussen könnte. MUNAKATA und HENDRICKS (1994) untersuchten deshalb zusätzlich noch die Auswirkungen einer für die immunologische Ki-67 Färbung benötigte Mikrowellenbehandlung auf die AgNORs (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994). Obwohl die Ki-67 Färbung die AgNOR Anzahl nicht beeinflusste, wurde eine signifikante Erhöhung der Zellkernfläche und AgNOR Fläche beobachtet (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994). Die gleichen Ergebnisse wurden jedoch auch bei alleiniger Mikrowellenbehandlung erzielt, so dass der Effekt vermutlich auf die Mikrowellen zurückzuführen ist (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994). Das prozentuale Verhältnis der AgNOR Fläche zur Zellkernfläche wurde aber durch die Mikrowellenbehandlung nicht beeinflusst. Daraus folgt, dass der Grad der Veränderung durch die Mikrowellenbehandlung sowohl für den Zellkern als auch für die AgNOR Fläche gleich ist (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994).

Trotz der Beeinflussung der AgNOR Fläche durch eine für die Ki-67 Anfärbung erforderliche Mikrowellenbehandlung sind nach Kenntnis der Autorin keine Studien veröffentlicht worden, in denen zuerst die AgNOR Färbung und folgend die Ki-67 Färbung bei einer tatsächlichen Doppelfärbung von histopathologischen Lymphknotenpräparaten angewandt wurde.

#### **2.4.2.2 Die tatsächliche Doppelfärbung von AgNORs und Ki-67 bei histologischen Präparaten in der Humanmedizin**

Nach Kenntnis der Autorin existieren nur wenige Studien bei Menschen - insbesondere bei Patienten mit NHL -, die die Bedeutung unterschiedlicher Proliferationsmarker anhand einer tatsächlichen Doppelfärbung von AgNORs und Ki-67 untersucht haben. Hierfür wurden die Proliferationsmarker simultan d.h. auf dem gleichen histologischen Präparat angefärbt und beurteilt, damit die ermittelten Ergebnisse der einzelnen Proliferationsmarker zueinander in Beziehung gesetzt werden konnten und somit vergleichbar waren.

Untersuchungen bei 13 gefrorenen Gewebeschnitten von Patienten mit NHL zeigten eine signifikant höhere AgNOR Anzahl in Ki-67 positiven Zellen im Vergleich zu Ki-67 negativen Zellen (JANMOHAMED et al., 1990). Dies galt sowohl für an NHL erkrankte Menschen, die einen Tumor mit hohem Malignitätsgrad aufwiesen als auch für niedrige Malignitätsgrade (JANMOHAMED et al., 1990). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei oralen Karzinomen (COSTA et al., 1999) und Leberkarzinomen (NAGAO und ISHIDA, 1995) festgestellt. MUNAKATA und HENDRICKS (1994) bestätigten und erweiterten diese Resultate, indem sie sowohl für die AgNOR Anzahl als auch für die AgNOR Fläche von humanem Tonsillengewebe einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit Ki-67 positiven und negativen Zellen zeigten (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994).

Obwohl pathologisch- histologische Studien von humanen NHL eine Korrelation zwischen den Proliferationsmarkern AgNORs und Ki-67 nachgewiesen haben (HALL et al., 1988a) und sogar Ergebnisse von tatsächlichen Ki-67/AgNOR-Doppelfärbungen publiziert wurden (JANMOHAMED et al., 1990), existieren nach Kenntnis der Autorin in der Veterinärmedizin bis jetzt keine Veröffentlichungen von tatsächlichen Ki-67/AgNOR- Doppelfärbungen an lymphatischem Gewebe.

#### **2.4.2.3 Die tatsächliche Doppelfärbung von AgNORs und Ki-67 bei zytologischen Präparaten in der Humanmedizin**

Eine tatsächliche Doppelfärbung von AgNORs und Ki-67 wurde bisher nur bei wenigen zytologischen Präparaten unabhängig von der Gewebeart in der Humanmedizin durchgeführt. Nach Kenntnis der Autorin findet sich jedoch nur eine Veröffentlichung über eine tatsächliche zytologische Ki-67/AgNOR- Doppelfärbung

bei Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen (MOURAD et al., 1994). Diese Studie untersuchte insgesamt 10 FNAs, darunter 3 FNAs von Patienten mit Brustkrebs, 6 an Lymphom erkrankte Menschen und eine FNA eines Patienten mit einer reaktiven Hyperplasie (MOURAD et al., 1994). In diesem Artikel wurde jedoch nicht beschrieben, welches Gewebe mittels Feinnadelaspiration bei den Probanden mit lymphoproliferativen Erkrankungen zur Untersuchung und Anfärbung der Doppelfärbung entnommen wurde (MOURAD et al., 1994). Wie in den zuvor beschriebenen Studien an NHL erkrankten Menschen wendeten MOURAD et al. auch zuerst die Ki-67 Färbung und dann folgend die Silberfärbung an zytologischen Präparaten an (MOURAD et al., 1994). Entsprechend den vorangegangenen Veröffentlichungen über Doppelfärbungen von histologischen Präparaten von NHL Patienten konnten die Untersuchungen bei Brustkrebs- und Lymphompatienten ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der AgNOR Anzahl von Patienten mit Ki-67 positiven und negativen Zellen nachweisen (MOURAD et al., 1994). Der Proband mit der reaktiven Hyperplasie wies jedoch ähnliche Ergebnisse wie die Tumorpatienten auf und war somit von diesen nicht zu differenzieren (MOURAD et al., 1994).

ZAITOUN und EBBS (2000) verwendeten auch eine zytologische Ki-67/AgNOR-Doppelfärbung und bezogen neben der AgNOR Anzahl zusätzlich die AgNOR Fläche in ihre umfangreicheren Untersuchung von insgesamt 61 Brustkrebspatienten ein (ZAITOUN AM und EBBS SR, 2000). Sie fanden heraus, dass sich die AgNOR Fläche und die Anzahl der AgNORs/ Zelle bei Patienten mit Ki-67 positiven Zellen progressiv mit dem Erkrankungsgrad erhöhten (ZAITOUN AM und EBBS SR, 2000). Generell ist also eine Ki-67/AgNOR- Doppelfärbung bei FNAs von Lymphom- und Brustkrebspatienten realisierbar, die sogar mit den Ergebnissen von histopathologischen NHL Untersuchungen übereinstimmen.

#### **2.4.2.4 Die tatsächliche Doppelfärbung von AgNORs und Ki-67 in der Veterinärmedizin**

Nach Kenntnis der Autorin existieren weder bei Lymphomen noch bei anderen kaninen Geweben Veröffentlichungen über tatsächliche Doppelfärbungen von AgNORs und Ki-67 bei histologischen und zytologischen Präparaten in der Veterinärmedizin. KIUPEL et al. (1999) publizierten eine prognostische Studie

anhand von kaninen Lymphomen, in der die Silberfärbung bei formalinfixierten Präparaten und die Ki-67 Färbung an gefrorenen Gewebeschnitten angewandt wurde (KIUPEL, 1999). Vergleichbare Untersuchungen führten ETTINGER et al. (2006) bei kaninen Sarkomen durch (ETTINGER et al., 2006), sowie WEBSTER et al. (WEBSTER et al., 2007; WEBSTER et al., 2008) und SCASE et al. bei Mastzelltumoren von Hunden (SCASE et al., 2006).

Somit stellt die Kombination von AgNOR und Ki-67 Färbung in zytologischen Ausstrichen insbesondere an Lymphknotenpräparaten ein interessantes und neues Arbeitsgebiet für die Veterinärmedizin dar.



### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Eigene Untersuchungen**

Ziel dieser Studie war die Etablierung der AgNOR Färbung, sowie die quantitative Auswertung mit Hilfe eines computergestützten automatischen Bildanalysesystems bei Lymphknoten- FNAs basierend auf den Richtlinien des *International Committee on AgNOR Quantitation* (AUBELE et al., 1994; OFNER et al., 1995). Hierdurch sollten mit anderen Arbeitsgruppen vergleichbare Ergebnisse ermöglicht und eine objektive und reproduzierbare Auszählung und Vermessung der AgNORs zur Bewertung der Proliferationsaktivität erreicht werden.

Zur Auswertung dieser Präparate wurden die AgNOR- Anzahl und -Fläche herangezogen, da mindestens einer dieser Parameter eine sichere Unterscheidung zwischen benignen und malignen Geweben ermöglicht. Weiterhin sollte anhand dieser Parameter untersucht werden, ob eine Differenzierung zwischen neoplastischer, reaktiver bzw. entzündlicher Gewebeveränderung und physiologischem Gewebe bei FNAs aus Lymphknoten möglich ist.

In Kombination mit dem Proliferationsmarker Ki-67 sollten zusätzlich Informationen über das Proliferationsverhalten erhalten werden. Da diese Untersuchung nur aussagekräftig ist, wenn die gleichen Bereiche des zytologischen Präparates angefärbt und beurteilt werden, lag das Ziel dieser Studie in einer Doppelfärbung mit dem Ki-67 Antikörper und AgNORs.

Zuletzt sollte überprüft werden, ob die Proliferationsmarker AgNOR und Ki-67 als Screeningparameter zur Feststellung eines Lymphoms geeignet sind und somit eine Hilfestellung bei der Diagnose eines kaninen Lymphoms geben können.

#### **3.2 Patientengut**

In der Zeit von Februar 2003 bis Oktober 2005 wurden zur Bewertung des Proliferationsverhaltens von kaninen Lymphomen in der Klinik für Kleintiere der Justus- Liebig- Universität Gießen 101 Hunde, darunter 26 klinisch gesunde Hunde als Kontrollgruppe (n=26), 31 Tiere mit Lymphadenitiden (n=31), 25 mit reaktiven

Hyperplasien (n=25) und 19 Hunde mit Lymphomen (n=19) in die Untersuchung einbezogen. Diese Einteilung ermöglichte eine Differenzierung der Probanden in an Lymphom erkrankten Hunden und einer Nicht- Lymphomgruppe. Den überwiegenden Anteil der kaninen Proben stellten Überweisungspatienten der Klinik für Kleintiere der Justus- Liebig- Universität Gießen. FNAs von Lymphompatienten wurden zusätzlich mit freundlicher Unterstützung einer auf Onkologie spezialisierten privaten Klinik (Tierklinik Hofheim) zur Bearbeitung zugesandt. Weiterhin wurden Proben von Straßenhunden von der Autorin bei einer Kastrationsaktion der Münchener Tierschutzorganisation „Tiere des Südens e.V.“ in Griechenland gewonnen und in die Untersuchung einbezogen.

Proben von Hunden, die mit Glukokortikosteroiden oder Chemotherapie vorbehandelt waren, wurden in unserer Studie ausgeschlossen.

### **3.3 Die klinische Untersuchung der Patienten**

Der Allgemeinzustand der Tiere wurde im Rahmen der allgemeinen und speziellen klinischen Untersuchung beurteilt. Ein Patient wurde als gesund bewertet, wenn er klinisch unauffällig war, keine Lymphknotenvergrößerung aufwies und die Untersuchung der May- Grünwald/ Giemsa gefärbten Lymphknoten- FNAs der Morphologie eines physiologischen Lymphknotens (MESSICK, 2008) entsprach. In den Vorbericht gingen sowohl Rasse als auch Geschlecht der Hunde, sowie die Ergebnisse der klinischen Untersuchung ein. Eine Glukokortikosteroidbehandlung der Tiere vor Probenentnahme führte ebenso zum Ausschluss von der Studie wie eine chemotherapeutische Behandlung.

Die allgemeinen klinischen, sowie die weiterführenden labordiagnostischen Untersuchungen erfolgten im eigenen Haus und wurden von den Mitarbeitern der Klinik für Kleintiere der Justus- Liebig- Universität Gießen vorgenommen. Im Rahmen der weiterführenden Untersuchungen wurden in eigener Person die überwiegende Entnahme der Lymphknoten- FNAs, sowie die folgende Fixierung der FNAs zur Konservierung durchgeführt. Die anschließende Weiterverarbeitung der Proben durch spezifische Anfärbeverfahren, sowie die Bearbeitung und Auswertung der Proben wurden ausschließlich von der Autorin vorgenommen.

### 3.4 Geräte

Für die weiterführenden Untersuchungen - insbesondere die unterschiedlichen Färbeverfahren - kamen die nachfolgend aufgeführten Laborgeräte zum Einsatz:

#### **Technische Geräte:**

Analysewaage P160, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland

Wasserbad Aqualine GFL, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Absaugpumpe Eppendorf 4151, Med&IT Trading, Landshut, Deutschland

Mikrowelle Samsung M1712N, Schwalbach, Deutschland

Vortex Schüttler Heidolph REAX 2000, LABCON GmbH, Heppenheim, Deutschland

Brutschrank, LabMarket GmbH, Mannheim, Deutschland

#### **Geräte und Verbrauchsmaterialien:**

Färbesystem (Gestell und Glaskasten, wärmebehandelt), Reinke, Giessen,  
Deutschland

Pipetten, PreCision 0,5- 10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100- 1000 µl, 1000 µl, Biozym  
Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland

Pipettenspitzen, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland

Objektträger, geschnitten, Mattrand, 76x 26 mm, HenrySchein Vet (ehemals  
Heiland), Hamburg, Deutschland

Deckgläser, 24x 60 mm, HenrySchein Vet (ehemals Heiland), Hamburg, Deutschland

Glasschreiber, neoLab, Heidelberg, Deutschland

Spritze, 10 ml, inkl. Kanüle, HenrySchein Vet (ehemals Heiland), Hamburg,  
Deutschland

#### **Auswertung:**

Kamera:

Nikon Coolpix 5000, Nikon, Düsseldorf, Deutschland

Software zur digitalen Bildanalyse:

QUIPS, QGO/QWIN Software, Leica, Wetzlar, Deutschland

Statistische Auswertung:

MedCalc Version 9.0.1.1 für Windows, 1993-2006 Frank Schoonjans

Graph Pad Prism Version 4.00 für Windows, Graph Pad Software, San Diego

Kalifornien, USA

### **3.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

Für die Färbeverfahren fanden nachfolgend angeführte Chemikalien Verwendung:

#### **3.5.1 Übersichtsfärbung für zytologische Diagnostik**

##### **May- Grünwald/ Giemsa- Färbung:**

May- Grünwalds Eosin- Methylenblau, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Giemsa, Merck, Darmstadt, Deutschland

Aqua Bidest, Aqua Quick, Schwalbach, Deutschland

#### **3.5.2 AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung, sowie B- und T- Zell- Differenzierung**

##### **Fixierung:**

Merckofixspray, Merck, Darmstadt, Deutschland

Azeton, >99,5%, zur Synthese, Roth, Karlsruhe, Deutschland

##### **AgNOR Färbung:**

###### **Für Carnoysche Solution:**

Ethanol, vergällt, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Essigsäure/ Eisessig, 100%, zur Analyse, Roth, Karlsruhe, Deutschland

###### **Für Silberlösung:**

Gelatine, Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland

Ameisensäure, 100%, Merck, Darmstadt, Deutschland

Silbernitrat, Merck, Darmstadt, Deutschland

**Immunreagentien:****Primäre Antikörper:**

CD79a, Monoklonal Maus Anti- Human, Klon HM57, Isotyp IgG1, Kappa,  
Dako, Hamburg, Deutschland

CD3, Monoklonal Maus Anti- Human, Klon PC3/188A, Isotyp IgG1, Kappa,  
Dako, Hamburg, Deutschland

MIB-1 (Ki-67 Antigen), Monoklonal Maus Anti- Human, Klon MIB-1, Isotyp IgG1,  
Kappa, Dako, Hamburg, Deutschland

**Verdünnungsmedium für die primären Antikörper:**

Antibody diluent with background reducing components, AK- Verdünner,  
Dako, Hamburg, Deutschland

**Sekundärer Antikörper:**

Kaninchen Anti- Mausimmunglobuline, Brücken- AK, Dako,  
Hamburg, Deutschland

**APAAP- Färbung:****Für Vorbehandlung:**

Salzsäurealkohol, 1%, Merck, Darmstadt, Deutschland

TBS (Tris buffered saline), pH 7,6, Verdünnungs- und Puffersubstanz,  
Dako, Hamburg, Deutschland

Methanol, <99%, Merck, Darmstadt, Deutschland

**Für Citratpuffer:****Stammlösung A:**

Zitronensäure- Monohydrat, >99,5%, p.a., Roth, Karlsruhe, Deutschland

**Stammlösung B:**

Natriumcitrat, Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland

Fast Red Substrate Systeme, Dako, Hamburg, Deutschland

New Fuchsin Substrate System, Dako, Hamburg, Deutschland

Mayers Hämalunlösung, Merck, Darmstadt, Deutschland

### **3.6 Methodik**

Die Beschreibung der Methodik erfolgt jeweils für die AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung sowie für die B- bzw. T- Zell- Differenzierung der Lymphome in 3 Arbeitsschritten:

1. Etablierung der Methodik
2. Beschreibung des Färbeverfahrens
3. Beschreibung der Auswertung

Die AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung sollte eine Beurteilung der durchschnittlichen AgNOR- Anzahl und -Fläche/ Zelle, sowie der prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen bei FNAs kaniner Lymphknoten in denselben Bereichen eines Präparates ermöglichen, so dass eine Analyse dieser unterschiedlichen Marker in der gleichen Zelle möglich ist und die Ergebnisse der Proliferationsmarker dadurch vergleichbar werden.

#### **3.6.1 Etablierung der Methodik für die AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung**

Zur Etablierung der Doppelfärbung waren Vorversuche notwendig, die im Folgenden kurz erläutert werden:

##### **3.6.1.1 Fixierung der Proben**

Die unterschiedlichen Fixierungen wurden jeweils bei einer alleinigen Ki-67- sowie für eine alleinige AgNOR Anfärbung getestet, um die Auswirkungen auf die einzelnen Proliferationsmarker bewerten zu können. Anfänglich wurden die Proben für 10 Minuten mit 95%igem Ethanol fixiert, jedoch konnten nur bei frischen Präparaten gute Resultate in Bezug auf die Anfärbbarkeit der AgNORs erzielt werden. Schon nach wenigen Tagen der Lagerung waren bei der überwiegenden Mehrzahl der Ausstriche keine AgNORs mehr anfärbbar, weshalb diese Art der Fixierung für den Proliferationsmarker Ki-67 nicht getestet wurde.

Des Weiteren erfolgte eine 10- minütige Azetonfixierungen (> 99,5%) der Präparate, jedoch waren die AgNORs dieser Lymphomproben weniger klar umgrenzt und merklich geringer bzw. weniger deutlich schwarz gefärbt im Gegensatz zur schneller anwendbaren Sprühfixierung mit Merckofix. Die Resultate der Ki-67 Anfärbung waren sowohl für eine Azeton- als auch für eine Merckofixfixierung der FNAs gleich gut.

Die Azetonfixierung entsprach aber nicht dem Standardprotokoll des *International Committee on AgNOR Quantitation*, das für die Silberfärbung von FNAs Ethanol oder Merckofix empfiehlt (AUBELE et al., 1994).

Im Rahmen der Vorversuche für die AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung ist deutlich geworden, dass eine Fixierung der zytologischen Lymphknotenpräparate mit Merckofix notwendig war, um eine Konservierung der FNAs in Bezug auf die AgNOR Anfärbbarkeit zu ermöglichen. Idealerweise sollte die Merckofixfixierung der Lymphknotenausstriche sofort nach dem Trocknen der Proben (auf den Objektträgern) durchgeführt werden, spätestens jedoch innerhalb von 24 Stunden. Somit konnten die fixierten Präparate entsprechend den Richtlinien des Standardprotokolls für Silberfärbungen (AUBELE et al., 1994; TRERE, 2000) bei Dunkelheit (im Objektträgerkasten) und 37°C Raumtemperatur (abgesehen von jahreszeitlich bedingten Schwankungen) bis maximal 7 Monate, Ausnahmen sogar bis zu 18 Monaten, gelagert werden.

### **3.6.1.2 Erstellung der geeigneten Gebrauchsverdünnungen durch Titration**

Weiterhin wurde durch Verdünnungsreihen die optimale Konzentration des MIB-1 Antikörpers gegen den Proliferationsmarker Ki-67 festgestellt. Die höchste Verdünnung, die die stärkste Immunreaktivität bewahrt, wird als „optimale Verdünnung“ bezeichnet. Die Verdünnung des MIB-1 Antikörpers erfolgte mit einem Antikörpervedünnungsmittel (Antibody diluent with background reducing components, Dako), das eine Hintergrundreduzierende Komponente aufwies (BOENISCH et al., 2003). Die Verdünnungsstufen wurden in 25iger Schritten von 1:25 bis 1:150 untersucht. Das Titrationsergebnis ergab eine gute Anfärbbarkeit bei einer Antikörpervedünnung von 1:50.

Anfänglich fand ein Testkitsystem (Dako) mit fertig angemischten Komponenten des Brückenantikörpers und APAAP Verwendung. Die Konzentrationen beider Komponenten wurden im Beipackzettel nicht angegeben - sie lagen nach Angaben der Dako Mitarbeiter jedoch ungefähr bei 1:25 -, weshalb eine Titration dringend erforderlich war. Laut Herstellerempfehlung der Firma Dako sollte bei Färbeprotokollen für zytologische Präparate die optimale Konzentration von APAAP 1:50- 1:100 und für den Brückenantikörper 1:25- 1:50 betragen. Als

Verdünnungsmedium wurde hierfür TBS (Tris buffered saline, Dako) empfohlen (BOENISCH et al., 2003). Folglich erschienen die gewählten Verdünnungsstufen von 1:25 und 1:50 für den Brückenantikörper und APAAP sinnvoll. Die Verdünnungen wurden sowohl bei einer alleinigen Ki-67- Färbung als auch bei einer AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung getestet. Die Einzel- und Doppelfärbung zeigten für die Brückenantikörper- und APAAP- Verdünnung von 1:50 eine nur schwache rote Anfärbung der Ki-67 positiven Zellen. Folglich lagen die optimalen Färberesultate für den Brückenantikörper und APAAP bei einer Konzentration von 1:25.

Im Testkitsystem befand sich weiterhin Fast Red (Dako), das jedoch den Zellkern der Ki-67 positiven Zellen nur grobkörnig färbte. Im Rahmen von späteren Untersuchungen zur besseren Anfärbbarkeit von B- und T- Zellen bei FNAs wurde Neufuchsin (Dako) und Fast Red (Dako) bei verschiedenen Verdünnungsstufen des Brückenantikörpers und APAAP vergleichend getestet. Neufuchsin erzeugte dort eine feinkörnigere und kräftigere rote Kernfärbung im Gegensatz zu Fast Red und wurde deshalb auch für den Proliferationsmarker Ki-67 eingesetzt, der ebenfalls besser angefärbte Resultate mit Neufuchsin bei einer Brückenantikörper- und APAAP- Verdünnung von 1:25 zeigte.

