

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material

3.1.1. Untersuchtes Gewebe

Zur Untersuchung gelangen Operationspräparate aus Totalmastektomien von Hündinnen, die in verschiedenen Tierarztpraxen innerhalb Berlins mit klinisch palpierbaren Knoten in der Gesäugeleiste vorgestellt und operiert wurden, sowie veränderte Mammaleisten von Tieren, die in das Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin zur Sektion gelangen. In dem Zeitraum von Oktober bis Dezember 1999 konnten 18 geeignete Mammaleisten gesammelt werden. Dabei konnten bei drei Hündinnen beide Leisten und von zwölf Tieren jeweils eine Milchleiste zur weiteren Untersuchung verwendet werden. Als Kontrollgruppe dient Gewebe von Hündinnen, die in dem oben genannten Zeitraum zur Sektion in das Institut für Tierpathologie gelangen und bei denen keine Gesäugeveränderungen palpiert werden können. Es werden nur Tiere beachtet, die mindestens das fünfte Lebensjahr erreicht haben. Es konnten insgesamt elf Kontrollleisten in die Studie aufgenommen werden, wobei von fünf Tieren beide Milchleisten genommen wurden und von einer Hündin eine Gesäugeleiste weitere Verwendung fand.

3.1.2. Nationale

Bei der Untersuchungs- und Kontrollgruppe werden Tiere ungeachtet ihrer Rasse und möglichst verschiedenen Alters in die Studie einbezogen. Soweit es möglich ist, werden für die Gewebeproben aus der tierärztlichen Praxis die Daten zu Alters-, Rasse- und Geschlechtsverteilung anhand der Patientenunterlagen erhoben.

Die Angaben zum Nationale der in das Institut für Tierpathologie eingesendeten Hündinnen werden den den Tieren beiliegenden Vorberichten entnommen.

3.2. Verlauf

In ungefähr halbjährlichen Abständen werden die Hündinnen, welche in der tierärztlichen Praxis operiert wurden, untersucht, bzw. der Zustand der Tiere telefonisch erfragt. Dabei wird besonders auf das Vorhandensein von weiteren Mammatumoren, Rezidiven und Metastasen geachtet. Der Krankheitsverlauf beim einzelnen Tier wird soweit es möglich ist, vom Tag der ersten Mastektomie bis zum letzten Kontakt mit dem Besitzer, bzw. der tierärztlichen Praxis dokumentiert.

Stirbt die Hündin, so wird versucht, die Ursache für das Ableben des Tieres herauszufinden. Die Überlebenszeit wird ab dem Zeitpunkt der Mastektomie berechnet.

3.3. Gewebeaufbereitung nach der Wholemount - Technik

3.3.1. Vorbereitungen und Präparation

In dieser Arbeit werden die Mammakomplexe wie folgt benannt:

T1: thorakal cranialer, T2: thorakal caudaler, A1: abdominal cranialer, A2: abdominal caudaler, I: inguinaler Mammakomplex.

Bei Tieren mit nur vier Zitzen bezeichnet T den cranialsten Komplex und A1, A2 und I die caudal folgenden.

Es werden auch Knoten einem bestimmten Komplex zugeordnet, die caudal von diesem Drüsengewebe liegen, und zwar bis einschließlich der Hälfte der Strecke zum nächstfolgenden Komplex.

Die Mammaleisten werden exzidiert und das Muskelgewebe sorgfältig abpräpariert. Die rechten und linken Gesäugeleisten werden durch Schnittführung in der Linea alba ganz mit anhaftendem Fell herausgeschnitten. Bei Gesäugeleisten, in denen deutliche Knoten vorhanden sind, werden diese herauspräpariert, formalinfixiert und anschließend mittels Hämatoxylin - Eosin - Färbung histologisch klassifiziert.

Veränderungen, die sich aufgrund ihrer Härte nicht mit Hilfe eines Skalpells zerteilen lassen, werden vor der weiteren Bearbeitung für die Paraffineinbettung gemäß Romeis (1968a) entkalkt.

3.3.2. Aufbereitung und Durchführung des Färbevorganges

Es erfolgt das Aufspannen des präparierten Gewebes mit rostfreien Nadeln auf Paraffinplatten. Die Drüsengewebe Seite zeigt nach oben. Die Mammaleisten werden je nach Größe 2 - 4 Tage, in der Regel 3 Tage, in einer Alkohol - Formalin - Lösung nach Tellyesniczky (1898), (Romeis 1968b) fixiert.

Nach der Fixierung wird das Milchdrüsengewebe mit anhaftenden Zitzen von der Oberhaut stumpf abpräpariert und das Mammagewebe wieder auf den Paraffinplatten aufgespannt, um noch weitere 24 Stunden nachzufixieren.

Bei Bedarf können die Leisten bis zur weiteren Bearbeitung in 70%-igem Ethanol aufbewahrt werden.

Nach Abspannen des Mammagewebes erfolgt das Entfetten der Leiste in Aceton mindestens über einen 12 - stündigen Zeitraum. Je nach Fettgehalt der Leiste kann der Zeitraum bis zu 5 Tage ausgedehnt werden, dabei wird jeden Tag die Acetonlösung gewechselt.