### **3.6.1.3 Bläuen der Ki-67- Färbung**

In der alleinigen immunzytologischen Ki-67 Färbung wurden nur die Ki-67 positiven Zellen mit Hilfe von Neufuchsin oder Fast Red angefärbt. Die Ki-67 negativen Zellen blieben unmarkiert und waren somit nicht sichtbar, weshalb eine Gegenfärbung erforderlich wurde. Hierfür wurde Mayers Hämalaunlösung (Merck) verwendet, da sie kompatibel mit den Chromogenen Neufuchsin und Fast Red ist (BOENISCH et al., 2003).

Nachdem Mayers Hämalaunlösung auf die Objektträger aufgebracht worden war, erfolgte ein Bläuen der Zellen in Leitungswasser, d.h. mit Hilfe der Verweildauer der Proben in Leitungswasser konnte die Intensität der Blaufärbung der Zellen im Allgemeinen und der Einfluss auf die roten Ki-67 positiven Zellen im Speziellen untersucht werden. Bläuungsintervalle von wenigen Sekunden, 2 Minuten, 5 Minuten, 10 Minuten, 15 Minuten und 20 Minuten wurden getestet. Ein kurzes Bläuen rief hierbei eine genauso blaue Färbung der Ki-67 negativen Zellen hervor wie ein



längeres Bläuen. Es zeigte sich, dass das Bläuen keinen negativen Einfluss auf die positive rote Markierung des Proliferationsmarkers hatte. Die Ki-67 negativen Zellen wurden auch bei kurzem Bläuen ausreichend blau angefärbt, weshalb für unser Färbeprotokoll die kurze Variante des Bläuens gewählt und das gefärbte Präparat nur kurz mit Leitungswasser abgespült wurde.

#### **3.6.1.4 Kochen der Proben**

Der Proliferationsmarker Ki-67 ist ein intranukleärer Antikörper, dessen Anfärbung eine Mikrowellenbehandlung erfordert (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994).

Die einzigen 2 Studien in der Literatur, die eine zytologische Doppelfärbung bei humanen Präparaten vorgenommen hatten, nutzten ein anderes Färbesystem, die Avidin- Biotin- Peroxidase- Methode (ABC) (MOURAD et al., 1994; ZAITOUN AM und EBBS SR, 2000), weshalb auf histologische Färbeprotokolle von Ki-67/AgNOR-Doppelfärbungen zurückgegriffen wurde. Hier verwendeten die Autoren ein 3x 5-minütiges Kochen der Proben in 10mM Zitratpuffer mit anschließendem Abkühlen der Proben im gleichen Puffer (COSTA et al., 1999; NAGAO und ISHIDA, 1995).

Entscheidend für die Anfärbarkeit von Ki-67 war demnach ein Kochen der Proben in Zitratpuffer, der mit Hilfe einer Mikrowelle erhitzt wurde. Jedoch platzten die handelsüblichen Glasfärbetröge während des Kochvorgangs, weshalb eine spezielle Hitzebehandlung der Gefäße (Firma Reinke, Giessen) erforderlich war. Sobald der Zitratpuffer im wärmebehandelten Färbetrog kochte, wurden in 1- minütigem Abstand über insgesamt 15 Minuten Objektträger entnommen und nach Abkühlen im gleichen Puffer routinemäßig weiter angefärbt. Eine Ki-67 Färbung war vorhanden, wenn die Proben mindestens 9, höchstens jedoch 14 Minuten köchelten. Optimale Färberesultate lieferte eine Kochzeit von insgesamt 11 Minuten.

Das Verkochen des Zitratpuffers führte zum Austrocknen der Proben und sollte unter allen Umständen verhindert werden, so dass Intervalle von 5 Minuten gewählt wurden, in denen der verdunstete Zitratpuffer mit heißem Puffer aufgefüllt werden konnte. So ergab sich ein Kochintervall von 3x 5 Minuten+ 2 Minuten.

### **3.6.1.5 Die AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung**

Entscheidend war auch die Frage, ob zuerst die AgNOR- oder die Ki-67- Färbung durchgeführt werden sollte.

Jegliche Versuche, in denen zuerst die Ki-67 Färbung und anschließend eine AgNOR Färbung angewandt wurden, scheiterten, weil die braun- schwarze Silberfärbung die rötliche Immunfärbung überlagerte. Die schwarzen AgNORs konnten durch die braune Färbung der gesamten Zellen nicht gut differenziert werden.

Waren die AgNORs aber ersteinmal mit Hilfe der Silberfärbung schwarz markiert, fand keine Veränderung durch eine folgende Immunfärbung statt. Die Ki-67 positiven Zellen wurden deutlich rot markiert und die Ki-67 negativen Zellen wurden durch die Mayers Hämalaunlösung- Gegenfärbung eindeutig blau gefärbt. Folglich wurde zuerst die AgNOR- und anschließend die Ki-67- Färbung durchgeführt.

### **3.6.2 Beschreibung des Färbeverfahrens für die AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung**

Basierend auf den Resultaten dieser Vorversuche, sowie in Anlehnung an die Richtlinien zur AgNOR Quantifizierung des *International Committee on AgNOR Quantitation* (1993), die ein standardisiertes Färbe- und Auswertprotokoll festlegen (AUBELE et al., 1994; OFNER et al., 1995) wurde folgendes Färbeprotokoll ausgearbeitet:

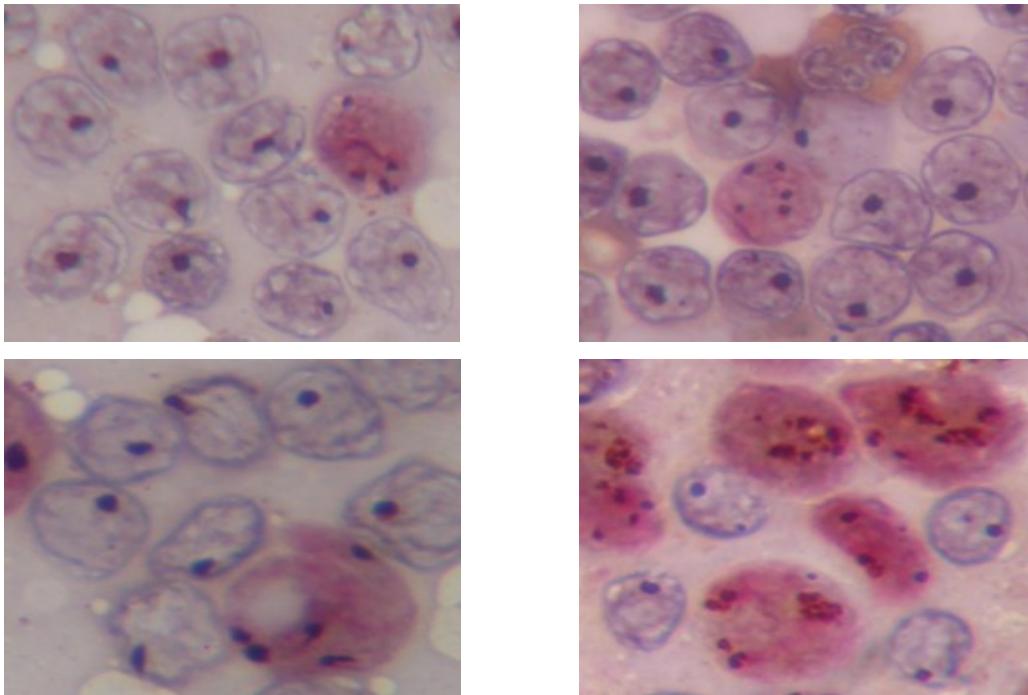
**Tabelle 4: Färbeprotokoll der AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung**

Nr.	Arbeitsschritt	Firma	Zeit + Temp.
1	<b>Fixierung:</b> Objektträger Luft trocknen lassen Fixieren mit Merckofix- Spray Luft trocknen lassen	(Merck)	
2	<b>AgNOR Färbung</b> (anhand der Richtlinien zur AgNOR Quantifizierung): Herstellen einer <i>Carnoy'schen Solution</i> d.h. Ethanol und Eisessig im Verhältnis 3:1 mischen Objektträger darin nachfixieren	(Roth)	30 Min
3	Überführen in eine absteigende Alkoholreihe: Ethanol 99,5% Ethanol 70% Ethanol 50%	(Roth)	3 Min 3 Min 3 Min
4	Wässern in Aqua bidest	(WDT)	3 Min
5	Silbernitratlösung herstellen (jeweils für 4 Objektträger): zu 100ml Aqua Bidest 0,66g Gelatine geben, so dass eine 0,66%ige Gelatinelösung entsteht anschließend 33ml reine Ameisensäure hinzufügen, so dass eine 0,33%ige End- Lösung hergestellt wird Aus dieser Stammlösung nimmt man 10ml und gibt 3,3g Silbernitrat hinzu, so dass eine 33%ige Endlösung entsteht in der die Objektträger bei Dunkelheit gefärbt werden (Kurz vor Gebrauch komplexieren, da Silbernitrat schnell löslich ist)	(Sigma)	37°C Wasserbad  37°C Brutschrank 12 Min
6	Waschen in Aqua bidest	(WDT)	2x 5 Min
7	<b>Ki-67 Färbung</b> <b>Vorbehandlung:</b> Vorbehandeln in 1%igem Salzsäurealkohol	(Roth)	1 Min
8	Spülen mit TRIS	(Dako)	5 Min
9	Überführen in eiskaltes Methanol	(Merck)	10 Min
10	Spülen mit TRIS	(Dako)	5 Min
11	10mM Zitratpuffer mit pH 6,0 herstellen aus 9,0ml Stammlösung A (0,1M Zitronensäure, d.h. 21,01g in 1000ml Aqua bidest) und 41,0ml Stammlösung B (0,1M Natriumcitrat, d.h. 29,41 g in 1000ml Aqua bidest) und 450ml Aqua bidest Objektträger in Zitratpuffer geben und diese in der Mikrowelle kochen	(Roth) (Merck) (WDT)	600 W 3x 5 Min + 2 Min
12	Abkühlen auf Raumtemperatur		20 Min
13	Waschen in TRIS	(Dako)	5 Min

14	<b>Immunzytologische Färbung:</b> Inkubieren mit Primärantikörper Ki-67 in einer Verdünnung von 1:50	(Dako)	30 Min
15	Spülen mit TRIS	(Dako)	2x 5 Min
16	Inkubieren mit Brücken- Antikörper 1:25	(Dako)	30 Min
17	Spülen mit TRIS	(Dako)	2x 5 Min
18	Inkubieren mit APAAP In einer Verdünnung von 1:25	(Dako)	30 Min
19	Spülen mit TRIS	(Dako)	2x 5 Min
20	Herstellen der Neufuchsin- Lösung mittels Substrat: 2 Tropfen von Flasche A (TRIS) auffüllen auf 2 ml Aqua bidest, dann 1 Tropfen von Flasche B (Substrat Konzentrat) hinzugeben und mischen Chromogen: 1 Tropfen von Flasche C (Neufuchsin) mit 1 Tropfen von Flasche D (Aktivator) mischen Anschließend Substrat und Chromogen mischen und auf die Objektträger geben	(Dako)	3 Min 20 Min
21	Spülen mit TRIS	(Dako)	5 Min
22	Gegenfärben mit Mayers Hämalaun	(Roth)	45 s
23	Bläuen in Leitungswasser bis das Wasser klar ist		
24	Trocknen lassen der Objektträger		

Um äußere Einflussfaktoren so gering wie möglich zu halten, wurde eine konstante Raumtemperatur von 23 °C mit Hilfe einer Klimaanlage gewählt und die Abfolge der einzelnen Arbeitsschritte zeitlich exakt eingehalten.

Für die Färbung mußten die FNAs auf den Objektträgern markiert werden. Hierfür wurde mit Hilfe eines Glasschreibers ein Kreis um die anzufärbenden Areale auf die gläsernen Objektträger geritzt. Zum Auftragen der Antikörper und für die dazwischen liegenden Waschschrte wurden die Objektträger auf ein Tablett gelegt, die Lösungen als liegender Tropfen auf die vorgeritzten Objektträgerareale pipettiert und nach der Inkubationszeit abgesaugt. Mit Hilfe der Silberfärbung ließen sich die AgNORs zytologischer Lymphknoten- FNAs sehr deutlich als schwarze Punkte in den Nukleoli darstellen, was eine gute Voraussetzung für die computergestützte digitale Bildanalyse war. Weiterhin zeigte die AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung eindeutig rote Ki-67 positive und blaugefärbte Ki-67 negative Zellen, die ein einfaches Auszählen der Ki-67 positiven Zellen ermöglichte.



**Abbildung 3: AgNOR/Ki-67 Doppelfärbung:** positiv rot gefärbte Ki-67 positive Zellen und blaue Ki-67 negative Zellen mit schwarzen AgNORs

Bild oben links: physiologisches Lymphknotenpräparat

Bild oben rechts: Lymphadenitis mit segmentkernigem Granulozyt

Bild unten links: reaktive Hyperplasie

Bild unten rechts: Lymphom

### 3.6.3 Konservierung der AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung

Die angefärbten Objektträgerpräparate wurden mit Hilfe eines Mikroskops mit aufgesetzter digitaler Kamera bei Ölimmersion unter 1000- facher Vergrößerung fotografiert. Die Aufnahmen wurden kurz nach Anfärbung der AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung angefertigt, da die AgNORs nur eine begrenzte Halbwertszeit aufwiesen. Anschließend wurden die digitalen Bilder zur Konservierung und für die später folgende Auswertung der Zellen auf CD gebrannt und somit archiviert.

### **3.6.4 Etablierung der Methodik für die B- bzw. T- Zell- Differenzierung**

Zur Etablierung der immunzytologischen B- bzw. T- Zell- Differenzierung bei Hunden mit Lymphomen waren Vorversuche notwendig, die im Folgenden kurz erläutert werden:

#### **3.6.4.1 Fixierung der Proben**

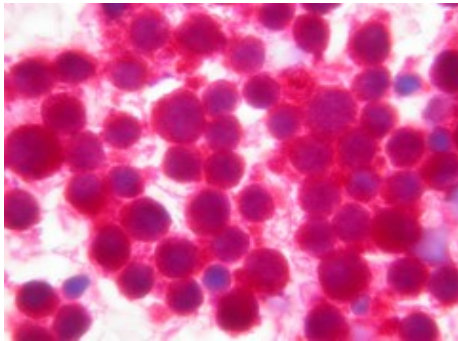
Zur Fixierung der kaninen Lymphknoten- FNAs ist eine zehninminütige Azetonbehandlung notwendig, wie sie für immunzytologische Färbungen gebräuchlich ist (BOENISCH et al., 2003). FNAs von Hunden mit Lymphomen wurden sofort nach der Fixierung, sowie Tage, Wochen und Monate später mit CD3 als T- Zell- Marker und CD79a als B- Zell- Marker angefärbt. Im Gegensatz zur langen Konservierungszeit und damit Anfärbbarkeit der AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung war die B- bzw. T- Zell- Differenzierung nur bis zu 14 Tage nach Fixierung der Präparate möglich und stellte somit einen limitierenden Faktor für die auszuwertenden kaninen Lymphomproben dar.

#### **3.6.4.2 Kreuzreaktivität des Primärantikörpers**

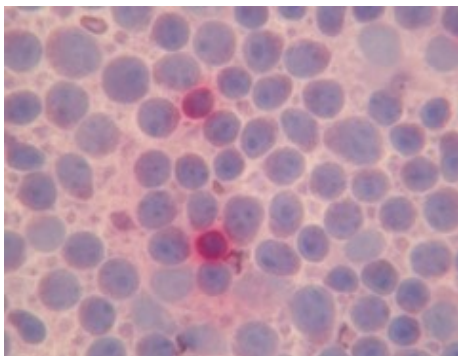
Für die B- bzw. T- Zell- Differenzierung der Lymphompatienten ist anhand von Vorversuchen die Kreuzreaktivität der Primärantikörper mit kaninen lymphatischen Zellen festgestellt worden, da die Spezifität des verwendeten Antikörpers nicht für Hunde getestet war. Hierfür wurden gleichzeitig FNAs und Biopate aus den gleichen regionären Lymphknoten bei Hunden mit Lymphomen entnommen. Die FNAs wurden von der Autorin mit den Primärantikörpern CD3 und CD79a (Dako) anhand des eingangs beschriebenen immunzytologischen Protokolls angefärbt. Die Biopate hingegen wurden in der Veterinärpathologie der Justus- Liebig- Universität immunhistologisch gefärbt. Es zeigte sich, dass eine immunzytologische Färbung der Lymphknotenpräparate möglich war und dass die FNAs und die Biopate die gleichen Resultate für eine B- bzw- T- Zell- Differenzierung bei Hunden mit Lymphomen aufwiesen.

In Anlehnung an vorherige Studien (KIUPEL, 1999) wurde nach erfolgreich getesteter Kreuzreaktivität zur Bestimmung des Immunphänotyps CD3 als T- Zell- Marker, sowie CD79a zur B- Zell- Bestimmung angewandt. Alle Lymphome wurden doppelt identifiziert. Die B- Zell- Lymphome reagierten positiv mit dem CD79a- und

negativ mit dem CD3- Marker. Alle als T- Zell- Tumoren klassifizierten Lymphome reagierten positiv mit dem CD3- AK und negativ mit dem CD79a- AK. Eine positive Antikörpermarkierung der APAAP- Färbung wurde folglich durch ein leuchtend rotes Endprodukt gekennzeichnet, während eine negative Reaktion bedingt durch die Mayers Hämalaun Gegenfärbung nur eine Blaufärbung der Zellen hervorrief.



**Abbildung 4: CD79a positiver Marker bei FNA eines B- Zell- Lymphompatienten**



**Abbildung 5: CD3 negativer Marker bei FNA eines B- Zell- Lymphompatienten mit 2 einzelnen CD3 positiven Zellen**

#### **3.6.4.3 Erstellung der geeigneten Gebrauchsverdünnungen durch Titration**

Die optimale Antikörperkonzentration für die B- bzw. T- Zell- Differenzierung (Anti CD79a und CD3) in FNAs von Hunden mit Lymphomen wurde mittels Verdünnungsreihen ermittelt. Als Verdünnungsmedium für die primären Antikörper eignete sich ein Antikörperverdünner mit Hintergrund reduzierenden Eigenschaften (Antibody diluent with background reducing components, Dako) (BOENISCH et al., 2003). Verdünnungsstufen von 1:50, 1:75 und 1:100 wurden für beide primäre Antikörper mit dem Testkittsystem untersucht. Das Titrationsverfahren ergab eine

optimale Anfärbbarkeit bei einer CD3 Konzentration von 1:75 und einer CD79a Konzentration von 1:50.

Später erfolgte eine Validierung der Brückenantikörper- und APAAP- Konzentration bei einem T- Zell- positiven Lymphompatienten. Hierfür wurde zum einen die CD3 Konzentration in 25iger Schritten von 1:50- 1:150 bei einer Brückenantikörper- und APAAP- Konzentration von 1:25 getestet. Zum anderen erfolgte eine Untersuchung der Brückenantikörper- und APAAP- Konzentration von 1:25- 1:200, wobei die Intervalle wieder in 25iger Schritten gewählt wurden, bei einer CD3 Konzentration von jeweils 1:75 und 1:150.

Die Bestimmung der CD3 Konzentration bei gleicher Brückenantikörper- und APAAP- Konzentration zeigte bei einer Verdünnung von 1:50 sowohl extrem stark angefärbte positive T- Zellen als auch eine sehr intensive Rotfärbung des Hintergrundes, so dass die gesamte Färbung wie eine einzige rote Masse erschien. Die optimale Konzentration lag bei 1:75, da die positiv markierten T- Zellen in dieser Verdünnung das beste Färberesultat in Bezug auf Farbintensität und Zellabgrenzung lieferten.

Die Variation der Brückenantikörper- und APAAP- Konzentrationen bei gleicher Antikörperkonzentration zeigten keine großen Unterschiede in Anfärbung und Intensität der Zellen. Lediglich bei einer Konzentration von 1:200 konnte fast keine Anfärbung der Zellen gesehen werden.

Insgesamt erzielte eine Konzentrationserhöhung von CD3 bessere Färberesultate als Erhöhungen der Brückenantikörper- und APAAP- Konzentrationen, denn die geringere CD3 Konzentration von 1:150 verursachte im Gegensatz zur Verdünnung von 1:75 bei gleicher Brückenantikörper- und APAAP- Konzentration weniger intensiv rote, aber immer noch erkennbar positive Anfärbungen der Zellen.

Zuletzt wurden T- Zell- Lymphom positive FNAs (CD3 1:75) vergleichend mit Neufuchsin und Fast Red bei selbst hergestellten Brückenantikörper- und APAAP- Verdünnungen von 1:25, 1:50, 1:75 und 1:100, sowie mit den fertig angemischten Komponenten des Testkitsystems, die Konzentrationen von jeweils ungefähr 1:25 für den Brückenantikörper und APAAP aufwiesen, angefärbt.

Alle Brückenantikörper- und APAAP- Konzentrationen zeigten hierbei gute Färberesultate. Die Farbintensität der positiven T- Zell- Lymphom FNAs war mit



Neufuchsin jedoch stärker als mit Fast Red. Weiterhin markierte Fast Red den Zellkern der positiven T- Zell- Lymphome nur grobkörnig, wohingegen Neufuchsin eine feinkörnigere und kräftigere rote Kernfärbung erzeugte.

In Ermangelung an Präparaten konnte dies alles nur für den Primärantikörper CD3 untersucht werden.

### **3.6.5 Beschreibung des Färbeverfahrens für die B- bzw. T- Zell-**

#### **Differenzierung**

Die Färbung der B- bzw. T- Zell- Differenzierung von kaninen Lymphomen entspricht dem Färbeprotokoll (Schritt 14 bis 24) der AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung zwecks synchroner Färbeverfahren.

Der Immunphänotyp der Lymphome wurde basierend auf der Mehrzahl und Verteilung der CD3 bzw. CD79a positiven Zellen bestimmt. Eine positive CD79a bzw. CD3 Antikörpermarkierung zur B- bzw. T- Zell- Differenzierung der kaninen Lymphompräparate wurde durch ein leuchtend rotes Endprodukt gekennzeichnet, während eine negative Reaktion bedingt durch die Mayers Hämalaun Gegenfärbung nur eine Blaufärbung der Zellen hervorrief.

#### **3.6.5.1 Anzahl der benötigten Objektträger**

Ein Minimum von 3- 5 Lymphknoten- FNAs von ausreichender Qualität wurde zur morphologischen Diagnosefindung mittels May- Grünwald/ Giemsa Färbung, sowie für die AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung inklusive B- bzw. T- Zell- Differenzierung zur Auswertung eines kaninen Lymphoms benötigt. Mindestens 2 Ausstriche wurden hingegen für eine Anfärbung von Nicht- Lymphompatienten benötigt.

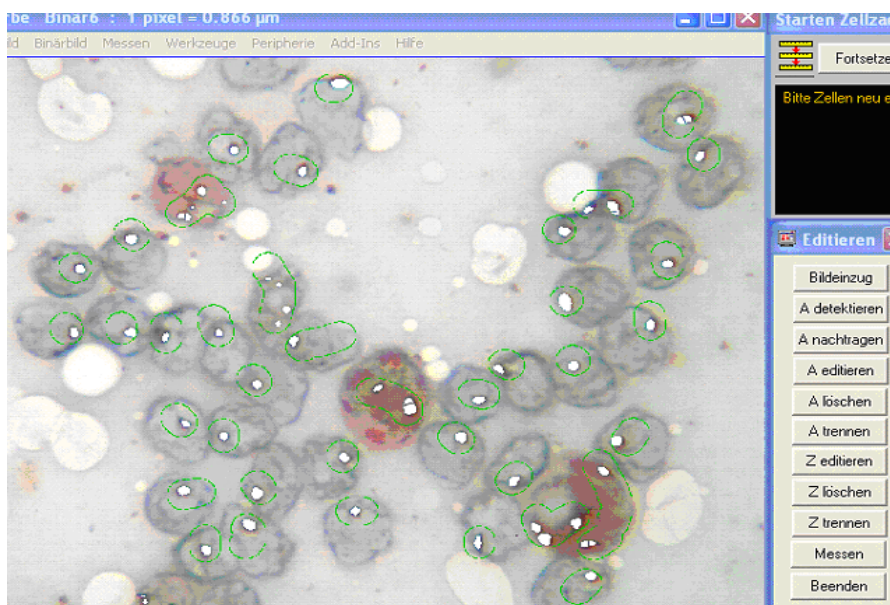
#### **3.6.5.2 Kontrollen**

Das Mitführen von positiven und negativen Kontrollen war für alle immunzytologischen Verfahren unerlässlich. Verwendet wurden hierfür Lymphknoten- FNAs von kaninem lymphatischen Gewebe. Als Positivkontrolle für die Lymphozyten- spezifischen Antikörper wurde jeweils mindestens 1 Präparat eines zuvor positiv angefärbten Lymphknoten- Feinnadelaspirates der AgNOR/Ki-67-

Doppelfärbung, sowie für Lymphome eine positive und negative Probe einer B- bzw. T- Zell- Differenzierung eingesetzt. Zu berücksichtigen ist, dass alle auszuwertenden Präparate gleichzeitig in einer Tagescharge angefärbt wurden, wobei das Mitführen eines zuvor positiv bewerteten Kontrollpräparates als Vergleichs- bzw. Kontrollwert diente, sowie Beweis für eine gelungene Färbung war.

### 3.6.6 Beschreibung der Auswertung der AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung

Grundlage der Auswertung war ein Basis- Bildanalyse- Programm namens QWin-plus der Firma Leica (Darmstadt) in Verbindung mit einer speziell auf die Erfordernisse unserer Präparate entwickeltes und angepasstes Makros, im Folgenden kurz Quips genannt. Mit Hilfe dieses Makros war es dem Untersucher möglich, die Zellkerne mit darin liegenden AgNORs zu segmentieren, auszumessen und zu zählen.



**Abb. 6: Bildbearbeitungsprogramm Leica QWin** mit weiß markierten AgNORs in grün umrandeten ausgezählten Zellen. Ki-67 positive Zellen sind rot markiert, Ki-67 negative Zellen sind blau gefärbt.

Zudem konnte der Anwender im Falle fälschlicherweise als AgNORs gezählter Artefakte oder wenn die AgNORs nicht als Einzelpunkte, sondern als Aggregate (Cluster) vorlagen, manuell in die Bildanalyse eingreifen.

Bewertet wurden die Proliferationsmarker AgNOR und Ki-67 anhand der durchschnittlichen AgNOR Anzahl/ Zelle, der durchschnittlichen AgNOR Fläche/ Zelle und der prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen in kaninen Lymphknoten- FNAs. Mindestens 100 Zellen einer Zellklasse wurden pro Patient untersucht, d.h. ca. 4 qualitativ gute Bilder mit durchschnittlich je 25 Zellen wurden mittels halbautomatischem computergestützten Bildanalyzesystem bearbeitet.

### **3.6.6.1 Erfassung der Parameter**

#### **AgNORs**

Die Erfassung der AgNORs erfolgte in unserer Studie mit Hilfe der QWin/ QGo und QUIPS modifizierten Software von Leica im Rahmen einer halbautomatischen Auswertung der AgNORs. Generell wurden die AgNOR- Anzahl und -Fläche mit Hilfe des Computerprogramms automatisch markiert, jedoch mussten die Zellen einzeln mit Mausclick zur Zellzählung vom Untersucher markiert werden. Lagen die AgNORs nicht als Einzelpunkte, sondern als Aggregate (Cluster) vor, musste ebenfalls manuell in die Bildanalyse eingegriffen werden und die Aggregate wurden von Hand getrennt.

Im speziellen wurde für die computertechnische Bildanalyse zuerst ein geeignetes Bild aus einer Reihe von auf CD gespeicherten Bildern ausgewählt. Dieses sollte bestimmte Grundvoraussetzungen zur schnellen und unkomplizierten Berarbeitung erfüllen. Erforderlich war ein ausreichend hoher Kontrast zwischen Zellen und Hintergrund und die Zellen sollten idealerweise im Monolayer nebeneinander liegen. Anschließend wurde das ausgewählte Bild in QWin importiert, indem eine Bilddatei von Festplatte bzw. CD oder USB- Stick geladen wurde, um dann folgend aus der Windows- Zwischenablage eingeführt zu werden. QWin ist Leicas Bildanalysewerkzeug, das unter der Standardbenutzeroberfläche Microsoft Windows läuft.

Durch Anklicken des Buttons „Bildeinzug“ startete das Bildverarbeitungsprogramm, und das farbige Foto wurde in ein Schwarz- Weiß- Foto - dem sogenannten „Grauwertbild“ - umgewandelt, welches die Grundlage für die Bearbeitung darstellte. Erst dann erfolgte die Zählung und Ausmessung der AgNORs durch einzelnes

Auswählen der Funktionen „AgNORs detektieren“, „nachtragen“, „löschen“ oder „trennen“ per Mausclick.

Mit der Funktion „AgNORs detektieren“ (d.h. zählen), wurden die AgNORs markiert. Waren die Grauabstufungen des Grauwertbildes nicht deutlich genug, konnte das Programm die AgNORs nicht exakt erfassen und eine Änderung des Bildes durch Verbesserung der Bildkontraste wurde erforderlich. Hierfür mussten Schwellenwerte für die Grauwerte von Hand eingegeben bzw. in einem Diagramm verschoben werden. Durch Bestätigung von „AgNOR Detektion OK „ oder „Nicht OK“ konnten die Schwellenwerte erneut verändert oder zum nächsten Schritt der Bildbearbeitung - „AgNORs nachtragen“ - gewechselt werden. Da nur in den wenigsten Fällen eine komplette Erfassung aller AgNORs gelang, mussten die fehlenden AgNORs nachgetragen werden. Dies bedeutete, dass nacheinander um jeden vom Computerprogramm nicht erfaßten AgNOR durch Mausclick ein Rahmen gezogen wurde, wodurch ein erneutes automatisches Zählen der AgNORs erfolgte. Ebenfalls konnte auch ein Rahmen um eine Gruppe von nicht erfaßten AgNORs gelegt werden. War dennoch eine Erkennung der AgNORs unmöglich, konnte auch hier durch Bestätigung von „AgNOR Detektion OK“ oder „Nicht OK“ die Schwellenwerte so oft verändert werden, bis eine exakte Markierung der AgNORs möglich wurde. Fehlerhaft markierte AgNORs, d.h. zu große oder zu kleine AgNOR- Markierungen bzw. Markierungen von Artefakten, konnten mit der Funktion „AgNORs löschen“ entfernt und anschließend mit „AgNORs nachtragen“ erneut bearbeitet werden. Lagen die AgNORs nicht als Einzelpunkte, sondern als Aggregate (Cluster) vor, wurden diese mit der Funktion „AgNORs trennen“ durch Einzeichnen einer Trennungslinie mit der Maus getrennt. Ebenso konnten die Cluster aber auch mit der Kombination „AgNORs löschen“, gefolgt von „AgNORs nachtragen“ neu vermessen werden.

In einem weiteren Schritt wurden die Zellen durch Anklicken von Funktionen wie „Zellen editieren“, „löschen“ oder „trennen“ bearbeitet.

Die Funktion „Zellen editieren“, ermöglichte eine Zellzählung durch manuelles Anklicken jeder einzelnen Zelle. Durch Einstellen des Bearbeitungsmodus und der Funktion „Linie“ inkl. Bestimmung einer Linienstärke (von z.B. 40) konnten per Mausclick (mehr oder weniger) dicke Punkte auf die zu markierenden Zellen gelegt

werden. Wichtig war hierbei, dass die zuvor markierten AgNORs, die farbig im Bild angezeigt wurden, von diesen Punkten eingeschlossen wurden. Nur so wurde gewährleistet, dass die durchschnittliche AgNOR- Anzahl und -Fläche/ Zelle bestimmt werden konnte. Durch Bestätigung mit „OK“ zeigte das Bildbearbeitungsprogramm die zuvor markierten Zellen als Kreise mit den darinliegenden zugehörigen AgNORs. Berührten sich hierbei zwei Zellen, führte dies zu einer falschen Zählung, da diese vom Bildbearbeitungsprogramm als Einheit angesehen wurden. Wie zuvor für die AgNOR- Markierung beschrieben, konnten die erforderliche Korrekturen der markierten Zellen ebenfalls durch Anklicken der Funktionen „Zellen löschen“ oder „Zellen trennen“ vorgenommen werden.

Messungen der Zellgröße waren aufgrund der Zell- Hintergrund- Kontraste nicht möglich. Ein Einzeichnen bzw. Umranden der Zellen mittels Mausclick erschien zu aufwendig und ungenau.

Zuletzt erfolgte die Auswertung der markierten AgNORs und Zellen durch Anklicken der Funktion „Messen“, wodurch die Ergebnisse tabellarisch angezeigt wurden.

### **Ki-67**

Im Gegensatz zur computergestützten halbautomatischen Auswertung des komplexeren AgNOR Bildmaterials, erfolgte die quantitative Beurteilung der Ki-67 positiven Zellen durch Einschätzung der Rotfärbung dieser Zellen. Ki-67 markierte Zellen wurden als positiv bewertet, wenn sich ein deutlich rot gefärbter Nukleus zeigte. Eine Ki-67 negative Reaktion hingegen rief bedingt durch die Mayers Hämalaun Gegenfärbung eine eindeutige Blaufärbung der Zellen hervor. Die Anzahl Ki-67 positiver Zellen wurde von der Autorin durch manuelle Auszählung von hundert willkürlich ausgewählten Zellen am Computerbildschirm ausgezählt, bevor die AgNOR Bestimmung mittels Image Analyse vorgenommen wurde. Angegeben wurde die Anzahl Ki-67 positiver Zellen in Prozent, d.h. als Anzahl der positiven Nuklei pro 100 Zellen. Nekrotische Bereiche wurden genauso ausgeschlossen wie Histiozyten, Plasmazellen oder andere inflammatorische Zellen.

### 3.7 Einteilung der Patienten in Gruppen (Patientenklassifizierung)

Jede zytologisch entnommene kanine FNA wurde routinemäßig in dem Labor der Klinik für Kleintiere der Justus- Liebig- Universität Gießen mit einer May- Grünwald/ Giemsa- Färbung angefärbt und zunächst in der zytologischen Routinediagnostik beurteilt. Folgendes Färbeprotokoll wurde verwendet:

**Tabelle 5: Das Färbeprotokoll der May- Grünwald/ Giemsa- Färbung**

getrocknete FNA Ausstriche in May- Grünwald- Lösung geben (May- Grünwalds Eosin- Methylenblau in einer Verdünnung von 1: 20 mit Aqua Bidest)	(Roth)	5 Min.
Spülen mit Aqua bidest	(Schwalbach)	
Gegenfärben mit Giemsa	(Merck)	15 Min.
Spülen mit Aqua bidest	(Schwalbach)	
Trocknen lassen		

Die entgeltliche Einteilung in die Gruppen „Kontrolle“, „reaktive Hyperplasie“, „Lymphadenitis“ und „Lymphom“ erfolgte durch eine boardzertifizierte Untersucherin (Dr. Natali Bauer, Diplomate des European College of Veterinary Clinical Pathology). Die Untersucherin war bezüglich der AgNOR Ergebnisse und Resultate der Ki-67 Färbung verblindet. Die zytologischen Beurteilungskriterien zur Diagnosestellung der Lymphadenopathien kaniner FNAs können Kap. 2.1.7ff entnommen werden.

#### 3.7.1 Einteilung der Lymphompatienten

Die Präparate von Hunden mit Lymphom wurden basierend auf der für den Hund angepassten Kiel- Klassifikation (FOURNEL- FLEURY et al., 1994b; FOURNEL- FLEURY et al., 1997a) und dem Ergebnis der immunzytologischen Untersuchung in undifferenzierte (low grade) und gut differenzierte (high grade) B- und T- Zell- Lymphome klassifiziert (FOURNEL- FLEURY et al., 1994a; RASKIN und MEYER, 2009). Ein kurzer Überblick gibt Tabelle 6. Da gut differenzierte lymphoplasmazelluläre Lymphome anhand von zytologischen Präparaten nicht sicher zu diagnostizieren sind, erfolgte in diesem Fall eine Biopsie zur Bestätigung.

**Tabelle 6: Morphologisch wird der Tumorgrad durch den Mitoseindex und die Zellgröße determiniert (RASKIN und MEYER, 2009)**

geringer Tumorgrad	niedriger Mitoseindex und kleine Zellen
hoher Tumorgrad	moderater oder hoher Mitoseindex und große Zellen

Der Mitoseindex wird durch Auszählen von 5 Gesichtsfeldern bei einer 400- 500 fachen Vergrößerung am Mikroskop bestimmt.

geringer Mitoseindex	0- 1 Mitosefigur in 5 Gesichtsfeldern
moderater Mitoseindex	2- 3 Mitosefiguren in 5 Gesichtsfeldern
hoher Mitoseindex	mehr als 5 Mitosefiguren in 5 Gesichtsfeldern

Die Zellgröße wird im Vergleich zur zytologischen Größe von Erythrozyten beurteilt.

kleine Zellen	1- 1,5x so groß wie Erythrozyten
mittlere Zellen	2- 2,5x so groß wie Erythrozyten
große Zellen	mehr als 3x der Erythrozytengröße

### 3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des Statistikprogramms Graph Pad Prism Version 4.00 für Windows (Graph Pad Software, San Diego Kalifornien, USA), sowie MedCalc Version 9.0.1.1 für Windows (1993- 2006 Frank Schoonjans) durchgeführt. Die Normalverteilung der 4 unterschiedlichen Gruppen wurde anhand des Kolmogorov- Smirnov Tests überprüft und bestätigt. Zur statistischen Auswertung wurde pro Patient und für jeden der 3 Proliferationsparameter der arithmetische Mittelwert errechnet. Nachdem alle Patienten entsprechend ihrer zytologischen Kategorie in vier Gruppen (Hunde mit Lymphom, Lymphadenitis, reaktiver Hyperplasie oder Hunde mit physiologischem Lymphknoten) eingeteilt werden konnten, erfolgte eine gruppenspezifische Auswertung der Proliferationsmarker. Aus den vorherigen Werten wurden für alle Probanden einer Gruppe und für jeden der drei Proliferationsmarker der arithmetische Mittelwert (MW) inklusive Standardabweichung (SD) errechnet, der die Grundlage der statistischen Analyse darstellt.

Zur Feststellung eines signifikanten Unterschieds zwischen den Gruppen wurde ein einfaktorielles ANOVA Test mit Bonferroni Nachtest vorgenommen. Die Korrelation der Proliferationsmarker untereinander wurde durch eine lineare Regressionsanalyse überprüft. Der berechnete Korrelationskoeffizient und die Regressionsgerade wurden auf Signifikanz überprüft. Die Anwendung der Proliferationsmarker zur Lymphomdiagnose wurde mittels Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurve verglichen, basierend auf den Ergebnissen von Hunden der Lymphom- gegenüber der Nicht- Lymphomgruppe. Der Unterschied zwischen den Flächen unter den Kurven (AUC) wurde durch einen paarweisen Vergleich der ROC Kurven nach HANLEY und MCNEIL (HANLEY und MCNEIL, 1983) untersucht. Ein P- Wert  $<0,05$  gibt hierbei einen signifikanten Unterschied zwischen den AUCs an. Anschließend wurde der Cut- off- Wert, inklusive Sensitivität und Spezifität der Proliferationsmarker zur Lymphomdiagnose mittels Receiver Operating Characteristic Kurve ermittelt. Positiver und negativer prädiktiver Wert wurden unter Einbeziehung der jährlichen Inzidenzrate für das Auftreten von Lymphomen beim Hund berechnet. Da die in einer Universitätsklinik und einer auf Onkologie spezialisierten Privatpraxis ermittelte Inzidenzrate nicht repräsentativ für die Gesamtpopulation sind, wurde der Berechnung von positivem und negativem prädiktiven Wert eine in England bei 130.684 krankenversicherten Hunden festgestellte Inzidenzrate von 0,079% zugrunde gelegt (EDWARDS et al., 2003).



## 4 ERGEBNISSE

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der untersuchten Proliferationsmarker AgNOR und Ki-67 in FNAs kaniner Lymphknoten vorgestellt.

### 4.1 Die Ergebnisse der zytologischen Diagnosefindung der kaninen Lymphknoten- FNAs

Lymphknoten- FNAs von 101 Hunden wurden in die Untersuchung einbezogen.

Die Einteilung der Patienten und ihrer entnommenen FNAs basierte auf der zytologischen Diagnosefindung der May- Grünwald/ Giemsa gefärbten Präparate (s. auch Kapitel 2.1.7) unter Berücksichtigung der (allgemeinen und speziellen) klinischen Untersuchung der Hunde. So konnte eine Differenzierung der Probanden in an Lymphom erkrankten Hunden (Lymphomgruppe, n=19) und einer Nicht-Lymphomgruppe (n=82), die 26 klinisch gesunde Hunde, 31 Hunde mit Lymphadenitiden und 25 mit reaktiven Hyperplasien beinhaltet, vorgenommen werden. Die Hunde mit physiologischen Lymphknoten wiesen keine Hinweise auf eine Lymphknotenerkrankung auf und wurden deshalb als Kontrollgruppe bei der Auswertung der Daten verwandt. Die Lymphompatienten wurden weiterhin immunphänotypisch in 16/19 (84,2%) Hunde mit B- und 3/19 (15,8%) mit T- Zell-Lymphomen unterteilt. Eine zusätzliche Beurteilung von Lymphom- FNAs unter Berücksichtigung zytomorphologischer Kriterien, wie Mitoseindex und Zellgröße, ermöglichte eine Differenzierung in 16/19 (84,2%) Lymphome von hohem und 3/19 (15,8%) von niedrigem Malignitätsgrad. Die immunphänotypische Klassifizierung der Lymphompatienten wies 15/16 (93,7%) hochmaligne und 1/16 (6,3%) niedrigmalignes B- Zell- Lymphom vom lymphoplasmazellulären Typ nach, dessen Diagnose durch eine Biopsie bestätigt wurde. Weiterhin wurde bei zwei der drei T- Zell- Lymphompatienten (66,7%) ein niedrigmalignes Lymphom diagnostiziert. Einer der drei Hunde (33,3%) wies ein T- Zell- Lymphom von hohem Malignitätsgrad auf.

## 4.2 Die Ergebnisse der Proliferationsmarker in FNAs kaniner

### Lymphknoten

In unserer Studie wurde zur Beurteilung der Proliferationsmarker eine durchschnittliche Zellzahl von 112 Zellen pro Patient herangezogen. Die ausgewertete Gesamtzellzahl lag in einem Bereich von mindestens 100 und maximal 167 Zellen pro Patient. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der durchschnittlichen AgNOR- Anzahl und -Fläche/ Zelle, sowie der prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen von Hunden der Lymphomgruppe gegenüber der Nicht-Lymphomgruppe unter Angabe des arithmetischen Mittelwertes und der Standardabweichung in Tabelle 7 aufgeführt:

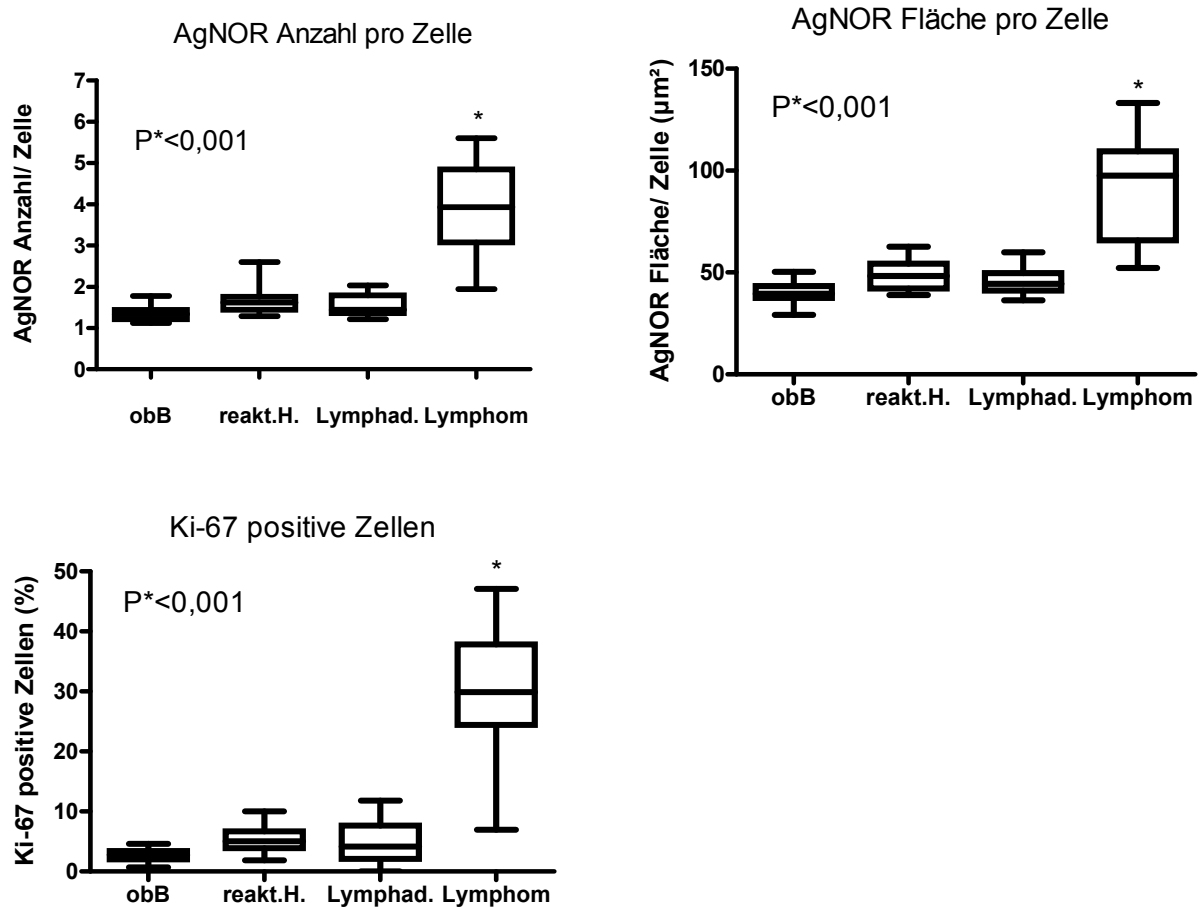
**Tabelle 7: Proliferationsmarker in kaninen Lymphknoten- FNAs von physiologischen Lymphknoten (n=26) und Hunden mit reaktiven Hyperplasien (n=25), Lymphadenitis (n=31) und Lymphomen (n=19)**

Proliferationsmarker/ Gruppe	Durchschnittl. AgNOR Anzahl/ Zelle	Durchschnittl. AgNOR Fläche/ Zelle ( $\mu\text{m}^2$ )	Proz. Anzahl Ki-67 positiver Zellen (%)
physiolog.Lymphknoten	1,36±0,19	40,31±4,63	2,67±0,99
reaktive Hyperplasie	1,65±0,32	48,88±7,03	5,36±2,14
Lymphadenitis	1,55±0,26	45,03±5,87	5,04±3,34
Lymphom	3,67±1,08	92,48±25,48	30,16±10,81

Die Datenbeschreibung erfolgte anhand des arithmetischen Mittelwertes (MW) und der Standardabweichung (SD)

Abkürzungen: Durchschnittl.= Durchschnittlich, Proz.= Prozentual

Um einen anschaulichen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen, erfolgt die graphische Darstellung der Daten in einem Box and Whisker Diagramm der Abbildung 7.