Die anschließende Spülung des Gewebes wird für 2 Stunden mit Isopropanol und danach für 2 Stunden mit 96%-igem Ethanol durchgeführt.

Nach diesem Schritt ist eine Zwischenlagerung in 70% -igem Ethanol möglich.

Nach der Spülung kann die Färbung in Eisenhämatoxylin durchgeführt werden.

Je nach Dicke des Drüsengewebes nimmt das eine Zeit zwischen 3 Stunden und 4 Tagen in Anspruch.

Darauf wird die Leiste 5 Minuten in VE - Wasser gespült und anschließend 10 -15 Minuten in Leitungswasser gebläut.

Anschließend erfolgt die Differenzierung in 1%-iger Salzsäure - Ethanol – Lösung, bis der Untergrund entfärbt ist und das Milchdrüsengewebe deutlich hervortritt.

Der Vorgang des Spülens in VE - Wasser und Leitungswasser wird wie oben beschrieben wiederholt.

Das gefärbte Mammagewebe wird nun in 70% -igem Ethanol in Glasbehältern aufbewahrt.

3.3.3. Lösungen

- **Formalin nach Tellyesniczky (1898), (Romeis 1968b)**

50 ml Formaldehydlösung 37%ig

50 ml Eisessig p.A.

900 ml Ethanol 70%ig

Vor Gebrauch mischen.

Haltbarkeit: vor Gebrauch ansetzen.

- **Eisenhämatoxylinlösung (Romeis 1968b)**

Hämatoxylin - Stammlösung:

10 g Hämatoxylin

100 ml Ethanol 96%ig

Reifung bei 37°C für 48 h.

Während des Reifens und bei Gebrauch im Dunkeln aufbewahren.

Haltbarkeit: 3 Monat

Gebrauchslösung:

20 ml Hämatoxylin – Stammlösung

1810 ml Ethanol 96%ig

1,6 g Eisen - (III) – Chlorid – Hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in

120 ml Aqua dem.

290 ml 1 N HCL

Haltbarkeit: 3 Monate

Lösungen getrennt aufbewahren, vor Gebrauch mischen, mit NaOH auf PH 1,25 einstellen.

Farblösung ist brauchbar, wenn einige Tropfen im fließenden Wasser eine blau - violette Färbung zeigen.

3.4. Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Knoten und Punkte wird die jeweilige Gesäugeleiste auf einen Durchleuchter gelegt und bei 1 Volt/Ampere Lichtstärke betrachtet. Dies ermöglicht es, Verdichtungen in der Gesäugeleiste zu erkennen. Dabei werden in der Gesäugeleiste palpierbare Verdichtungen als Knoten, nicht tastbare, aber mit dem Durchleuchter sichtbare Zellansammlungen als Punkte bezeichnet. Zur Dokumentation wird von jeder einzelnen gefärbten Gesäugeleiste mit Hilfe einer Olympus Spiegelreflexkamera mit Belichtungsautomatik mit der Belichtungszeit von 1ms ein Diapositiv erstellt (Beispiel s. Abbildung 1, S.14).

3.5. Anfertigung von histologischen Schnittpräparaten

Von jeder im Wholemout - Präparat sichtbaren Veränderung, die einen Durchmesser von ca. 0,5 cm und größer hat, wird ein histologischer Schnitt angefertigt. Dabei wird die präparierte und gefärbte Leiste auf den Durchleuchter gelegt und dadurch die genaue Schnittstelle durch die jeweiligen Punkte bzw. Knoten ermittelt. Ferner wird von jeder Mammaleiste an festgelegten Lokalisationen in repräsentativen Stufen Material zur Herstellung von Schnittpräparaten genommen.

Die Stufen sind wie folgt festgelegt:

- Jeweils 1 cm vor jeder Zitze.
- Ein Querschnitt durch jede Zitze.
- Jeweils 1 cm hinter jeder Zitze.

Sollte sich ein Punkt oder Knoten innerhalb der gewählten Stufe befinden, erfolgt an dieser Stelle nur die histologische Schnitthanfertigung von dem Knoten bzw. Punkt. Von allen Gewebeproben wird mittels eines Rotationsmikrotoms (Mikrom HM 325) zunächst je ein Schnitt von 2 - 3 µm Dicke angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen und anschließend routinemäßig gemäß den Anweisungen nach BÖCK (1989) H.E. gefärbt.

3.6. Beschreibung der einzelnen Kategorien

Die Auswertung der histologischen, H.E. gefärbten Schnitte erfolgt mittels eines Mikroskops. Das histologische Bild des Alveolargewebes wird in vorher definierte Kategorien eingeteilt, und die Tumore gemäß der WHO klassifiziert.