**Abbildung 7: Box and Whisker Diagramm der durchschnittlichen AgNOR Anzahl/ Zelle, der durchschnittlichen AgNOR Fläche/ Zelle, sowie der prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen in FNAs von physiologischen Lymphknoten (n=26) und Hunden mit reaktiven Hyperplasien (n=25), Lymphadenitis (n=31) und Lymphomen (n=19)**

Die Linie in der Box gibt den Median der Proliferationsmarker an, d.h. die mittleren 50% der Daten, während die Box die mittleren 25 und 75% der Daten umfasst und die „Whiskers“ die Daten an den Rändern verdeutlichen. Hunde mit Lymphomen zeigen hierbei eine signifikant höhere Proliferation im Gegensatz zur Nicht-Lymphomgruppe ( $P < 0,001$ ).

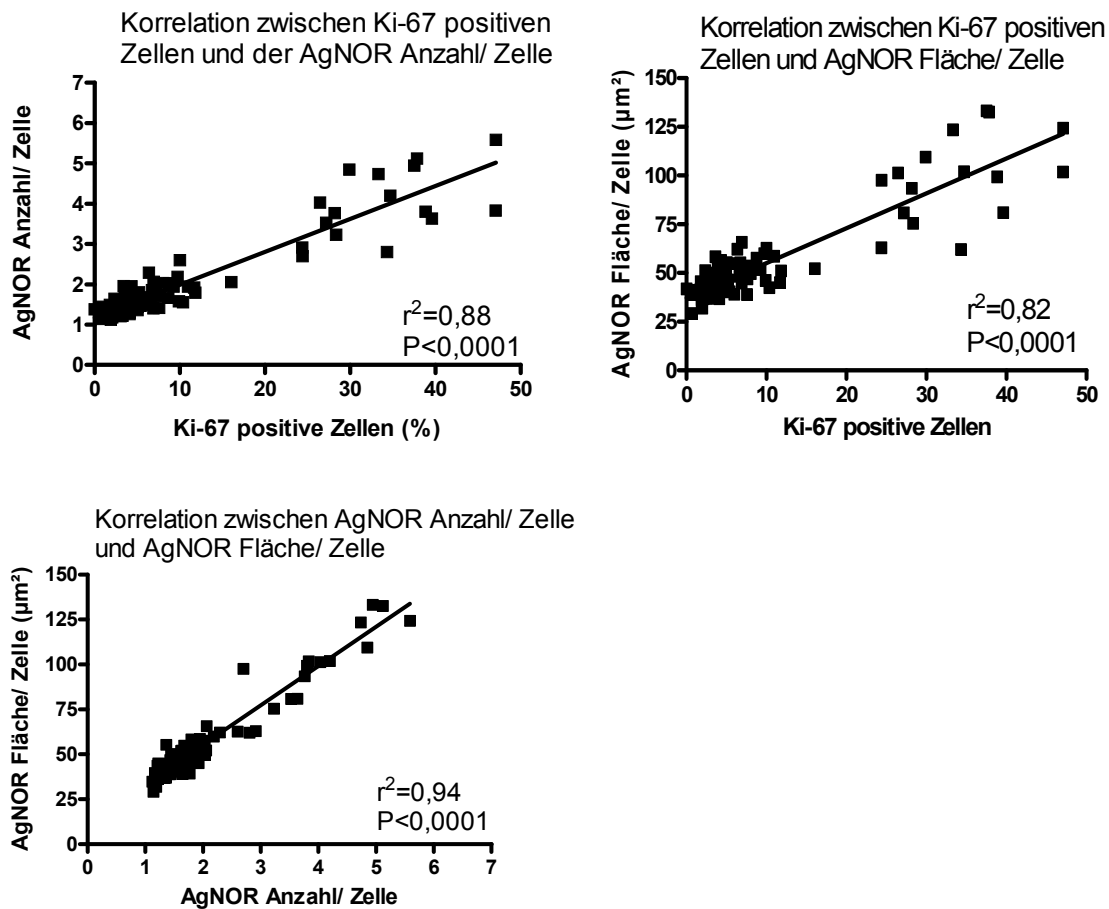
Abkürzungen: obB= ohne besonderen Befund/ physiologischer Lymphknoten, reakt. H.= reakt. Hyperplasie, Lymphad.= Lymphadenitis

Wie in Abbildung 7 dargestellt, konnte mit Hilfe des einfaktoriellen ANOVA- Tests inklusive Bonferroni Nachtest kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Proliferationsmarkern bei Hunden mit physiologischem Lymphknoten, reaktiver

Hyperplasie und Lymphadenitis festgestellt werden ( $P > 0,05$ ). Hunde mit Lymphomen ( $n=19$ ) wiesen jedoch eine signifikant höhere Proliferation im Gegensatz zur Nicht-Lymphomgruppe auf (Tabelle 7,  $P < 0,001$ ). Der Kolmogorov- Smirnov Tests bestätigte mit P- Werten  $> 0,1$  die Normalverteilung der 4 unterschiedlichen Gruppen. B- Zell- Lymphompatienten zeigten des Weiteren eine höhere Proliferation als Tiere mit T- Zell- Lymphomen, jedoch war die Anzahl der Hunde mit T- Zell- Lymphomen zu gering für eine statistische Analyse. Die Proliferationsmarker waren höher bei Lymphomen mit hohem Malignitätsgrad als bei solchen mit niedrigem Malignitätsgrad, aber auch hier war die Anzahl der Hunde mit niedrigmalignen Lymphomen zu gering, um eine statistische Analyse durchführen zu können.

#### **4.2.1 Die Überprüfung der Korrelation der Proliferationsmarker untereinander**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aller FNA- Probanden ( $n=101$ ) erfolgte im Hinblick auf die Korrelation der 3 Proliferationsmarker untereinander mittels linearer Regressionsanalyse. Die Ergebnisse der Untersuchung gibt die Abbildung 8 graphisch wieder.



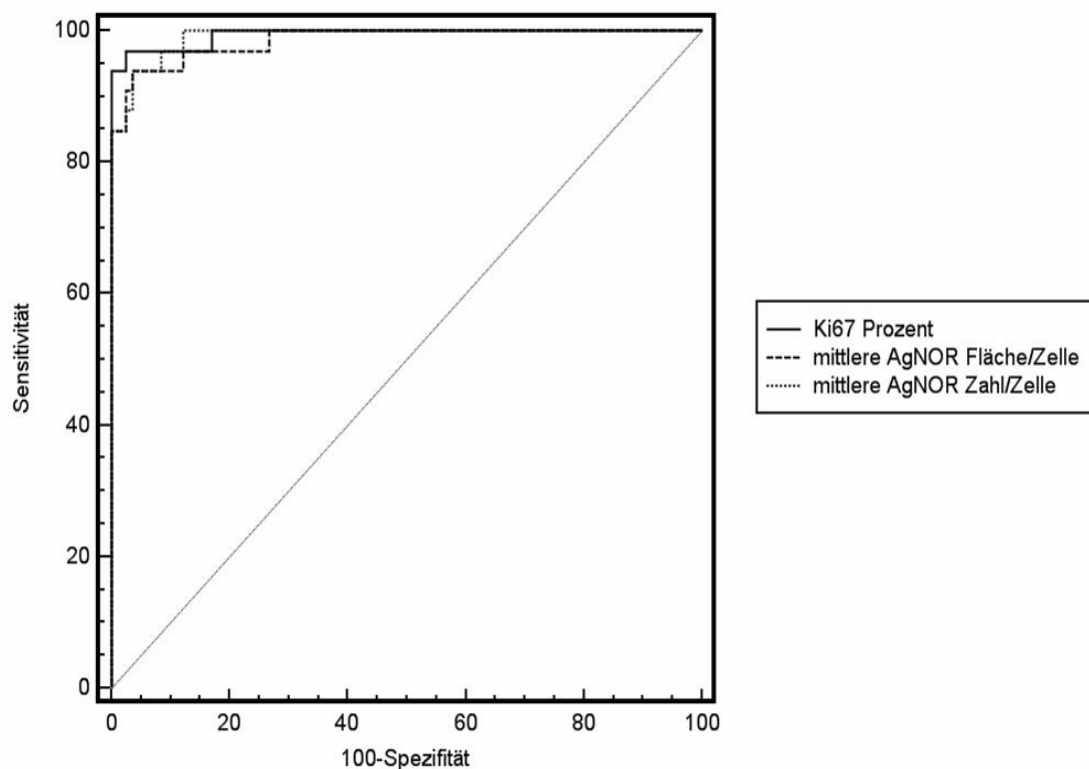
**Abbildung 8: Lineare Regressionsanalyse der durchschnittlichen AgNOR Anzahl/ Zelle, der durchschnittlichen AgNOR Fläche/ Zelle und der prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen (n= 101 Lymphknoten- FNAs)**

Das Punktwolkendiagramm mit Regressionsgerade zeigt eine gute Korrelation zwischen der prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen und dem Proliferationsmarker AgNOR, d.h. der durchschnittlichen AgNOR Anzahl/ Zelle ( $r^2=0,88$ ,  $P<0,0001$ ) als auch der durchschnittlichen AgNOR Fläche/ Zelle ( $r^2=0,82$ ,  $P<0,0001$ ). Weiterhin ist eine gute Korrelation zwischen der durchschnittlichen AgNOR Anzahl/ Zelle und der durchschnittlichen AgNOR Fläche/ Zelle ( $r^2=0,94$ ,  $P<0,0001$ ) nachweisbar.

### 4.3 Die Bedeutung der Proliferationsmarker für die Lymphomdiagnostik bei Hunden

In diesem Kapitel wird die Bedeutung der Proliferationsmarker für die Lymphomdiagnostik bei Hunden näher untersucht.

Die Anwendung der Proliferationsmarker zur Diagnose von Lymphomen wurde durch Receiver operating characteristic (ROC) Kurven verglichen, basierend auf den Ergebnissen von Hunden der Lymphom- (n=19) gegenüber der Nicht-Lymphomgruppe (n=82), die Hunde mit physiologischen Lymphknoten, Lymphadenitis und reaktiver Hyperplasie beinhaltet. Die Abbildung 9 zeigt den Vergleich der Proliferationsmarker AgNOR und Ki-67 anhand von ROC Kurven:

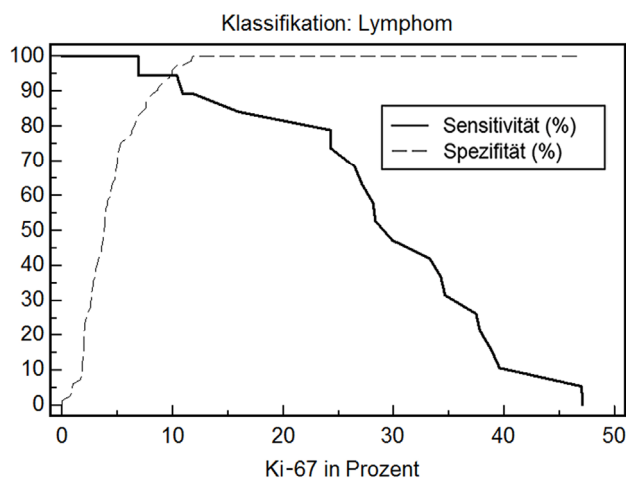
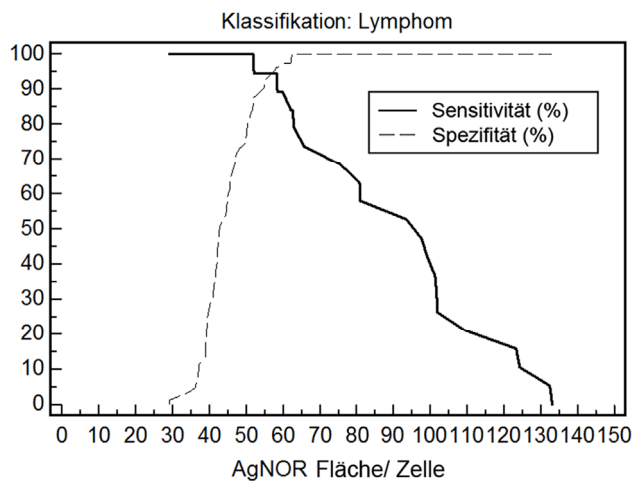
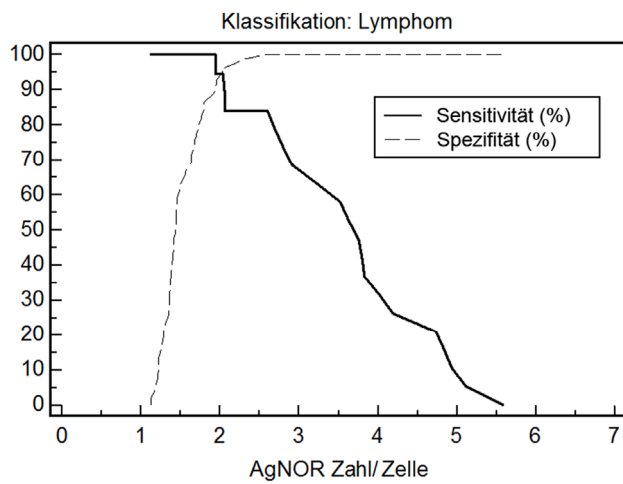


**Abbildung 9:** Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur vergleichenden Anwendung der Proliferationsmarker AgNOR und Ki-67 bei der Lymphomdiagnostik

Zur Bestimmung der Lymphomdiagnose anhand von Cut- off- Werten wurde die Sensitivität gegen 100 minus Spezifität aufgetragen. Hohe positive und geringe falsch negative Ergebnisse charakterisieren einen „guten“ Test. Folgend sollten die ROC Kurven in der linken oberen Ecke dieser Graphik angesiedelt sein.

Die optimale Fläche unter den Kurven (Area under the curve/ AUC) beträgt 1. In unserer Studie ist sie 0,991 für die durchschnittliche AgNOR Anzahl/ Zelle, 0,990 für die durchschnittliche AgNOR Fläche/ Zelle und 0,990 für die prozentuale Anzahl Ki-67 positiver Zellen. Weiterhin ergab der Vergleich der ROC Kurven untereinander keinen signifikanten Unterschied zwischen den Flächen unter den Kurven (AUC) für die untersuchten Proliferationsmarker.

Dieses Plot versus criterion Diagramm der durchschnittlichen AgNOR Anzahl/ Zelle, der durchschnittlichen AgNOR Fläche/ Zelle und der prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen ist ein Bestandteil der ROC Analyse.



**Abbildung 10: Plot versus criterion Diagramm der durchschnittlichen AgNOR Anzahl/ Zelle, der durchschnittlichen AgNOR Fläche/ Zelle und der prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen**



In diesem Diagramm wird die Sensitivität und Spezifität gegen das Kriterium „Lymphom“ aufgetragen. Die durchgezogene Linie repräsentiert die Spezifität, während die gestrichelte Linie die Sensitivität darstellt. Der Kreuzungspunkt beider Linien zeigt die höchste Sensitivität bei gleichzeitig höchster Spezifität zur Erkennung eines Lymphoms.

Aus dem Kreuzungspunkt der beiden Kurven ergibt sich der Cut- off- Wert, d.h. die optimale Sensitivität und Spezifität der Proliferationsmarker zur Diagnostizierung eines kaninen Lymphoms. Die Berechnung der Cut- off- Werte erfolgte automatisch mit Hilfe des Statistikprogramms MedCalc. Bei einem Schwellenwert  $>2,04$  AgNORs/ Zelle betrug die Sensitivität 94,7% und die Spezifität 96,3%. Ein Cut- off- Wert der AgNOR Fläche  $>58,3 \mu\text{m}^2$ / Zelle wies ebenfalls eine Sensitivität von 94,7%, aber eine Spezifität von 95,1% auf. Bei einem Schwellenwert  $>10,4$  % betrug die Sensitivität 94,7% und die Spezifität 97,6% für die prozentuale Anzahl Ki-67 positiver Zellen.

Unter Einbeziehung der jährlichen Inzidenzrate und der Verbreitung von kaninen Lymphomen in England mit einem Prozentsatz von 0,079% (EDWARDS et al., 2003) folgt ein errechneter positiver prädiktiver Wert (PPW) von 3,03% für die prozentuale Anzahl Ki-67 positiver Zellen, sowie ein PPW von 1,98% für die durchschnittliche AgNOR Anzahl/ Zelle und 1,51% für die durchschnittliche AgNOR Fläche/ Zelle. Der errechnete negative prädiktive Wert betrug für alle 3 Proliferationsmarker 100%.

## 5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung unterschiedlicher Proliferationsmarker erstmals bei FNAs von kaninen Lymphknoten im Rahmen einer tatsächlichen Doppelfärbung simultan, d.h. auf dem gleichen Präparat, untersucht.

Die Entnahme von FNAs gilt insbesondere zur Beurteilung von Neoplasien in der veterinärmedizinischen Routinediagnostik als Diagnostikum der ersten Wahl (MORITZ und BAUER, 2001), weshalb diese Technik für den Versuchsaufbau gewählt wurde.

Das Ziel dieser prospektiven Studie war die Etablierung von AgNORs und Ki-67 als Proliferationsmarker bei Lymphknoten- FNAs von Hunden, die mit Hilfe einer Kombination aus neu etabliertem und standardisiertem Färbeprotokoll auf ihre Proliferationsaktivität hin untersucht wurden. In Anlehnung an die Richtlinien zur AgNOR Quantifizierung des *International Committee on AgNOR Quantitation* wurde das standardisierte Färbeprotokoll für die Silberfärbung der AgNORs (AUBELE et al., 1994; OFNER et al., 1995) in unserer Studie angewandt, sowie ein weiteres Protokoll für die gewünschte Doppelfärbung mit dem immunzytologischen Antikörper Ki-67 erarbeitet. Anhand einer Einteilung der Hunde in 26 klinisch gesunde Tiere, 31 Hunde mit Lymphadenitiden, 25 mit reaktiven Hyperplasien und 19 Hunde mit Lymphomen sollte untersucht werden, ob eine Differenzierung zwischen neoplastischer, reaktiver bzw. entzündlicher Gewebeveränderung und physiologischem Gewebe durch Ki-67 und AgNOR Bestimmungen bei FNAs aus Lymphknoten möglich ist.

Zusätzlich war von Interesse, ob die Proliferationsmarker AgNOR und Ki-67 als Screeningparameter zur Feststellung eines Lymphoms geeignet sind und somit eine Hilfestellung bei der Diagnose eines kaninen Lymphoms geben können.

Da die Untersuchungs- und Färbemethoden unter Umständen Einfluss auf die Proliferationsaktivität von kaninem Lymphknotengewebe nehmen könnten, erfolgt zunächst die Diskussion von Material und Methoden, gefolgt von der Erörterung der Ergebnisse dieser Studie.

## 5.1 Faktoren mit Einfluss auf Proliferationsmarker

### 5.1.1 Färbefaktoren

Nach Kenntnis der Autorin sind bis jetzt keine Studien veröffentlicht worden, in denen zuerst die AgNOR- und folgend die Ki-67- Färbung bei einer tatsächlichen Doppelfärbung von Lymphknotenpräparaten angewandt wurde. Für eine tatsächliche Doppelfärbung müssen die Proliferationsmarker auf dem gleichen Präparat angefärbt und beurteilt werden, damit die ermittelten Ergebnisse der einzelnen Proliferationsmarker zueinander in Beziehung gesetzt werden können und somit vergleichbar sind. Unabhängig von der Durchführung einer Doppelfärbung führte aber selbst der alleinige Vergleich der numerischen Angabe der AgNOR Anzahl des gleichen Tumortyps in der Vergangenheit bei unterschiedlichen Arbeitsgruppen zu sehr divergierenden Ergebnissen und wurde dadurch fast unmöglich (TRERE, 1994). Eine der Ursachen hierfür war das Fehlen von standardisierten Färbvorschriften (TRERE, 1994) und damit gleichzeitig auch die Konsequenz von unterschiedlicher Fixation, Präparation und Silberfärbung beinhaltend insbesondere die Färbezeit und -temperatur (HUFNAGL und GUSKI, 1994; SMITH, 1988), was einen deutlichen Einfluss auf die Größe und Färbung der AgNORs hat.

Auch in den folgend zitierten Studien von VAIL et al. (1997) (VAIL et al., 1997) und VAJDOVICH et al. (2004) (VAJDOVICH et al., 2004) variieren die Färbeprotokolle der kaninen Lymphknoten- FNAs insbesondere in der Inkubationszeit der Silberlösung. Während unsere Untersuchungen nach den Richtlinien zur AgNOR Quantifizierung des *International Committee on AgNOR Quantitation* (AUBELE et al., 1994; OFNER et al., 1995) mit einer vorgeschriebenen Inkubationszeit von 12 Minuten erstellt wurden, verwendeten die ungarische Arbeitsgruppe 30 (VAJDOVICH et al., 2004) und VAIL et al. sogar 45 Minuten (VAIL et al., 1997) für die Silberfärbung der FNAs. Bis zum heutigen Zeitpunkt liegen nach Kenntnis der Autorin keine veterinärmedizinischen Studien über die Anwendung eines standardisierten Protokolls der Silberfärbung bei zytologischen Präparaten vor. In der Histopathologie hingegen wurde das Färbeprotokoll des *International Committee on AgNOR*

*Quantitation* bei kaninen Mastzelltumoren erfolgreich angewandt (SCASE et al., 2006).

Weiterhin können Auswirkungen der Doppelfärbung auf das Färbeverhalten der Proliferationsmarker und damit deren Auswertbarkeit und Beurteilung nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse von MUNAKATA und HENDRICKS Studie (1994), die den Einfluss einer Ki-67/AgNOR- Doppelfärbung bei humanem Tonsillengewebe untersuchten, ließen jedoch keinen messbar negativen Einfluss auf die individuellen Parameter AgNOR Anzahl und Ki-67 Index erkennen (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994). Zur genaueren Verifizierung der Resultate wurde zusätzlich jeweils ein Proliferationsmarker alleine, sowie in der dualen Färbung angefärbt und beurteilt (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994), denn nur die Doppelfärbung ermöglicht eine Analyse der unterschiedlichen Proliferationsmarker in denselben Zellen (COSTA et al., 1999). Hierbei wurde ebenfalls deutlich, dass die Silberfärbung keine demonstrierbaren Auswirkungen auf die vorausgegangene Ki-67 Immunfärbung hat (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994). Da unser Ziel die simultane Anfärbung der Proliferationsmarker in denselben Zellen war, wurde darauf verzichtet, die Doppelfärbungen mit Einzelfärbungen zu vergleichen. Dies wäre die einzige Möglichkeit gewesen, beide Methoden nebeneinander zu betrachten.

Eine andere immunhistologische Studie an Lungentumoren fand heraus, dass die APAAP- Färbung bessere Ki-67 Ergebnisse als die Avidin- Biotin- Peroxidase- Methode (ABC) erzielte, da die Intervention der endogenen Peroxidase vermieden werden konnte (SOOMRO, 1990). Des Weiteren ist die APAAP- Methode besonders geeignet für die immunphänotypische Markierung von zytologischen Präparaten, da das leuchtend rote Endprodukt einer positiven Färbereaktion sehr einfach durch das menschliche Auge erkannt wird und selbst geringe Anzahlen veränderter Zellen nachgewiesen werden können (CORDELL et al., 1984).

Der Proliferationsmarker Ki-67 ist ein intranukleärer Antikörper, dessen APAAP- Anfärbung eine zusätzliche Mikrowellenbehandlung erfordert, die wiederum die darauffolgende Silberfärbung beeinflussen könnte. MUNAKATA und HENDRICKS (1994) untersuchten deshalb zusätzlich noch die Auswirkungen einer für die immunologische Ki-67 Färbung benötigte Mikrowellenbehandlung auf die AgNORs (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994). Obwohl die Ki-67 Färbung die AgNOR

Anzahl nicht beeinflusste, konnte eine signifikante Erhöhung der Zellkernfläche und AgNOR Fläche beobachtet werden (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994). Die gleichen Ergebnisse wurden aber auch bei alleiniger Mikrowellenbehandlung erzielt, so dass der Effekt vermutlich auf die Mikrowellen zurückzuführen ist (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994). Das prozentuale Verhältnis der AgNOR Fläche zur Zellkernfläche wurde jedoch durch die Mikrowellenbehandlung nicht beeinflusst. Daraus folgt, dass der Grad der Veränderung durch die Mikrowellenbehandlung sowohl für den Zellkern als auch für die AgNOR Fläche gleich ist (MUNAKATA und HENDRICKS, 1994).

Aufgrund der möglichen Beeinflussung der AgNOR Fläche durch eine für die Ki-67 Anfärbung erforderliche Mikrowellenbehandlung erfolgte in unserer Studie zuerst die AgNOR Färbung und anschließend die Anwendung der Ki-67 Färbung. Diese Reihenfolge wurde nach Kenntnis der Autorin in keiner anderen Studie einer tatsächlichen Doppelfärbung von histopathologischen Lymphknotenpräparaten vorgenommen.

### **5.1.2 Zählmethode**

Neben dem Färbeprotokoll hat aber auch die Zählmethode der auszuwertenden Proliferationsmarker einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis.

Die einfachste Form der Quantifizierung von AgNORs ist die direkte visuelle Zählung der schwarzen AgNOR Punkte pro Nukleus durch den Untersucher am Mikroskop (GIRI et al., 1989b; RÜSCHOFF, 1990). Wenn sich diese schwarzen Zellen zu dreidimensionalen Aggregaten („Clustern“) zusammenlagern, ist ein Trennen der zusammenhängenden AgNORs innerhalb der silberbindenden Nukleoli erforderlich (GIRI et al., 1989a). Dies ist jedoch untersucherabhängig und somit subjektiv und erschwert eine reproduzierbare Beurteilung (GIRI et al., 1989a). Die AgNORs verschiedener Zellen unterscheiden sich also nicht nur hinsichtlich ihrer Anzahl, sondern auch in ihrer Größe, Verteilung und Intensität der Färbung (HUFNAGL et al., 1994). Letztere Parameter lassen sich natürlich nicht mehr allein durch das Auge des Untersuchers evaluieren (HUFNAGL et al., 1994).

Die quantitative Auswertung mit Hilfe eines automatischen Bildanalyseystems ermöglicht es dem Untersucher, die Zellkerne inklusive der sich darin befindenden

AgNORs zu segmentieren, auszumessen und zu zählen, wobei eine hohe Präzision und Reproduzierbarkeit erlangt werden kann (HUFNAGL et al., 1994). Folglich ist das standardisierte Auswertprotokoll des *International Committee on AgNOR Quantitation*, das die Verwendung einer automatischen Bildanalyse- Software nahe legt, einer manuellen Zählung der AgNORs vorzuziehen (AUBELE et al., 1994) und deshalb gilt die Anwendung der computergestützten digitalen Bildanalyse heute als Methode der Wahl für die AgNOR Analyse in zytologischen und histologischen Verfahren (OFNER et al., 1995; TRERE, 2000).

Während VAIL et al. (VAIL et al., 1997) und VAJDOVICH et al. (VAJDOVICH et al., 2004) noch die manuelle Methode der AgNOR Auszählung in ihren Studien verwendeten, bediente sich KIUPEL der fortschrittlicheren digitalen Image Analyse (KIUPEL, 1999). Die deutsche Arbeitsgruppe untersuchte u.a. die durchschnittliche AgNOR Anzahl von 122 kaninen Lymphbiopaten anhand der Mikroskopbildanalyse und verglich diese Methode mit der visuellen (KIUPEL, 1999). Sie stellten eine positive Korrelation der beiden Methoden fest ( $r=0,86$ ), wobei ein geringfügiger Unterschied zwischen der visuellen und der mit Computer ermittelten AgNOR Anzahl pro Zellkern nachweisbar war (KIUPEL, 1999). Der festgestellte Unterschied beider Methoden ergab sich laut KIUPEL zum großen Teil aus methodischen Verschiedenheiten. Die Mikroskopbildanalyse erfasste nur AgNORs in einer Ebene, während beim einfachen Auszählen der Schnitt fokussiert wurde. Weiterhin wurden bei der digitalen Image Analyse irreguläre Cluster als Mehrfachstrukturen erkannt (KIUPEL, 1999). Letztendlich entschlossen sich KIUPEL und seine Mitarbeiter jedoch, die standardisierte Bildanalyse zur Auswertung ihrer Proben zu verwenden (KIUPEL, 1999). HENDRICKS et al. stellten im Gegensatz dazu bei einer früheren Untersuchung (1995) an 20 NHL Biopaten keine Korrelation zwischen der manuellen und computergestützten Auswertung fest, obwohl beide Methoden eine Differenzierung zwischen aggressiven und indolenten NHL ermöglichten (HENDRICKS et al., 1995). Der Vorteil der Image Analyse lag hierbei zum einen in der Schnelligkeit und dem Mangel an Subjektivität, sowie zum anderen in der Unabhängigkeit dieser Methode von der Probengewinnung (HENDRICKS et al., 1995).

Alles in allem erschweren unterschiedliche Färbetechniken und Auswertungsmethoden, die nicht dem Standard des *International Committee on*

*AgNOR Quantitation* (AUBELE et al., 1994; OFNER et al., 1995) entsprechen, den Vergleich der Proliferationsmarker zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen und sind gleichzeitig auch eine mögliche Ursache für eine Variation in AgNOR Größe und Anzahl (TREERE, 1994).

### 5.1.3 Zellzahl

Neben dem Auswertungsverfahren der Proliferationsmarker ist auch ein angemessen großer Stichprobenumfang der angefärbten lymphatischen Zellen für ein repräsentatives Ergebnis erforderlich.

In unserer Studie wurde zur Beurteilung der Proliferationsmarker eine durchschnittliche Zellzahl von 112 Zellen pro Patient herangezogen. Die ausgewertete Gesamtzellzahl lag in einem Bereich von mindestens 100 und maximal 167 Zellen pro Tier. Vergleichbare Zellzahlen von jeweils 100 ausgewerteten Zellen/Patient wiesen die Studien von VAIL et al. und KIUPEL et al. auf (KIUPEL et al., 1999; KIUPEL, 1999; VAIL et al., 1997). Die ungarische Arbeitsgruppe untersuchte eine größere Anzahl von 150- 200 Zellen pro Hund (VAJDOVICH et al., 2004). Die relativ geringe Anzahl der ausgewerteten Zellen stellt eine Limitierung unserer Studie dar, jedoch haben Untersuchungen von Biopstaten bei kaninen Mastzelltumoren ergeben, dass Gesamtzellzahlen von 100 bzw. 200 ausgezählten Zellen eine sehr hohe Korrelation ihrer Ergebnisse, d.h. der AgNOR Anzahl/ Zelle ( $r=0,96$ ) aufwiesen (SIMOES et al., 1994). BOSTOCK et al. (1989), CROCKER et al. (1989) und WEBSTER et al. (2007) untersuchten ebenfalls die Anzahl der AgNORs in 100 willkürlich ausgewählten und unter Ölimmersion ausgezählten Zellen kaniner Mastzelltumoren (BOSTOCK et al., 1989; CROCKER et al., 1989; WEBSTER et al., 2007). Sie kamen zu dem Ergebnis, daß diese Art der Zellzählung als Standard angesehen werden kann und bevorzugt bei der Anwendung der Image Analyse angewandt werden sollte (BOSTOCK et al., 1989; CROCKER et al., 1989). Eine Mindestanzahl von 100 (auszuwertenden) Zellen pro Tumor wird von vielen Autoren als notwendig erachtet (BOSTOCK et al., 1989; KIUPEL et al., 1999; KIUPEL, 1999). Vergleichszählungen von 100, 200, 300 und 500 Zellen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Bewertung des prozentualen Anteils Ki-67 positiver Zellen bei kaninen Lymphombioplasten (KIUPEL, 1999).

Nachdem die Problematik der Färbe- und Auswertungsmethode bei kaninem Lymphknotengewebe eingehend erläutert wurde, erfolgt nun eine Diskussion der Ergebnisse.

## 5.2 Die AgNOR Anzahl

Die Ergebnisse dieser Studie konvergieren bezüglich der Beurteilung der AgNOR Anzahl/ Zelle in Lymphknoten- FNAs mit einer 2004 veröffentlichten veterinärmedizinischen Untersuchung bzw. einer humanmedizinischen Publikation von 1992. In unserer Untersuchung beträgt die durchschnittliche AgNOR Anzahl/ Zelle  $1,36 \pm 0,19$  bei Hunden mit physiologischen Lymphknoten ( $n=26$ ) und steht damit im Einklang mit VAJDOVICH et al.'s Kontrollgruppe ( $n=10$ ), die eine durchschnittliche AgNOR Anzahl/ Zelle von  $1,35 \pm 0,13$  aufweist (VAJDOVICH et al., 2004). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die ungarische „Kontrollgruppe“ neben der insgesamt geringeren Anzahl an Tieren, nur 2 Hunde mit physiologischen Lymphknoten enthält, sowie des Weiteren jeweils 4 Hunde mit Lymphadenitis und reaktiver Hyperplasie (VAJDOVICH et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für die gleichen Ergebnisse trotz der unterschiedlichen Zusammensetzung der Gruppen könnte darin begründet liegen, dass unsere Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen Hunden mit physiologischem Lymphknoten ( $n=26$ ), reaktiver Hyperplasie ( $n=25$ ) und Lymphadenitis ( $n=31$ ) feststellen konnte ( $P > 0,05$ ). Somit ist keine Differenzierung innerhalb der Nicht- Lymphomgruppe durch die Proliferationsmarker möglich.

Im Gegensatz zu unseren veterinärmedizinischen Untersuchungen an kaninen Lymphknoten- FNAs zeigten XU und WANG (1992) in ihrer humanmedizinischen Studie, dass die AgNOR Anzahl in FNAs von Menschen mit einer Lymphadenitis ( $1,16 \pm 0,10$  AgNORs/ Zelle;  $n=56$ ) geringer ausfiel als bei Hunden ( $1,55 \pm 0,26$  AgNORs/ Zelle;  $n=31$ ) (XU und WANG, 1992). Menschen mit reaktiven Hyperplasien ( $1,48 \pm 0,2$  AgNORs/ Zelle;  $n=6$ ) wiesen wiederum ähnliche Resultate auf wie die in FNAs von Hunden mit gleicher Erkrankung ( $1,65 \pm 0,32$  AgNORs/ Zelle;  $n=25$ ) (XU und WANG, 1992). Humane Patienten mit NHL hingegen zeigten eine höhere AgNOR Anzahl ( $6,58 \pm 2,37$  AgNORs/ Zelle;  $n=43$ ) als Hunde mit Lymphomen ( $3,67 \pm 1,08$  AgNORs/ Zelle;  $n=19$ ) (XU und WANG, 1992). Die Anzahl der AgNORs



ist bei Lymphomen im Vergleich zu reaktiven Hyperplasien und entzündlichen Veränderungen bei FNAs humaner Lymphknoten signifikant erhöht ( $P < 0,001$ ) (XU und WANG, 1992). Des Weiteren weisen hoch maligne Neoplasien in der Regel eine größere AgNOR Anzahl und eine kleinere AgNOR Fläche auf als solche, die benigne oder weniger maligne sind (XU und WANG, 1992). Hunde mit Lymphomen ( $n=19$ ) wiesen in unserer Studie ebenfalls eine signifikant höhere Proliferation im Gegensatz zur Nicht- Lymphomgruppe auf ( $P < 0,001$ ). Bei ihnen betrug die durchschnittliche AgNOR Anzahl/ Zelle  $3,67 \pm 1,08$ . Ähnliche Ergebnisse lieferten 2 andere veterinärmedizinische Studien, dort variierte die AgNOR Anzahl/ Zelle bei FNAs kaniner Lymphompatienten von 3,26 (Bandbreite 1,7-5,3 AgNORs/ Zelle;  $n= 51$ ) (VAIL et al., 1997) bis  $3,59 \pm 0,76$  AgNORs/ Zelle (Bandbreite 2,65-5,89 AgNORs/ Zelle;  $n=16$ ) (VAJDOVICH et al., 2004). Somit ist eine Unterscheidung des kaninen Lymphoms von der Nicht- Lymphomgruppe durch die computergestützte Auswertung der Silberfärbung möglich. Insgesamt hat sich die AgNOR Anzahl - wie auch hier festgestellt - als ein wichtiger Parameter zur Bestimmung der Zellproliferation in kaninem lymphatischem Gewebe erwiesen (VAJDOVICH et al., 2004).

### 5.3 Die 3 Proliferationsmarker

Verglichen mit der relativ großen Zahl von Publikationen, die den Nutzen der AgNOR Anzahl/ Zelle als Proliferationsmarker in den unterschiedlichsten Organen und Tumoren untersuchten, existieren nur wenige Studien, die die AgNOR Fläche und zusätzlich die prozentuale Anzahl Ki-67 positiver Zellen in Kombination mit der AgNOR Anzahl erforschten.

Die Beurteilung und Einschätzung von Ki-67 positiven Zellen in Verbindung mit der AgNOR Anzahl/ Zelle eröffnete neue Perspektiven in der Beurteilung und dem Wissen um die Wachstumsfraktion einer großen Anzahl unterschiedlichster histopathologischer Tumorarten (LORENZATO, 2000). Der Ki-67 Antikörper ist ein weit verbreiteter Marker für proliferierende Zellen, denn sein Antigen wird während aller aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert (GERDES et al., 1991; LORENZATO, 2000). Somit ist es in proliferierenden Zellen anwesend, fehlt aber in inaktiven Zellen (GERDES et al., 1991; LORENZATO, 2000). Dies macht den Antikörper für die Bestimmung der so genannten Wachstumsfraktion eines Gewebes, d.h. die Anzahl

der proliferierenden und somit Ki-67 positiven Zellen im Zellzyklus von physiologischem, reaktivem und neoplastischem Gewebe (BROWN DC und GATTER KC, 1990a) anwendbar. Die Proliferationsaktivität eines Tumors oder Gewebes wird jedoch nicht allein durch die Wachstumsfraktion sondern ebenfalls durch die Zeit bestimmt, die gebraucht wird, um den Zellzyklus zu beenden (WRIGHT, 1984).

Die quantitative AgNOR Bewertung ist die einzige Methode, die Informationen über die Geschwindigkeit der Zellproliferation in der Routineuntersuchung von Gewebematerial ermöglicht (LORENZATO, 2000) und durch die somit eine Aussage über die Kinetik der Zellproliferation gewonnen werden kann (DERENZINI, 2000). Die alleinige Möglichkeit, die Zellzyklusgeschwindigkeit zu beurteilen, liegt folglich in der Quantifizierung des AgNOR Proteins, denn es existiert eine inverse Korrelation zwischen der AgNOR Anzahl und der Dauer des Zellzyklus (DERENZINI und TRERE, 1994).

Eine der wenigen pathohistologischen Studien an NHL erkrankten Menschen (n=13), die die Bedeutung unterschiedlicher Proliferationsmarker anhand einer tatsächlichen Doppelfärbung von AgNORs und Ki-67 untersucht haben, zeigte neben einem signifikanten Unterschied zwischen der AgNOR Anzahl Ki-67 positiver zu Ki-67 negativer Zellen, eine höhere AgNOR Anzahl bei Patienten mit Ki-67 positiven Zellen als bei solchen mit Ki-67 negativen Zellen (JANMOHAMED et al., 1990). Dies galt sowohl für NHL erkrankte Menschen mit Tumoren von hohem Malignitätsgrad als auch für solche mit niedrigen Malignitätsgraden (JANMOHAMED et al., 1990). So variierte die durchschnittliche AgNOR Anzahl/ Zelle von 5,0-10,3 in Ki-67 positiven Zellen und 1,0-3,2 in Ki-67 negativen Zellen bei Menschen mit Lymphomen von niedrigem Malignitätsgrad. NHL Patienten von hohem Malignitätsgrad wiesen ebenfalls höhere AgNOR Anzahlen/ Zelle von 9,4-22,0 in Ki-67 positiven im Vergleich zu 1,1-2,4 AgNORs/ Zelle in Ki-67 negativen Zellen auf (JANMOHAMED et al., 1990). In MOURAD et al.'s humanmedizinischer Studie wiesen FNAs von lymphoproliferativen Erkrankungen (n=10) ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der AgNOR Anzahl von Menschen mit Ki-67 positiven und negativen Zellen auf (MOURAD et al., 1994). Weiterhin zeigten bei dieser tatsächlichen Doppelfärbung mehr als 95% der Ki-67 positiven Zellen mehr als 4 AgNORs/ Nukleus, wohingegen bei mehr als 95% der Ki-67 negativen Zellen AgNOR

Zahlen von 1- 2 AgNORs/ Nukleus gefunden wurden (MOURAD et al., 1994). Obwohl in unserer Untersuchung die AgNOR Anzahl nicht explizit in Ki-67 positiven und negativen Zellen gezählt wurde, weisen auch hier Tiere mit einer höheren prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen ( $30,16 \pm 10,81\%$  Lymphompatienten) gleichzeitig höhere durchschnittliche AgNOR Anzahlen/ Zelle ( $3,67 \pm 1,08$  AgNORs/ Zelle) auf als Nicht- Lymphompatienten ( $1,36 \pm 0,19$  bis  $1,65 \pm 0,32$  AgNORs/ Zelle,  $2,67 \pm 0,99$  bis  $5,36 \pm 2,14\%$  Ki-67 positive Zellen). Die AgNOR Zahlen beider Studien sind in vergleichbarem Rahmen angesiedelt. MOURAD et al. schlussfolgern, dass mehr als 4 AgNORs/ Nukleus eine akzeptable Anzahl zur Differenzierung von proliferierenden und ruhenden Zellen darstellen (MOURAD et al., 1994).

Nach Kenntnis der Autorin finden sich weder bei Hunden mit Lymphomen noch bei anderen kaninen Geweben Veröffentlichungen über tatsächliche Doppelfärbungen von AgNORs und Ki-67 bei histologischen und zytologischen Präparaten in der Veterinärmedizin.

Unsere Untersuchungen ergaben eine gute Korrelation zwischen der prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen und dem Proliferationsmarker AgNOR, d.h. der durchschnittlichen AgNOR Anzahl/ Zelle ( $r^2=0,88$ ,  $P<0,0001$ ) als auch der durchschnittlichen AgNOR Fläche/ Zelle ( $r^2=0,82$ ,  $P<0,0001$ ). Weiterhin ist eine gute Korrelation zwischen der durchschnittlichen AgNOR Anzahl/ Zelle und der durchschnittlichen AgNOR Fläche/ Zelle ( $r^2=0,94$ ,  $P<0,0001$ ) nachgewiesen worden. Insgesamt konnte somit in FNAs kaniner Lymphknotenpräparate eine gute Korrelation der Proliferationsmarker untereinander bestätigt werden.

Zwei humanmedizinische Studien färbten unterdessen jeweils gefrorene Gewebeschnitte von NHL erkrankten Patienten mit der Ki-67 Methode, sowie das zugehörige paraffinfixierte Lymphgewebe mit der Silberfärbung für AgNORs an (HALL et al., 1988a; OKABE et al., 1991). HALL et al. (1988) zeigten bei 80 Menschen mit NHL ein lineares Verhältnis zwischen der durchschnittlichen AgNOR Anzahl und der Anzahl Ki-67 positiver Zellen ( $r=0,86$ ,  $P<0,001$ ) (HALL et al., 1988a), die im Einklang mit einem  $r^2$ -Wert von 0,74 steht. Folglich ist dieses Ergebnis mit dem Korrelationskoeffizienten unserer Studie vergleichbar ( $r^2=0,88$ ). In der anderen histologischen Studie wurde bei 25 Patienten mit unbehandelten NHL ebenfalls eine lineare, jedoch deutlich niedrigere Korrelation zwischen der durchschnittlichen

AgNOR Anzahl/ Zelle und dem Verhältnis der NHL Zellen, die mit Ki-67 reagierten, beobachtet ( $r= 0,48$ ,  $P < 0,05$ ) (OKABE et al., 1991).

Betrachtet man die großen Unterschiede zwischen den r- Werten dieser 2 Studien, sollte darauf hingewiesen werden, dass Korrelationskoeffizienten hochgradig abhängig von der Bandbreite der gemessenen Werte sind, so dass ein hoher Korrelationskoeffizient eine Folge einer großen Bandbreite von Meßwerten sein kann (PETRIE et al., 2006).

Die dargelegten Ergebnisse machen deutlich, dass die AgNOR- Anzahl und -Fläche, sowie die prozentuale Anzahl Ki-67 positiver Zellen als Proliferationsmarker jeweils von gleichwertiger Bedeutung und Nutzen sind.

Veterinärmedizinische Studien bestätigten, dass sowohl die AgNOR Anzahl/ Zelle als auch die Anzahl Ki-67 positiver Zellen bei Hunden mit Mastzelltumoren und Sarkomen signifikante Marker für die Überlebenszeit sind (ETTINGER et al., 2006; SCASE et al., 2006; WEBSTER et al., 2007; WEBSTER et al., 2008). In der multivariaten Überlebensanalyse hingegen war nur die erhöhte AgNOR Anzahl bei Hunden mit Sarkomen prognostisch für eine kürzere Überlebenszeit (ETTINGER et al., 2006). Eine Cox Regressionsanalyse bei Mastzelltumorpatienten ergab weiterhin, dass der Proliferationsmarker Ki-67 sogar besser geeignet für die Vorhersage des Ablebens sei als der AgNOR- Marker (SCASE et al., 2006). Im Gegensatz dazu zeigte KIUPEL (1999) bei 122 kaninen Lymphknotenbiopsaten, dass der Proliferationsmarker Ki-67 nur für einzelne Gruppen von Hunden mit Lymphomen - und zwar solche mit weniger als 20% bzw. 40- 60% Ki-67 positiven Zellen - prognostisch signifikant war (KIUPEL, 1999). Die prognostisch bedeutendsten Parameter für die Behandlung kaniner Lymphome waren in dieser Studie jedoch der Immunphänotyp und die durchschnittliche AgNOR- Anzahl und -Fläche, denn der Einsatz dieser drei Parameter machte eine Trennung zwischen Risikohunden mit niedrigen Überlebenschancen und Hunden mit Überlebenszeiten von bis zu drei Jahren unter Einsatz von Chemotherapie möglich (KIUPEL, 1999).

## 5.4 B- bzw. T- Zell- Differenzierung

Nur wenige Studien wurden veröffentlicht, die den Einfluss des Immunphänotyps in Verbindung mit Proliferationsmarkern bei kaninen Lymphomen untersuchten (FOURNEL- FLEURY et al., 1997b; KIUPEL et al., 1999). Der Schwerpunkt dieser Arbeiten lag hierbei jedoch in der Beurteilung der Proliferationsmarker unter prognostischen Gesichtspunkten. KIUPEL untersuchte 1999 in seiner Dissertation die Proliferationsmarker und den Immunphänotyp nur in Verbindung mit der Überlebenszeit und nicht den Einfluss des Immunphänotypes auf die Proliferationsmarker alleine (KIUPEL, 1999).

Unsere Studie der insgesamt 101 kaninen Lymphknoten- FNAs enthielt 19 an Lymphom erkrankte Tiere. PONCE et al. (2010) untersuchten mit 608 Lymphompatienten die größte Hundepopulation (PONCE et al., 2010), sowie VAJDOVICH et al. (2004) die kleinste Gruppe mit 16 B- Zell- Lymphompatienten (VAJDOVICH et al., 2004).

In der Literatur finden sich unterschiedliche numerische Angaben inbezug auf den Anteil des B- bzw. T- Zell- Immunphänotyps von kaninen Lymphompopulationen. Während das Verhältnis der B- Zell- Lymphompatienten in unserer Untersuchung 84,2% (16/19) betrug, waren 62,7% (32/51) der Hunde mit Lymphomen einer anderen Arbeitsgruppe CD3 negativ (VAIL et al., 1997). VAJDOVICH et al.'s (2004) Studie enthielt sogar 100% (16/16) B- Zell- Lymphome (VAJDOVICH et al., 2004). Von 122 untersuchten kaninen Lymphomen waren 77,0% (94/122) Lymphome vom B- und 28,7% (27/122) vom T- Zell- Typ, sowie 1 Lymphom (0,82%) konnte weder mit dem CD3- noch mit dem CD79a- Marker von KIUPEL identifiziert werden (KIUPEL, 1999). In RUSLANDER et al.'s Publikation wiesen 76% der Tiere (134/175) ein B- und 21,5% ein T- Zell- Lymphom (38/175) auf. Weiterhin fanden sich bei 2% der Hunde (3/175) Null Zellen, d.h. diese Zellen zeigten keine spezifische Reaktion mit einem kaninen Lymphozyten- Antikörper (RUSLANDER et al., 1997). Ähnliche Ergebnisse bei der immunphänotypischen Differenzierung von kaninen Lymphomen konnten in anderen Studien demonstriert werden (CARTER et al., 1986; FERRER et al., 1993; FOURNEL- FLEURY et al., 1997a).

Im Gegensatz dazu berichteten PONCE et al. (2010) bei einer Untersuchung an 608 Hunden über eine vergleichsweise hohe Anzahl der T- Zell- Lymphomprobanden mit

35,4% (215/608) und nur 63,8% der Tiere (388/608) wiesen ein B- Zell- Lymphom auf. Des Weiteren waren auch hier 5 (0,8%) Nicht- B/ Nicht- T- Zell- Lymphomhunde vorhanden (PONCE et al., 2010). Ähnliche Resultate zeigten TESKE et al. in einer früheren Publikation (1994) bei Hunden mit Lymphomen (TESKE et al., 1994b). Unabhängig des zahlenmäßig umstrittenen Verhältnisses von Hunden mit B- zu T- Zell- Lymphomen, steht außer Frage, dass der überwiegende Anteil der kaninen Lymphome B- Zell- Tumoren sind (BAKER und LUMSDEN, 2000b; GREENLEE et al., 1990).

Werden neben der immunphänotypischen Differenzierung von Hunden mit Lymphomen und der Häufigkeitswahrscheinlichkeit ihres Auftretens Aspekte wie die Proliferationskinetik (von Neoplasien) hinzugezogen, zeigten Hunde mit B- Zell- Lymphomen in unserer Studie eine höhere AgNOR- Anzahl und -Fläche, sowie eine höhere prozentuale Anzahl Ki-67 positiver Zellen verglichen mit T- Zell- Lymphom positiven Tieren. Folgend wiesen B- Zell- Lymphompatienten eine höhere Prozentzahl an proliferierenden Zellen und auch eine höhere Zellzyklusgeschwindigkeit im Gegensatz zu Hunden mit T- Zell- Lymphomen auf.

Diese Ergebnisse sollten aber zur genaueren Verifizierung in Zusammenhang mit der Unterteilung der Lymphompatienten in die entsprechenden Malignitätsuntergruppen der „Aktualisierten Kiel Klassifikation“ (FOURNEL- FLEURY et al., 1994b; FOURNEL- FLEURY et al., 1997a; PONCE et al., 2010) betrachtet werden. Die Übertragung des humanen Klassifizierungsschemata auf den Hund zeigte - neben einer höheren Anzahl der Tiere mit B- gegenüber T- Zell- Lymphomen - eine geringere Anzahl der Hunde mit Lymphomen von niedrigem gegenüber hohem Malignitätsgrad (FOURNEL- FLEURY et al., 1997a; FOURNEL- FLEURY et al., 1997b). Ein möglicher Grund für die geringe Proliferation bei Hunden mit T- Zell- Lymphomen könnte darin begründet liegen, dass die (kleinere) Gruppe der Hunde mit T- Zell- Lymphomen prozentual gesehen eine größere Anzahl von Tieren mit Lymphomen von niedrigem Malignitätsgrad aufwies, während die meisten Tiere mit B- Zell Lymphomen nach FOURNEL- FLEURY et al.'s und auch unseren eigenen Untersuchungen Lymphome von hohem Malignitätsgrad waren (FOURNEL- FLEURY et al., 1997a).

Alles in allem ist zu beachten, dass die Gruppe der T- Zell- Lymphompatienten (n=3), die 2 Hunde mit Lymphomen von niedrigem Malignitätsgrad enthielt, gegenüber der B- Zell- Gruppe (n=16) mit nur einem Hund mit einem Lymphom von niedrigem Malignitätsgrad in unserer Studie sehr gering war und so konnte weder für Hunde mit B- bzw. T- Zell- Lymphomen noch für Patienten mit Lymphomen von niedrigem bzw. hohem Malignitätsgrad eine statistische Analyse der Proliferationsmarker AgNOR oder Ki-67 durchgeführt werden.

## **5.5 Hunde mit Lymphomen von niedrigem bzw. hohem**

### **Malignitätsgrad**

Eine weitere Kategorisierung der Lymphompatienten zeigte die Untersuchung der Malignitätsgrade von Hunden mit B- bzw. T- Zell- Lymphomen anhand der an den Hund angepaßten „Aktualisierten Kiel Klassifikation“ (FOURNEL- FLEURY et al., 1994b; FOURNEL- FLEURY et al., 1997a; PONCE et al., 2010). Die zusätzliche Beurteilung von FNAs unter Berücksichtigung zytomorphologischer Kriterien, wie Mitoseindex und Zellgröße, ermöglichte hier eine überwiegende Differenzierung der Lymphome in 15/16 (93,7%) Hunde mit hochmalignen und nur 1/16 (6,3%) Tier mit einem niedrigmalignen B- Zell- Lymphom. Im Gegensatz dazu zeigte eine geringere Anzahl der Tiere (1/3) ein hochmalignes T- Zell- Lymphom (33,3%) und nur 2/3 Hunde wiesen ein niedrigmalignes T- Zell- Lymphom (66,7%) auf.

TESKE et al.'s Untersuchungen (1994) an 95 Hunden mit Lymphomen ergab unter Ausschluß der 3 Nicht- B/ Nicht- T- Zell- Lymphome, die mittels modifizierter Kiel Klassifikation nicht klassifizierbar waren, ein fast identisches Verhältnis der Lymphompatienten mit 7,1% niedrig- bzw. 92,9% hochmalignen B- Zell- Tumoren. Lediglich das Verhältnis der Hunde vom T- Zell- Typ zeigte mit 19,4% niedrigmalignen und 80,65% hochmalignen Lymphompatienten Abweichungen zu unserer Studie (TESKE et al., 1994b). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die geringe Fallzahl von Patienten mit T- Zell- Lymphomen in unserer Arbeitsgruppe keinen sicheren Vergleich zulässt. Die ungarische Arbeitsgruppe stellte dagegen einen deutlich niedrigeren Anteil von 7/16 (43,8%) Lymphomen von hohem Malignitätsgrad und einen relativ hohen Prozentsatz (9/16 Hunde; 56,3%) mit einem

Lymphom von niedrigem Malignitätsgrad fest. Hunde mit T- Zell- Lymphomen waren in dieser Studie nicht eingeschlossen (VAJDOVICH et al., 2004). FOURNEL-FLEURY et al.'s Ergebnisse (1997) der 92 histologischen Lymphompräparate zeigte hingegen bei 62,5% der Hunde mit niedrigmalignen und 37,5% der Tiere mit hochmalignen T- Zell- Lymphomen Übereinstimmungen zu dem in unserer Studie festgestellten Trend. Im Gegensatz dazu wiesen 22,1% der Tiere einen B- Zell- Tumor von niedrigem und 77,9% der Hunde einen von hohem Malignitätsgrad auf (FOURNEL- FLEURY et al., 1997a). Ähnliche Ergebnisse bei der zytomorphologischen Differenzierung der kaninen B- Zell- Lymphome berichteten PONCE et al. (2010). Bezüglich der T- Zell- Lymphome ist ein direkter Vergleich mit anderen Studien schwierig, da die Autoren eine sehr große Anzahl von Patienten untersuchten und dabei in den Studien mit kleineren Fallzahlen nicht aufgeführte Subtypen des T- Zell- Lymphoms aufgeführt haben. Ponce et al. haben von insgesamt 143 Hunden mit T- Zell- Lymphomen bei 17/143 (11,9%) ein sehr undifferenziertes lymphoblastisches Lymphom (precursor T- cell lymphoma) nachgewiesen. Die übrigen Hunde mit T- Zell- Lymphomen (126/143; 88,1%) wiesen besser ausdifferenzierte Formen (mature T- cell lymphoma) auf, von denen 26/143 (18,2%) einen niedrigen Malignitätsgrad zeigten und 100/143 (69,9%) einen hohen Malignitätsgrad. Bei 21/143 (14,7%) Hunden war eine Klassifikation nicht möglich (PONCE et al., 2010).

VAIL et al. (1997) und RUSLANDER et al. (1997) machten bezüglich des Malignitätsgrades keine Aussage (RUSLANDER et al., 1997; VAIL et al., 1997).

Werden neben den immunzytologischen Markern zusätzlich auch die Proliferationsmarker zur Auswertung der Malignitätsgrade von kaninen Lymphomen einbezogen, zeigte unsere Studie eine tendenziell höhere Aktivität der Proliferationsmarker AgNOR und Ki-67 bei Hunden mit Lymphomen von hohem Malignitätsgrad als bei solchen mit niedrigem Malignitätsgrad. Aber auch hier war die Anzahl der Hunde mit niedrigmalignen Lymphomen zu gering, um eine statistische Analyse der Proliferationsmarker AgNOR und Ki-67 durchführen zu können.

Abgesehen von der unterschiedlichen prozentualen Verteilung der Malignitätsgrade bei Hunden mit B- Zell- Lymphomen, erzielten VAJDOVICH et al. (2004) für die AgNOR Anzahl in kaninen Lymphknoten- FNAs ebenfalls eine höhere AgNOR



Anzahl/ Zelle bei Tieren mit hochmalignen Lymphomen ( $4,08 \pm 0,855$  AgNORs/ Zelle; Bandbreite von 3,30-5,89 AgNOR Anzahl/ Zelle;  $n=7$ ) im Gegensatz zu Hunden mit niedrigmalignen Lymphomen ( $3,22 \pm 0,38$  AgNORs/ Zelle; Bandbreite von 2,65-3,77 AgNOR Anzahl/ Zelle;  $n=9$ ) (VAJDOVICH et al., 2004). FURNEL- FLEURY et al.'s Untersuchungen (1997) von 92 kaninen formalinfixierten NHL Biopaten und 30 FNAs- bzw. Tumorabklatschpräparaten wiesen eine hoch signifikante Korrelation zwischen dem Ki-67 Index und dem histologischen Grad der Neoplasien nach, d.h. der Ki-67 Index ist hoch bei Hunden mit hochmalignen und niedrig bei Patienten mit niedrigmalignen Lymphomen (FURNEL- FLEURY et al., 1997b). Der Ki-67 Index ergibt sich aus der Anzahl der Ki-67 positiven Zellen dividiert durch 1000 (FURNEL- FLEURY et al., 1997b). (Ein Ki-67 Index  $<21\%$  ist charakteristisch für Tiere mit Lymphomen von niedrigem Malignitätsgrad, sowie ein Ki-67 Index  $>21\%$  bzw. gewöhnlich  $>29\%$  für hochmaligne Lymphomprobanden (FURNEL- FLEURY et al., 1997b)).

Signifikante Unterschiede in der AgNOR- Anzahl und -Fläche sind auch beim Menschen innerhalb der NHL Gruppe, Lymphome von niedrigem gegenüber hohem Malignitätsgrad, zu finden (CROCKER, 1987; XIUYUN, 1995). So weisen Menschen mit NHL von hohem Malignitätsgrad ebenfalls eine höhere AgNOR Anzahl/ Zelle auf als solche mit Lymphomen von niedrigem Malignitätsgrad (CROCKER, 1987; CROCKER und EGAN, 1988; SMITH, 1993). Viele humanmedizinische Studien haben bei Biopaten von NHL erkrankten Patienten eine exzellente Korrelation zwischen Ki-67 Immunfärbung und histologischem Grad der NHL dokumentieren können (BROWN DC und GATTER KC, 1990b; GERDES et al., 1984; HALL et al., 1988b; PILERI und GERDES, 1987; SCHWARTZ et al., 1989; SCOTT et al., 1988; VENERONI et al., 1988; WEISS und STRICKLER, 1987). Im Allgemeinen waren bei Biopaten von Patienten mit NHL von geringem Malignitätsgrad die geringste Anzahl Ki-67 positiver Zellen nachweisbar und Patienten mit Lymphomen von hohem Malignitätsgrad wiesen die höchste Zahl Ki-67 positiver Zellen auf (SCHWARTZ et al., 1989).

Obwohl die Anzahl Ki-67 positiver Zellen bei einigen Tumorarten signifikant mit dem Malignitätsgrad korreliert, ist eine sichere Unterscheidung zwischen malignen und benignen Neoplasien nicht immer möglich. So konnten LÖHR et al. (1997) bei

kaninen Mammatumoren zwar eine signifikante Erhöhung des Ki-67 Indexes bei höherer Tumormalignität feststellen, nichtsdestoweniger wurde eine beachtliche Überschneidung zwischen den histopathologischen Tumorarten u.a. bei dem Proliferationsmarker Ki-67 gesehen, die es letztendlich unmöglich machte, einen spezifischen Cut- off- Wert zur Abgrenzung von malignen gegenüber benignen Tumoren festzulegen (LÖHR et al., 1997). Auch in unserer Studie ist die Beurteilung der Proliferationsaktivität durch die Proliferationsmarker AgNOR und Ki-67 aufgrund der geringen Anzahl der Patienten mit niedrigem Tumorgrad einerseits, sowie durch die geringe Anzahl der Probanden mit T- Zell- Lymphomen andererseits als vorsichtig zu bewerten. Zur Erzielung eines aussagekräftigen Ergebnisses, das nicht nur Tendenzen wiedergibt, sind weitere Untersuchungen mit einem größeren Stichprobenumfang erforderlich.

## **5.6 Die Receiver operating characteristic (ROC) Analyse**

Die Receiver operating characteristic (ROC) Analyse zeigte, dass alle 3 Proliferationsmarker ein Lymphom mit einer Testgenauigkeit erkennen können (AUC hier: 0,99; Optimalwert 1,0). Des Weiteren ermöglichten Cut- off- Werte von  $>2,04$  AgNORs/ Zelle, einer AgNOR Fläche  $>58,3\mu\text{m}^2$ / Zelle, sowie einer prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen  $>10,4\%$  den Ausschluß eines Lymphoms mit einer hohen Spezifität von 95,1 bis 97,7% Bandbreite. Höhere Cut- off- Werte der Proliferationsmarker wären gleichbedeutend mit noch höheren Werten für die Spezifität gewesen.

Der paarweise Vergleich der ROC Kurven demonstrierte weiterhin, dass alle 3 Proliferationsmarker gleichermaßen gut, d.h. gleichwertig zur Lymphomerkennung geeignet sind. Obwohl für unsere Studie anfänglich eine Doppelfärbung zum besseren Vergleich der Proliferationsmarker untereinander unerlässlich erschien, muß nun aufgrund dieser Ergebnisse festgestellt werden, dass dies für diagnostische Zwecke im Routinelabor nicht notwendig ist. Muß eine Wahl zwischen der Silber- oder der immunzytologischen Ki-67 Färbung getroffen werden, so kann aufgrund der Erfahrung der Autorin darauf verwiesen werden, daß die Silberfärbung zwar insgesamt schnell durchführbar (ca. 1h) und kostengünstiger ist, - wurde erst einmal ein digitales Image Analysesystem zur Auswertung erworben -, jedoch dauert die

notwendige digitale Archivierung verbunden mit der computergestützten Auswertung um ein vielfaches länger. Die positiv rot gefärbten Zellen der immunzytologischen Ki-67 Färbung sind hingegen schnell von Hand am Mikroskop ausgezählt, leider sind die Materialien, insbesondere die Antikörper für diese Färbung sehr teuer und das Färbeprotokoll ist aufgrund der Inkubationszeiten sehr zeitintensiv (ca. 5 h).

TRERE et al. und KIUPEL geben der Silberfärbung den Vorrang und bestätigen ebenfalls anhand ihrer Untersuchungen, daß die AgNOR Färbung billiger und weniger zeitintensiv im Gegensatz zur Ki-67 Anfärbung ist (KIUPEL, 1999; TRERE et al., 1991).

## **5.7 positive und negative prädiktive Werte**

Die Sensitivität und Spezifität zur Erkennung eines Lymphompatientens durch Proliferationsmarker wurde mit Hilfe der ROC Analyse ermittelt und wies sehr hohe Werte für beide Parameter auf.

Sensitivität und Spezifität geben Auskunft über den Anteil an positiven und negativen Resultaten bei Kranken und Gesunden und damit über die Leistungsfähigkeit eines Tests bezüglich einer definierten Krankheit. Die beiden Begriffe helfen aber nicht bei der Beurteilung einzelner Werte, d.h. wenn im Einzelfall die Bedeutung eines vom Labor gelieferten Resultats in Bezug auf einen bestimmten Patienten bzw. dessen Erkrankung eingeordnet werden soll. Bei der Testinterpretation muss der Tierarzt entscheiden, ob im vorliegenden Fall das pathologische Resultat tatsächlich für das Vorliegen einer Erkrankung spricht oder ob das physiologische Resultat die vermutete Krankheit ausschließt. Hierbei helfen der positive und negative prädiktive Wert der 3 Proliferationsmarker.

Liegt ein pathologisches Analysenergebnis vor, so sollte der Untersucher die Wahrscheinlichkeit kennen, mit der dieses pathologische Ergebnis einen Patienten als „richtig krank“ klassifiziert (positiver prädiktiver Wert, PPW) (FRITZE, 2008). Liegt das Analysenergebnis andererseits im Normalbereich, so sollte der Untersucher die Wahrscheinlichkeit kennen, mit der dieses normale Ergebnis einen Patienten als „richtig gesund“ klassifiziert (negativer prädiktiver Wert, NPW) (FRITZE, 2008). Sind diagnostische Sensitivität (Verhältnis der Tiere mit positivem Testergebnis zu den tatsächlich Kranken) und Spezifität (Verhältnis der Tiere mit negativem Testergebnis

zu den tatsächlich Kranken) sowie die Krankheitsprävalenz (Anteil der Erkrankung in einem Untersuchungsgut zu einem bestimmten Zeitpunkt) bekannt, lässt sich sowohl der positive als auch der negative prädiktive Wert eines pathologischen Analyseergebnisses berechnen (FRITZE, 2008).

Die jährliche Inzidenzrate des Lymphoms beim Hund wird zwischen 13-33 pro 100.000 Hunde (DORN et al., 1970; TESKE, 1994), in einer britischen Studie sogar mit 134 pro 100.000 Hunde angegeben (DOBSON et al., 2002). Eine andere britische Publikation legte 2003 bei 130.684 krankenversicherten Hunden eine Inzidenzrate von 0,079% zugrunde (EDWARDS et al., 2003). Da sich diese neuere Veröffentlichung mit 79 an Lymphom erkrankten Tieren pro 100.000 Hunde genau in dem oben angegebenen Bereich befindet, wurde diese jährliche Inzidenzrate in unserer Studie verwendet.

Wie in humanen NHL, so variiert auch die Histologie und der Immunphänotyp der kaninen Lymphome geographisch (TESKE et al., 1994b). Die Gründe hierfür sind unbekannt. Umwelttechnische Faktoren oder unterschiedliche genetische Hintergründe von Züchterpopulationen könnten hierbei von Bedeutung sein (TESKE et al., 1994b).

Unter Einbeziehung der jährlichen Inzidenzrate und der Verbreitung von kaninen Lymphomen in England mit einem Prozentsatz von 0,079% folgt ein sehr niedriger errechneter positiver prädiktiver Wert für alle hier untersuchten Proliferationsmarker bei gleichzeitig sehr hohem negativem prädiktivem Wert. Dies lässt sich daher erklären, dass der positive prädiktive Wert maßgeblich durch die Krankheitsprävalenz beeinflusst wird, d.h. bei einer relativ niedrigen Prävalenz ist der prädiktive Wert eines positiven Ereignisses (PPN) immer relativ klein, selbst wenn Sensitivität und Spezifität hoch sind (FRITZE, 2008). Folglich ist die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem pathologischen Testergebnis der Patient tatsächlich einen entsprechenden Tumor aufweist, relativ klein.

Die Resultate zeigen anschaulich, dass sich dieser Test insbesondere zum Ausschluß eines Lymphoms eignet. Als Screeningparameter sind die Proliferationsmarker unseren Ergebnissen nach weniger empfehlenswert.

## 5.8 Grenzen

Auch diese Studie weist Grenzen auf, denn die Diagnosen der kaninen FNAs basieren auf den zytologischen Beurteilungskriterien zur Unterscheidung der jeweiligen Lymphadenopathien (s. Kap. 2.1.7). Aus diesem Grund ist nicht auszuschließen, dass bei stark aktivierten Gewebezellen eine Abgrenzung von Tumorzellen unter Umständen schwierig war und dass folglich ein kanines Lymphom im Anfangsstadium fälschlicher Weise als eine reaktive Hyperplasie eingestuft worden sein könnte. Jedoch zeigte die immunzytologische B- bzw. T- Zell-Differenzierung der Lymphome bei allen Lymphompatienten eine deutliche positive Reaktion, die bei Hunden mit reaktiven Hyperplasien fehlte.

Eine weitere Limitation unserer Studie ist die Tatsache, dass die Zytologie die Referenzmethode darstellt und somit auch Testmethoden mit einer höheren Sensitivität oder Spezifität zur Detektion eines Lymphoms maximal Werte von 100% erreichen können.

Aufgrund der Untersuchungstechniken war die Untersucherin nicht verblindet, auch wenn die eigentliche zytologische Diagnose letztendlich erst von Frau Dr. N. Bauer nach Auswertung aller Ergebnisse bestätigt wurde. Die AgNOR Auszählung und Ausmessung wurde jedoch halbautomatisch vorgenommen, weshalb eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eventuelle Kenntnis der zytologischen Diagnose auszuschließen ist.

Insgesamt haben sich die durchschnittliche AgNOR- Anzahl und -Fläche/ Zelle, sowie die prozentuale Anzahl Ki-67 positiver Zellen als wichtige Parameter zur Beurteilung der Anzahl der proliferierenden Zellen (Wachstumsfraktion) und der Geschwindigkeit der Zellproliferation (Zellzyklusgeschwindigkeit) in der Routineuntersuchung von lymphatischem Gewebe erwiesen und stellen folglich gute Proliferationsmarker in FNAs kaniner Lymphknoten dar. Wünschenswert wäre, dass eine bessere Kenntnis der Wachstumsfraktion und Zellzyklusgeschwindigkeit vielleicht bei zukünftig folgenden Studien auch in Hilfestellung prognostischer Art für die Therapie der Lymphompatienten resultieren. Zum heutigen Zeitpunkt ermöglichen die Proliferationsmarker eine Ausschlußdiagnose von Hunden mit kaninen Lymphomen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser prospektiven Studie war die Etablierung von AgNORs und Ki-67 als Proliferationsmarker bei kaninen Lymphknoten- Feinnadelaspiraten (FNAs). Von Februar 2003 bis Oktober 2005 wurden 101 Hunde, darunter 26 klinisch gesunde Hunde, 31 Hunde mit Lymphadenitiden, 25 mit reaktiven Hyperplasien und 19 Hunde mit Lymphomen in die Untersuchung einbezogen. Die Diagnosefindung mittels May-Grünwald/ Giemsa Färbung, sowie die AgNOR/Ki-67- Doppelfärbung erforderte ein Minimum von 3- 5 zytologischen Präparaten. Zur halbautomatischen Auswertung mittels QWin/QGo und QUIPS modifizierter Software (Leica) wurden die durchschnittliche AgNOR- Anzahl und -Fläche/ Zelle, sowie die prozentuale Anzahl Ki-67 positiver Zellen in 100- 167 Zellen herangezogen. Die durchschnittliche AgNOR Anzahl/ Zelle betrug  $1,36 \pm 0,19$  bei gesunden Hunden,  $1,55 \pm 0,26$  bei Lymphadenitis-,  $1,65 \pm 0,32$  bei reaktiver Hyperplasie- und  $3,67 \pm 1,08$  bei Lymphompatienten. Die durchschnittliche AgNOR Fläche/ Zelle wies  $40,31 \pm 4,63 \mu\text{m}^2$  bei gesunden Hunden,  $45,03 \pm 5,87 \mu\text{m}^2$  bei Lymphadenitisprobanden,  $48,88 \pm 7,03 \mu\text{m}^2$  bei Tieren mit reaktiver Hyperplasie und  $92,48 \pm 25,48 \mu\text{m}^2$  bei Hunden mit Lymphomen auf. Die prozentuale Anzahl Ki-67 positiver Zellen betrug bei gesunden Hunden  $2,67 \pm 0,99\%$ , bei Lymphadenitispatienten  $5,04 \pm 3,34\%$ , bei reaktiven Hyperplasieprobanden  $5,36 \pm 2,14\%$  und bei Hunden mit Lymphomen  $30,16 \pm 10,81\%$ . Alle Parameter waren in der Lymphomgruppe signifikant höher als in der Nicht- Lymphomgruppe ( $P < 0,001$ ). Weiterhin zeigte sich eine gute Korrelation zwischen Ki-67 positiven Zellen und der AgNOR Anzahl bzw. Fläche/ Zelle sowie zwischen AgNOR Anzahl und Fläche/ Zelle. Die Sensitivität und Spezifität der AgNOR Anzahl zur Erkennung eines Lymphoms betrug  $94,7\%$  und  $96,3\%$  bei einem Cut- off- Wert von  $>2,04$  AgNORs/ Zelle. Der Schwellenwert für die durchschnittliche AgNOR Fläche/ Zelle war  $>58,3 \mu\text{m}^2$  (Sensitivität  $94,7\%$ , Spezifität  $95,1\%$ ), sowie  $>10,4\%$  für Ki-67 positive Zellen (Sensitivität  $94,7\%$  und Spezifität  $97,6\%$ ). Unter Einbeziehung der jährlichen Inzidenzrate und der Verbreitung von kaninen Lymphomen in England mit einem Prozentsatz von  $0,079\%$  folgt ein errechneter positiver prädiktiver Wert  $<1,51-3,03\%$  sowie ein negativer prädiktiver Wert von  $100\%$  für alle 3 Proliferationsmarker. Die Resultate zeigen deutlich, dass sich dieser Test insbesondere zum Ausschluß eines

Lymphoms eignet. Als Screeningparameter sind die Proliferationsmarker unseren Ergebnissen nach weniger empfehlenswert.

Insgesamt haben sich die durchschnittliche AgNOR- Anzahl und -Fläche/ Zelle, sowie die prozentuale Anzahl Ki-67 positiver Zellen als wichtige Parameter zur Beurteilung der Anzahl der proliferierenden Zellen (Wachstumsfraktion) und der Geschwindigkeit der Zellproliferation (Zellzyklusgeschwindigkeit) in der Routineuntersuchung von lymphatischem Gewebe erwiesen und stellen folglich gute Proliferationsmarker für FNAs kaniner Lymphknoten dar.

## 7 SUMMARY

The aim of this prospective study was to establish AgNORs and Ki-67 as markers of proliferation in canine lymph node fine needle aspirates (FNAs). Between February 2003 and October 2005, lymph node FNAs of 101 dogs grouped as normal (n=26), lymphadenitis (n=31), reactive hyperplasia (n=25) and lymphoma (n=19) were included. For diagnosis at least 3- 5 smears each were prepared for a May-Grünwald/ Giemsa stain and an AgNOR/Ki-67- double stain. By means of a semiautomatic system using QWin/QGo and QUIPS modified software (Leica) mean AgNOR counts and area/ cell and the percentage of Ki-67 positive cells were determined. The number of cells analysed ranged from 100 to 167 cells each.

Mean AgNOR counts/ cell were  $1.36 \pm 0.19$  in normal dogs,  $1.55 \pm 0.26$  in lymphadenitis,  $1.65 \pm 0.32$  in reactive hyperplasia and  $3.67 \pm 1.08$  in lymphoma. Mean AgNOR area/ cell was  $40.31 \pm 4.63 \mu\text{m}^2$ ,  $45.03 \pm 5.87 \mu\text{m}^2$ ,  $48.88 \pm 7.03 \mu\text{m}^2$  and  $92.48 \pm 25.48 \mu\text{m}^2$  respectively. The percentage of Ki-67 positive cells were  $2.67 \pm 0.99\%$  in normal dogs,  $5.04 \pm 3.34\%$  in lymphadenitis,  $5.36 \pm 2.14\%$  in reactive hyperplasia and  $30.16 \pm 10.81\%$  in lymphoma. All parameters were significantly higher in dogs with lymphoma than in the other groups ( $P < 0.001$ ). Furthermore, a good correlation between Ki-67 positive cells and AgNOR counts and area/ cell as well as between AgNOR counts and area/ cell was shown.

Sensitivity and specificity of the AgNOR count for diagnosing lymphoma was 94.7% and 96.3% at a cut off value of  $>2.04$  AgNORs/ cell. The cut off value for AgNOR area/ cell was  $>58.3 \mu\text{m}^2$  (sensitivity 94.7%, specificity 95.1%), and  $>10.4\%$  for Ki-67 positive cells (sensitivity 94.7%, specificity 97.6%). With regard to the annual incidence rate and distribution of canine lymphoma in Great Britain with a percentage of 0.079%, a positive predictive value (PPV) of  $<1.51-3.03\%$  and a negative predictive value (NPV) of nearly 100% was calculated for all 3 proliferation markers. These results demonstrated clearly that the tests were especially valuable to rule out lymphoma; however they were less suitable as a screening tool.

In conclusion our investigations show that mean AgNOR counts and area/ cell and the percentage of Ki-67 positive cells serve as useful parameters to determine the number of cycling cells (growth fraction) and the kinetics of cell proliferation (cell



cycle duration) in routine investigations of lymphatic tissues and are therefore good markers of proliferation in canine lymph node FNAs.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

ANSAI,S.; KOSEKI,S. (1995):

Assessment of cellular proliferation of eccrine acrospiromas and eccrine sweat gland carcinomas by AgNOR counting and immunohistochemical demonstrating of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67.  
Clin Exp Dermatol, 20, 27-34.

AUBELE,M.; BIESTERFELD,S.; DERENZINI,M.; HUFNAGL,P.; MARTIN,H.;  
OFNER,D.; PLOTON,D.; RUSCHOFF,J. (1994):

Guidelines of AgNOR quantitation. Committee on AgNOR Quantitation within the European Society of Pathology.  
Zentralbl Pathol, 140, 107-108.

BAKER,R.; LUMSDEN,J.H. (2000a):

Cytopathology Techniques and Interpretation.

In: Baker, R. and Lumsden, J. H.: Color Atlas of the Cytology of the Dog and Cat,  
Mosby, 7-16.

BAKER,R.; LUMSDEN,J.H. (2000b):

The lymphatic system.

In: Baker, R. and Lumsden, J. H.: Color Atlas of the Cytology of the Dog and Cat,  
Mosby, 71-82.

BETSILL,W.L.; HAJDU,S.I. (1980):

Percutaneous aspiration biopsy of lymph nodes.

Am J Clin Pathol, 73, 471-479.

BITTNER,S.; WIELCKENS,K. (1988):

Glucocorticoid-induced lymphoma cell growth inhibition: the role of leukotriene B4.  
Endocrinology, 123, 991-1000.

BOENISCH,T.; FARMILO,A.J.; STEAD,R.H.; KEY,M.; WELCHER,R.; HARVEY,R.;  
ATWOOD,K.N.; HENNE,C. (2003):

Handbuch: Immunzytochemische Färbemethoden.

DakoCytomation GmbH und DAkoCytomation Corp., Hamburg und Carpinteris, Ca,  
USA

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.

- 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.
- 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 Pathol, 33, 527-532.
- BROWN DC; GATTER KC (1990a):  
Monoclonal antibody Ki 67: its use in histopathology.  
Histopathology, 17, 489-503.
- BROWN DC; GATTER KC (1990b):  
Proliferation in non- Hodgkin´s lymphoma: a comparison of Ki-67 staining on fine needle aspiration and cryostat sections.  
J Clin Pathol, 43, 325-328.
- BROWN DC; GATTER KC (2002):  
Ki 67 protein: the immaculate deception?  
Histopathology, 40, 2-11.
- BRUGAL,G. (1994):  
Interpretation of proliferation markers.  
Comp Cytol Histol Labor, 234-239.
- BRUNE,K. (1996):  
Pharmakologie und Toxikologie transparent.  
Chapman & Hall, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras
- CANEPA,M.; GAMBINI,C.; SEMENTA,A.R. (1990):  
Nucleolar organizer regions and Ki 67 immunostaining in ductal breast cancer: a comparative study.  
Pathologica, 82, 125-132.
- CARTER,R.F.; FELDMANN,P.S.; INNES,D.J.; FRIERSON,H.F. (1988):  
The role of fine- needle aspiration cytology in the diagnosis of lymphoma.  
Acta Cytol, 32, 848-853.

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, 154-156.

CORDELL,J.L.; FALINI,B.; ERBER,W.N.; GHOSH,A.K.; ABDULAZIZ,Z.;  
MACDONALD,S.; PULFORD,K.A.; STEIN,H.; MASON,D.Y. (1984):  
Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes).  
J Histochem Cytochem, 32, 219-229.

COSTA,A.L.L.; ARAUJO,N.S.; ARAUJO,V.C.; PINTO,JR.D.S. (1999):  
PCNA/ AgNOR and Ki 67/ AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma.  
J Oral Pathol Med, 28, 438-441.

CROCKER,J. (1987):  
Nucleolar organizer regions in lymphomas.  
J Pathol, 151, 111-119.

CROCKER,J.; EGAN,M.J. (1988):  
Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin's lymphomas.  
J Pathol, 156, 233-239.

CROCKER,J.; MURRAY,P.G.; BOLDY,D.A. (1989):  
Sequential labelling with monoclonal antibodies (including Ki67) and demonstration of AgNORs in frozen sections.  
J Pathol, 159, 169-172.

CULMSEE,K. (2002):  
Stand der Lymphomdiagnostik bei Hund und Katze.  
Vet- MedReport, 48.Jahrestagung der Fk-DVG, 1-2.

DALQUEN,P. (1995):  
Leistungsfähigkeit der Immunzytochemie in der zytologischen Tumordiagnostik.  
Verh Dtsch Ges Pathol, 79, 577.

DERENZINI,M. (2000):  
The AgNORs.  
Micron, 31, 117-120.

DERENZINI,M.; PESSION,A.; TRERE,D. (1990):  
The quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells.  
Lab Invest, 63, 137-140.

DERENZINI,M.; PLOTON,D. (1994):  
Interphase nucleolar organizer regions.  
In: Crocker, J.: Molecular biology in histopathology, Wiley, New York, 231-249.

DERENZINI,M.; TRERE,D. (1994):  
AgNOR proteins as a parameter of the rapidity of cell proliferation.  
Zentralbl Pathol, 140, 7-10.

DERVAN,P.A.; GILMARTIN,L.G.; LOFTUS,B.M. (1989):  
Breast carcinoma kinetics. Argyrophilic Nucleolar Organizer Region counts correlate with Ki 67 scores.  
Am J Clin Pathol, 92, 401-407.

DI STEFANO,D.; MINGAZZINI,P.; SCUCCHI,L.; DOETTI,M.; MARINOZZI,V. (1991):  
A comparative study on histopathology, hormone receptors, peanut lecithin binding, Ki 76 immunostaining and nucleolar organizer region- associated proteins in human breast cancer.  
Cancer, 67, 463-470.

DOBSON,J.M. (2004):  
Classification on canine lymphoma: a step forward.  
Vet J, 167, 158-166.

DOBSON,J.M.; SAMUEL,S.; MILSTEIN,H. (2002):  
Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs.  
J Small Anim Pract, 240-246.

DORN,C.R.; TAYLOR,D.; SCHNEIDER,R. (1970):  
The epidemiology of canine leukemia and lymphoma.  
In: Ducher, R. M.: Comparative leukemia Research proceeding 4th International Symposium on comparative Leukemia reaserch, Cherry Hill, NJ, 403-415.

EDWARDS,D.; HENLEY,W.; HARDING,E.F. (2003):  
Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs.  
Comp Oncol, 1, 200-206.

ETTINGER,S.N.; SCASE,T.J.; OBERTHALER,K.T.; CRAFT,D.M.; MCKNIGHT,J.A.; LEIBMAN,N.F.; CHARNEY,S.C.; BERGMAN,P.J. (2006):  
Association of AgNORs, Ki 67, and PCNA scores with histologic grade and survival in dogs with soft tissue sarcomas: 60 cases (1996-2002).  
JAVMA, 228, 1053-1062.

FERRER,L.; FONDEUILA,D.; RABANAL,R. (1993):  
Immunohistochemical detection of CD3 antigen (pan-T marker) in canine lymphomas.  
J Vet Diagn Invest, 616-620.

FISHER,D.J.; NAYDAN,D.; WERNER,L.L. (1995):  
Immunophenotyping lymphomas in dogs: A comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy samples.  
Vet Clin Pathol, 24, 118-123.

FORTH,W.; HENSCHLER,D.; RUMMEL,W.; STARKE,K. (1992):  
Pharmakologie und Toxikologie.  
Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich

FOURNEL- FLEURY,C.; MAGNOL,J.-P.; BRICAIRE,P. (1997a):  
Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non- Hodgkin`s lymphomas.  
J Comp Pathol, 117, 35-59.

FOURNEL- FLEURY,C.; MAGNOL,J.-P.; CHABANNE,L. (1997b):  
Growth fractions in canine non- Hodgkin`s lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki 67 antigen.  
J Comp Pathol, 117, 61-72.

FOURNEL- FLEURY,C.; MAGNOL,J.-P.; GUELFJ,J.-F. (1994a):  
General principles of methodology and interpretation in cancer cytology.  
In: Color Atlas of Cancer Cytology of the dog and cat, Conference nationale des Veterinaires Specialises en Petits Animaux, Paris, 19-51.

FOURNEL- FLEURY,C.; MAGNOL,J.-P.; GUELFJ,J.-F. (1994b):  
The lymph node.  
In: Color Atlas of Cancer Cytology of the dog and cat, Conference nationale des Veterinaires Specialises en Petits Animaux, Paris, 243-321.

FRITZE,J. (2008):  
Funktionsprüfungen und Diagnostik als Grundlagen der Begutachtung:  
Labordiagnostik.  
In: Die ärztliche Begutachtung, Springer Verlag, 109-114.

- GERDES,J.; DALLENBACH,F.; LENNERT,K. (1984):  
Growth fractions in malignant Non- Hodgkin`s lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki 67.  
Hematol Oncol, 2, 365-371.
- GERDES,J.; LELLE,R.; PICKARTZ,H. (1986):  
Growth fractions in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki 67.  
J Clin Pathol, 39, 977-980.
- GERDES,J.; LI,L.; SCHLUTER,C. (1991):  
Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki 67.  
Am J Pathol, 138, 867-873.
- GERDES,J.; SCHWAB,H.; LEMKE,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.; STEIN,H.; PILERI,S.; RIVANO,M.T.; GOBBI,M. (1987):  
Prognostic relevance of tumor cell growth fraction in malignant non- Hodgkin`s lymphomas.  
Lancet, 11, 448-449.
- GIRI,D.D.; DUNDAS,S.A.C.; SANDERS,P.R. (1989a):  
Silver binding nucleoli and nucleolar organizer regions in fine needle aspiration cytology of the breast.  
Acta Cytol, 33, 173-175.
- GIRI,D.D.; NOTTINGHAM,J.F.; LAWRY,J.; DUNDAS,S.A.; UNDERWOOD,J.C. (1989b):  
Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry.  
J Pathol, 157, 307-313.
- GOODPASTURE,C.; BLOOM,S.E. (1975):  
Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining.  
Chromosoma, 53, 37-50.

GREENLEE,P.G.; FILIPPA,D.A.; QUIMBY,F.W.; PATNAIK,A.K. (1990):  
Lymphomas in dogs. A morphological, immunological and clinical study.  
Cancer, 66, 480-490.

GROGAN,T.M.; LIPPAMN,S.M.; SPIER,C.M. (1988):  
Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large  
cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki 67.  
Blood, 71, 1157-1160.

HALL,P.A.; CROCKER,J.; WATTS,A.; STANSFELD,A.G. (1988a):  
A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki 67 immunostaining in  
Non- Hodgkin`s lymphoma.  
Histopatholog (Oxf), 12, 373-381.

HALL,P.A.; RICHARDS,M.A.; GREHORY,W.M. (1988b):  
The prognostic value of Ki 67 immunostaining in non- Hodgkin`s lymphoma.  
J Pathol, 154, 223-235.

HANLEY,J.A.; MCNEIL,B.J. (1983):  
A Method of comparing the Areas under Receiver Operating Curves derived from the  
same cases.  
Radiology, 148, 839-843.

HARA,A.; HIRAYAMA,H.; SAKAI,N. (1990):  
Correlation between nucleolar organizer region staining and Ki 67 immunostaining in  
human gliomas.  
Surg Neurolog, 33, 320-324.

HENDRICKS,J.B.; RAINER,R.; MUNAKATA,S. (1995):  
Computer assisted and visual methody of assessing cellular proliferation in tissue  
sections from non- Hodgkin`s lymphoma. A comparison.  
Anal Quant Cytol Histol, 17, 383-388.

HOWELL,W.M.; BLACK,D.A. (1980):  
Controlled siver- staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal  
develope: a one step method.  
Experimentia, 36, 1014.

HUFNAGL,P.; GUSKI,H. (1994):  
The role of AgNORs in tumor pathology.  
Zentralbl Pathol, 140, 1-2.



HUFNAGL,P.; GUSKI,H.; SCHULZ,H.J. (1994):  
Measuring of AgNORs using image analysis.  
Zentralbl Pathol, 140, 31-35.

HUNG,L.C.; PONG,V.F.; CHENG,C.R.; WONG,F.I.; CHU,R.M. (2000):  
An improved system for quantifying AgNOR and PCNA in canine tumors.  
Anticancer Res, 20, 3273-3280.

JANMOHAMED,R.M.; MURRAY,P.G.; CROCKER,J. (1990):  
Sequential demonstration of nucleolar organiser regions and Ki67 immunolabelling in  
non- Hodgkin`s lymphomas.  
Clin Lab Haematol, 12, 395-399.

KAKEJI,Y.; KORENAGA,D. (1991):  
Predictive value of Ki 67 and argyrophilic nucleolar organizer region staining for  
lymph node metastasis in gastric cancer.  
Cancer Res, 51, 3503-3506.

KIUEPEL,M. (1999):  
Prognostische Faktoren zur Beurteilung von kaninen malignen Lymphomen unter  
besonderer Berücksichtigung der Bedeutung von Argyrophilen Nukleolus  
Organisierenden Regionen.  
Vet Med Dissertation Berlin.

KIUEPEL,M.; BOSTOCK,D.; BERGMANN,V. (1998a):  
The prognostic significance of AgNOR counts and PCNA-positive cell counts in  
canine malignant lymphomas.  
J Comp Pathol, 119, 407-418.

KIUEPEL,M.; BOSTOCK,D.E.; BERGMANN,V. (1998b):  
A semiquantitative method for the evaluation of AgNORs in canine malignant  
lymphomas.  
Eur J Vet Pathol, 4, 67-71.

KIUEPEL,M.; TESKE,E.; BOSTOCK,D. (1999):  
Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma.  
Vet Pathol, 36, 292-300.

KRAVIS,L.D.; VAIL,D.M.; KISSEBERTH,W.C.; OGILVIE,G.K.; VOLK,L.M. (15-10-  
1996):  
Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and  
biopsy specimens from mast cell tumors in dogs.  
J Am Vet Med Assoc, 209, 1418-1420.

- LANGENBACH,A.; MCMANUS,P.M.; HENDRICK,M.J. (2001):  
Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for  
evidence of metastases in dogs and cats with solid tumours.  
J Am Vet Med Assoc, 218, 1424-1428.
- LEEK,R.D.; ALISON,M.R.; SARRAF,C.E. (1991):  
Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions in non-  
proliferating and proliferating tissues.  
J Pathol, 165, 43-51.
- LENNERT,K. (1975):  
Morphology and classification of malignant lymphomas an so- called reticuloses.  
Acta Neuropathol, 6, 1-1.
- LENNERT,K.; FELLER,A.C. (1990):  
Histopathologie der non- Hodgkin-lymphome (nach der aktualisierten Kiel-  
Klassifikation).  
Springer Verlag, Berlin
- LÖHR,C.V.; TEIFKE,J.P.; FAILING,K.; WEISS,E. (1997):  
Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the  
standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of  
Ki-67 and PCNA.  
Vet Pathol, 34, 212-221.
- LORENZATO,M. (2000):  
Proliferation assessment in breast cancer: a double-staining technique for AgNOR  
quantification in MIB-1 positive cells especially adapted for image cytometry.  
Micron, 31, 151-159.
- LÖSCHER,W.; UNGEMACH,F.R.; KROKER,R. (1994):  
Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.  
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- MEINKOTH,J.H.; COWELL,R.L. (2008):  
Sample collection and preparation in cytology: increasing diagnostic yield.  
In: Meinkoth, J. H and Cowell, R. L.: The Veterinary Clinics- Small Animal Practice,  
W.B. Saunders Company, 1187-1207.
- MEINKOTH,J.H.; DORSEY,K.E.; COWELL,R.L. (2008):  
Lymph node cytology.  
In: Meinkoth, J. H and Cowell, R. L.: The Veterinary Clinics- Small Animal Practice,  
W.B. Saunders Company, 47-67.

MESSICK, J.B. (2008):

The lymph node.

In: Cowell, R. L., Duncan, J. R. and Tyler, R. D.: Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat, W.B.Saunders Company, 97-103.

MISCHKE, R. (2005a):

Beurteilungskriterien für zytologische Präparate ausgewählter Lokalisationen.

In: Mischke, R.: Zytologisches Praktikum für die Veterinärmedizin, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH&Co.KG, Hannover, 139-178.

MISCHKE, R. (2005b):

Die zytologische Diagnostik und ihre Anwendung in der tierärztlichen Praxis.

In: Mischke, R.: Zytologisches Praktikum für die Veterinärmedizin, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH&Co.KG, Hannover, 9-20.

MISCHKE, R. (2005c):

Grundlagen der Interpretation zytologischer Präparate.

In: Mischke, R.: Zytologisches Praktikum für die Veterinärmedizin, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH&Co.KG, Hannover, 67-79.

MISCHKE, R. (2005d):

Techniken zur Probenmaterialgewinnung und Präparateherstellung.

In: Mischke, R.: Zytologisches Praktikum für die Veterinärmedizin, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH&Co.KG, Hannover, 21-48.

MISCHKE, R. (2005e):

Weitere Behandlung der zytologischen Präparate.

In: Mischke, R.: Zytologisches Praktikum für die Veterinärmedizin, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH&Co.KG, Hannover, 49-62.

MOONEY, S.C.; MAHONY, O.M. (1989):

Treatment and prognostic factors in lymphoma in cats: 103 cases (1977- 1981).  
J Am Vet Med Assoc, 194, 696-699.

MORITZ, A.; BAUER, N. (2001):

Biopsietechnik in der Tumordiagnostik.

Tierärztl Prax, 29 (K), 5-13.

MOURAD, W.A.; SNEIGE, N.; KATZ, R.L.; ORDONEZ, 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.

- MUNAKATA,S.; HENDRICKS,J.B. (1993):  
Morphometric analysis of AgNORs in imprints and sections from non-Hodgkin's lymphomas. An approach to standardization.  
Anal Quant Cytol Histol, 15, 329-334.
- MUNAKATA,S.; HENDRICKS,J.B. (1994):  
A multilabeling technique for simultaneous demonstration and quantitation of Ki 67 and nucleolar organizer regions (AgNORs) in paraffin-embedded tissue.  
J Histochem Cytochem, 42, 789-793.
- NAGAO,T.; ISHIDA,Y. (1995):  
Nucleolar organizer regions in hepatocellular carcinoma related to the cell cycle, cell proliferation and the histologic grade.  
Pathol Res Pract, 191, 967-972.
- NCI (1982):  
National Cancer Institute: The non- Hodgkin`s lymphoma pathologic classification project: NCI sponsored study of classifications of non- Hodgkin`s lymphomas: Summary and description of a working formulation for clinical usage.  
Cancer, 49, 2112-2135.
- NEAL,M.J.; STAHLMANN,R. (1995):  
Pharmakologie.  
Blackwell Wissenschafts- Verlag, Berlin, Wien, Oxfort, Edinburgh, Boston, London, Melbourne, Paris, Yokohama
- NIELSEN,A.L.; NYHOLM,H.C. (1994):  
Expression of MIB-1 (paraffin Ki 67) and AgNOR morphology in endometrial adenocarcinomas of endometrioid type.  
Int J Gynecol Pathol, 13, 37-44.
- ODERMATT,B.F.; KNECHT,H.; HAGEN,M.F.; FEHR,J.; RÜTTNER,J.R. (1987):  
Diagnostic and prognostic value of monoclonal antibodies in immunophenotyping of T cell lymphomas.  
Acta Haematol, 77, 72-77.
- OFNER,D.; AUBELE,M.; BIESTERFELD,S.; DERENZINI,M.; HUFNAGL,P.; PLOTON,D.; TRERE,D.; RUESCHHOFF,J. (1995):  
Guidelines of AgNOR quantitation: first update.  
Virchows Archiev, 427, 341.

OGILVIE,G.K.; ANTONY,S.M. (1994):

Lymphoma: Management of special diseases.

In: Managing the veterinary cancer patient- A practice manual, Veterinary Learning Systems, USA, 228-259.

OKABE,Y.; NAKAMURA,S.; OKUMURA,H.; MATANO,S. (1991):

The relationship 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, 2031-2035.

OWEN,L.N. (1980):

TNM classification of tumors in domestic animals.

World Health Organization, Geneva, Switzerland, 46-47.

PETRIE,A.; WATSON,P.; . (2006):

Additional topics.

In: Statistics for animal and veterinary science, Petrie,A.; Watson,P., Berlin, 168-181.

PICH,A.; CHIUSA,L.; MARGARIA,E. (2000):

Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology.

Micron, 31, 133-141.

PICH,A.; VALENTE,G.; AZZONI,L. (1991):

Argyrophilic nucleolar organizer region counts and Ki-67 scores in human renal cell carcinoma.

Pathol Res Pract, 187, 482-486.

PILERI,S.; GERDES,J. (1987):

Immunohistochemical determination of growth fractions in human permanent cell lines and lymphoid tumours. A critical comparison of the monoclonal antibodies OKT9 and Ki 67.

Br J Haematol, 65, 271-276.

PLOTON,D.; MENAGER,M.; JEANNESSON,P.; HIMBER,G.; PIGEON ,F.;  
ADNETT,J.J. (1986):

Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level.

Histochem J, 18, 5-14.

PONCE,F.; MAGNOL,J.-P.; LEDIEU,D.; MARCHAL,T.; TURININELLI,V.; CHALVET-MONFRAY,K.; FOURNEL- FLEURY,C. (2004):

Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy.

Vet J, 167, 158-166.

PONCE,F.; MARCHAL,T.; MAGNOL,J.-P.; TURININELLI,V.; LEDIEU,D.; BONNEFONT,C.; PASTOR,M.; DELIGNETTE,M.L.; FOURNEL- FLEURY,C. (2010):

A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology.

Vet Pathol, 47, 414-433.

QUINN,C.M. (1990):

The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables.

J Pathol, 160, 93-102.

RASKIN,R.E.; MEYER,D.J. (2009):

Lymphoid system.

In: Raskin, R. E. and Meyer, D. J.: Atlas of canine and feline cytology, W.B. Saunders Company, 93-134.

RASSNICK,K.M.; MAULDIN,G.N.; MOROFF,S.D.; MAULDIN,G.E.; MCENTEE,M.C.; MOONEY,S.C. (1999):

Prognostic value of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in feline intestinal lymphoma.

J Vet Intern Med, 13, 187-190.

RAVEENDRAN,P.K.; SUJATHAN,K.; KANNAN,S. (1994):

Argyrophilic nucleolar organizer regions in the evaluation of tumor progression in the oral mucosa correlation with tissue pathology.

J Cancer Res Clin Oncol, 120, 723-726.

RAYMOND,W.A.; LEONG,AS.Y. (1989):

Nucleolar organizer regions related to growth fraction in human breast carcinoma.

Hum Pathol, 20, 741-746.

RISHI,M.; SCHWARTING,R.; KOVATICH,A.J. (1993):

Detection of growth fraction in tumor by Ki 67 monoclonal antibody in cytologic smears: A prospective study of 40 cases.

Diagn Cytopathol, 9, 52-56.

- RODOLICO,V.; MARTORANA,A.; GULOTTA,G. (2003):  
Prognostic significance of standardized AgNOR analysis and Ki 67 immunostaining in  
gastrointestinal stromal tumors.  
Anal Quant Cytol Histol, 25, 199-209.
- RÜSCHOFF,J. (1990):  
Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a  
contribution to standardization.  
J Pathol, 161, 113-118.
- RÜSCHOFF,J.; FAUSER,G.; KNUCHEL,R.; HOFSTADTER,F. (1994):  
AgNOR quantification with special reference to staining patterns.  
Zentralbl Pathol, 140, 23-30.
- RUSLANDER,D.A.; GEBHARD,D.H.; TOMPKONS,M.B. (1997):  
Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders.  
In Vivo, 11, 169-172.
- SAKAI,H.; NODA,A.; SHIRAI,N.; IIDAKA,T.; YANAI,T.; MASEGI,T. (2002):  
Proliferative Activity of Canine Mast Cell Tumours Evaluated by Bromodeoxyuridine  
Incorporation and Ki 67 Expression.  
J Comp Pathol, 127, 233-238.
- 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.
- SCASE,T.J.; EDWARDS,D.; MILLER,J.; ET.AL. (2006):  
Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with  
prognosis.  
J Vet Intern Med, 20, 151-158.
- SCHOLZEN,T.; GERDES,J. (2000):  
The Ki-67 Protein: From the known and the unknown.  
J cellular Physiology, 182, 311-322.
- SCHRAPE,S.; JONES,D.B.; WRIGHT,D.H. (1987):  
A comparison of three methods for the determination of the growth fraction in lesions  
of the breast.  
Br J Cancer, 55, 283-286.

SCHWARTZ,B.R.; PINKUS,G.; WEINBERG,D.S.; BACUS,S.; TODER,M. (1989):  
Cell proliferation in non- Hodgkin`s lymphomas. Digital image analysis of Ki67  
antibody staining.  
Am J Pathol, 134, 327-336.

SCOTT,C.S.; RAMSDEN,W.; LIMBERT,H.J.; MASTER,P.S.; ROBERTS,B.E. (1988):  
Membrane transferrin receptor (TfR) and nuclear proliferation associated Ki 67  
expression in hemopoietic malignancies.  
Leukemia, 2, 442.

SIMOES,J.P.; SCHONING,P.; BUTINE,M. (1994):  
Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods.  
Vet Pathol, 31, 637-647.

SMITH,P. (1988):  
The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique.  
J Pathol, 155, 109-112.

SMITH,P. (1993):  
Correlation between PCNA and AgNOR scores in non Hodgkin`s lymphomas using  
sequential staining technique.  
J Clin Pathol, 46, 28-31.

SMITH,R.; CROCKER,J. (1988):  
Evaluation of the nucleolar organizer region associated protein in breast malignancy.  
Histopathology, 12, 113-125.

SOOMRO,I.N. (1990):  
Growth fraction in lung tumours determined by Ki 67 immunostaining and comparison  
with AgNOR scores.  
J Pathol, 162, 217-222.

SPIELER,P.; SCHMIDT,U. (1978):  
How exact are the diagnosis and classification of malignant lymphoma from  
aspiration biopsy smears?  
Pathol Res Pract, 163, 232-250.

STANSFELD,A.G.; DIEBOLD,J.; KAPANCI,Y.; KELENYI,G.; LENNERT,K.;  
MIODUSZEWSKA,O.; NOEL,H.; RILKE,F.; SUNDSTROM,C.; WRIGHT,D.H.; VAN  
UNNIK,J.A.M. (1988):  
Updated Kiel classification for lymphomas.  
Lancet, 32, 219-229.



SUTO,T.; SURGAL,T.; NAKAMURA,S.; FUNATO,O.; NITTA,H.; SASAKI,K.;  
KANNO,S.; SAITO,K. (1998):  
Assessment of the expression of p53, MIB 1 (Ki 67 antigen) and argyropilic nucleolar  
organizer regions in carcinoma of the extrahepatic bile duct.  
Cancer, 82, 86-95.

TESKE,E. (1994):  
Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non- Hodgkin`s  
lymphoma.  
Vet Quarterly, 16, 209-219.

TESKE,E. (2000):  
Hämatopoietische Tumore.  
In: Kessler, M.: Kleintieronkologie  
Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen, Parey,  
523-551.

TESKE,E.; VAN HEERDE,P. (1996):  
Diagnostic value and reproducibility of fine-needle aspiration cytology in canine  
malignant lymphoma.  
Vet Quarterly, 18, 112-115.

TESKE,E.; VAN HEERDE,P.; RUTTEMAN,G.R.; KURZMAN,I.; MOORE PF;  
MACEWEN,E.G. (1994a):  
Prognostic factors for treatment of malignant lymphomas in dogs.  
J Am Vet Med Assoc, 205, 1722-1728.

TESKE,E.; WISMAN,P.; MOORE PF (1994b):  
Histologic classification and immunophenotyping of canine non- Hodgkin`s  
lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell  
morphology.  
Exp Hematol, 22, 1179-1187.

TRERE,D. (1994):  
Technical and methodological aspects of silver staining and measurement of  
nucleolar organizer region (NOR).  
Zentralbl Pathol, 140, 11-14.

TRERE,D. (2000):  
AgNOR staining and quantification.  
Micron, 31, 127-131.

TREERE,D.; FARABEGOLI,F.; CANCELLIERI,A.; CECCARELLI,C.; EUSEBI,V.; DERENZINI,M. (1991):

AgNOR area in interphase nuclei of human tumours correlates with the proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labelling and Ki-67 immunostaining.

J Pathol, 165, 53-59.

TYLER,R.D.; COWELL,R.L.; BALDWIN,C.J.; MORTON,R.J. (1999):

Introduction.

In: Duncan, J. R., Cowell, R. L. and Tyler, R. D.: Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat, W.B.Saunders Company, 1-19.

VAIL,D.M.; KRAVIS,L.D.; KISSEBERTH,W.C. (1997):

Application of rapid CD3 immunophenotype analysis and argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) frequency to the fine needle aspirate specimens from dogs with lymphoma.

Vet Clin Pathol, 26, 66-69.

VAIL,D.M.; MOORE,A.S.; OGILVIE,G.K.; VOLK,L.M. (1998):

Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and their association with prognosis in 90 cats.

J Vet Intern Med, 12, 349-354.

VAJDOVICH,P.; PSADER,R.; TOTH,Z.A.; PERGE,E. (2004):

Use of the Argyrophilic Nucleolar Region Method for Cytologic and Histologic Examination of the Lymph Nodes in Dogs.

Vet Pathol, 41, 338-345.

VAN BOCKSTAELE,D.R.; LAN,J.; SNOECK,H.W.; KORTHOUT,M.; DE BOCK,R.F.; PEETERMANS,M.E. (1991):

Aberrant Ki-67 expression in normal bone marrow revealed by multiparameter flow cytometric analysis.

Cytometry, 12, 50-63.

VAN HEERDE,P.; GO,D.M.D.S.; KOOLMAN- SCHELLENKENS,M.A. (1984):

Cytodiagnosis of Non- Hodgkin's lymphoma.

Virchows Arch (Pathol Anat), 403, 213-233.

VENERONI,S.; COSTA,A.; MOTTA,R.; GIARDINI,R.; RILKE,F.; SILVESTRINI,R. (1988):

Comparative analysis of Thymidine labelling index and monoclonal antibody Ki 67 in Non- Hodgkin's Lymphomas.

Hematol Oncol, 6, 21-28.

WEBSTER,J.D.; YUZBASIYAN-GURKAN,V.; MILLER,R.A.; KANEENE,J.B.;  
KIUPEL,M. (2007):

Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: Associations with c-KIT  
and its role in prognostication.

Vet Pathol, 44, 298-308.

WEBSTER,J.D.; YUZBASIYAN-GURKAN,V.; THAMM,D.H.; HAMILTON,E.;  
KIUPEL,M. (2008):

Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine  
and prednisolone.

BMC Vet Res, 13, 4-32.

WEISS,L.M.; STRICKLER,J.G. (1987):

Proliferative rates of Non- Hodgkin`s lymphomas as assessed by Ki 67 antibody.

Hum Pathol, 18, 1155-1159.

WRIGHT,N.A. (1984):

Cell proliferation in health and disease: Recent advances in histopathology.

In: Anthony, P. P. and MacSween, R. N. M.: Recent advantages in Histopathology,  
Edinburgh: Churchill, Livingstone, 17-33.

XIUYUN,G. (1995):

Quantitative study of AgNOR in differential diagnosis between non-Hodgkin's  
lymphoma and reactive hyperplasia.

Chin Med J (Engl), 108, 132-137.

XU,L.Z.; WANG,L.F. (1992):

Nucleolar organizer regions in aspirates of malignant lymphomas and benign  
disorders of the lymph nodes.

Anal Quant Cytol Histol, 14, 148-152.

ZAITOUN AM; EBBS SR (2000):

Quantitative cytological assessment of Ki 67 and AgNORs using computer-  
digitalized image analysis of four clinicopathological breast lesions.

Cytopathology, 11, 243-254.

ZÖLLER,J.; FLENTJE,M.; SINN,P. (1993):

Nucleolar organizer region und Ki 67 als zellkinetische Parameter für orale  
Dysplasien und Plattenepithelkarzinome.

Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir, 17, 185-190.

## 9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. A. Moritz und Frau Dr. N. Bauer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Hilfestellung bei der Dissertation. Frau Dr. N. Bauer möchte ich im Besonderen für die Einführung in dieses Thema, für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten und für die vielen hilfreichen Anmerkungen zur Anfertigung dieser Dissertation danken.

Herrn Prof. Dr. R. Neiger und Herrn Prof. Dr. E.-G. Grünbaum danke ich für ihre Unterstützung und die Möglichkeit der Probenentnahme aus Ihrem Patientengut der Kleintierklinik.

Des Weiteren möchte ich mich für die Zusendung von Lymphomproben der Tierklinik Hofheim und hier insbesondere bei Herrn Dr. M. Kessler für die gute Kooperation bedanken.

Einen ganz besonderen Dank inbezug auf den praktischen Teil geht an Frau Hahn-Kolberger, Klinik Humanpathologie und Frau Artelt, Klinik für Veterinärpathologie.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei E. Jüngst- Carter bedanken, die mich in die Laborarbeit eingeführt hat und mir bei sämtlichen Tücken geholfen hat.

Ein weiteres Dankeschön geht an die Firma Leika und hier sind insbesondere Herr S. Stolz und Herr Frank zu nennen, die mir das Makro nach allen Möglichkeiten der Kunst auf meine Dissertation zugeschnitten haben.

C. Kuhl und Fam. W. Schröder möchte ich ganz besonders für die Unterstützung und Hilfe insbesondere bei den computertechnischen Tücken dieser Arbeit danken.

Schließlich gilt mein Dank der Forschungsförderung für Nachwuchswissenschaftler der Justus- Liebig- Universität Gießen für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

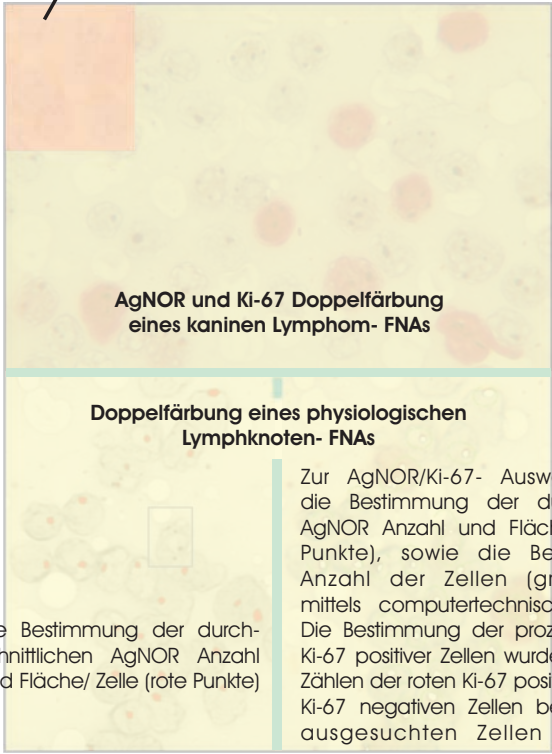
## Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Daniela Zervos, 2011



Die erste Doppelfärbung eines kaninen Lymphom- FNAs



Die Bestimmung der durchschnittlichen AgNOR Anzahl und Fläche/ Zelle (rote Punkte)

Zur AgNOR/Ki-67- Auswertung erfolgte die Bestimmung der durchschnittlichen AgNOR Anzahl und Fläche/ Zelle (weiße Punkte), sowie die Bestimmung der Anzahl der Zellen (grün umrandet) mittels computertechnischer Bildanalyse. Die Bestimmung der prozentualen Anzahl Ki-67 positiver Zellen wurde manuell durch Zählen der roten Ki-67 positiven und blauen Ki-67 negativen Zellen bei 100 willkürlich ausgesuchten Zellen durchgeführt.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5786-2



9 17 8 3 8 3 5 1 9 5 7 8 6 2 1