Dabei wird jeder Schnitt nach folgenden Gesichtspunkten beurteilt:

- Gesamtbild des Mammagewebe
- Alveolarstruktur, d.h. ist die Aufteilung des Gesäugegewebes in Läppchen und Bäumchen gegeben, bzw. sind die einzelnen Alveolen erkennbar
- Auskleidung der Alveolen, ein- oder mehrreihig
- Kernbild: Gesamteindruck, Größe, Aktivität
- Umgebungsgewebe, Entzündungsreaktionen

Die Einordnung jedes Schnittes erfolgt in eine von acht möglichen Kategorien, die anhand der oben genannten Kriterien erstellt wurde. Die einzelnen Kategorien sind folgenden Kriterien unterworfen:

- Kategorie 1:** > „Hyperplasie“ des Gewebes, d.h. es sind einheitlich vergrößerte, ansonsten unauffällige Alveolen vorhanden.
 > Läppchen-, Bäumchen- und Alveolarstruktur ist gegeben.
 > Kerne aktiv, eventuell ist eine doppelte Alveolarauskleidung vorhanden.
 > Entzündung = ja / nein
- Kategorie 2:** > Läppchenstruktur ist vorhanden, doch die Alveolen sind nicht eindeutig bäumchenartig verzweigt (mehr als 50%).
 > Kerne sind different in Größe und Helligkeit, zeigen jedoch größtenteils (über 50%) ein einheitliches Bild.
 > Entzündung = ja / nein
- Kategorie 3:** > Kaum Läppchen- und Bäumchenstruktur zu erkennen (unter 25%).
 > Alveolarstruktur ist gegeben (mehr als 50%).
 > Kerne zeigen Aktivität, dabei sind eine doppelte Alveolarauskleidung, große helle Kerne oder zahlreiche, kleine, dunkle Kerne erkennbar. Das Gesamtbild der Kerne ist uneinheitlich (bis zu 50%).
 > Entzündung = ja / nein
- Kategorie 4:** > Keine Läppchen- und Bäumchenstruktur, die Alveolarstruktur ist kaum sichtbar. Über 50% der Zellen liegen ohne erkennbare Alveolarzugehörigkeit im Gewebe.
 > Kerne sind zum größten Teil (über 50%) uneinheitlich in Größe, Form und Helligkeit.
 > Entzündung = ja / nein (Beispiel s. Abbildung 2, S.14)
- Kategorie 5:** > Stromaproliferation, es ist hyalines Stroma erkennbar.
 > Kerne sind aktiv, teilweise abgerundet und lösen sich von der Basalmembran.
 > Entzündung = ja / nein Beispiel s. Abbildung 3, S.15)

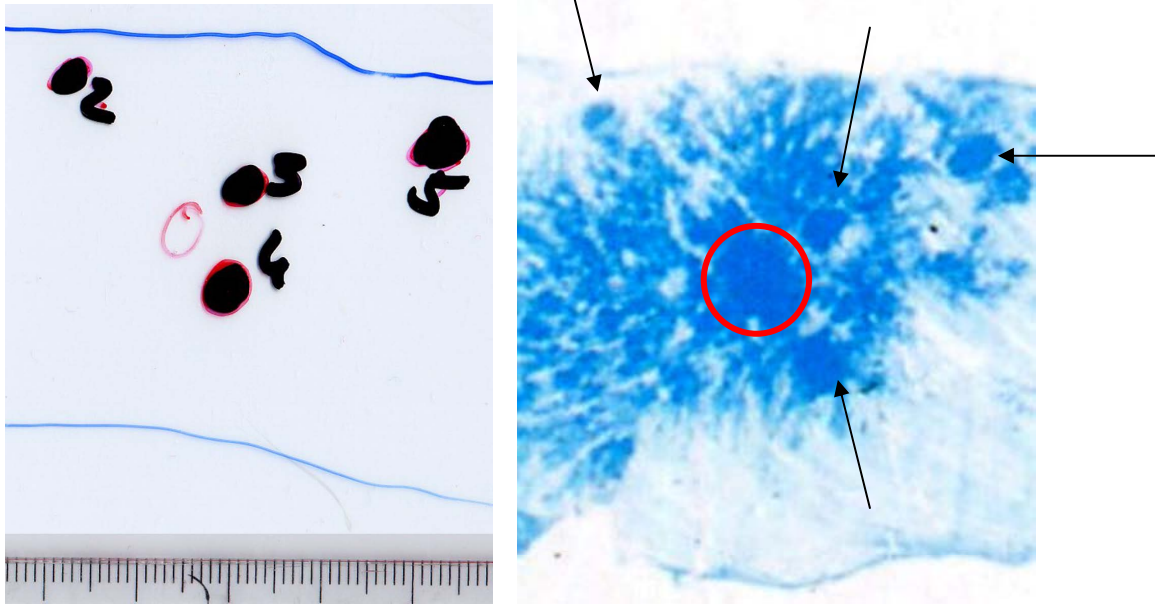


Abbildung 1: Kontrollleiste 1 – links Ausschnitt aus der gezeichneten Folie, rechts dazu das Dia des Mammagewebes auf dem Durchleuchter mit den entsprechenden Punkten (Pfeile). Der rote Kreis entspricht der Zitze

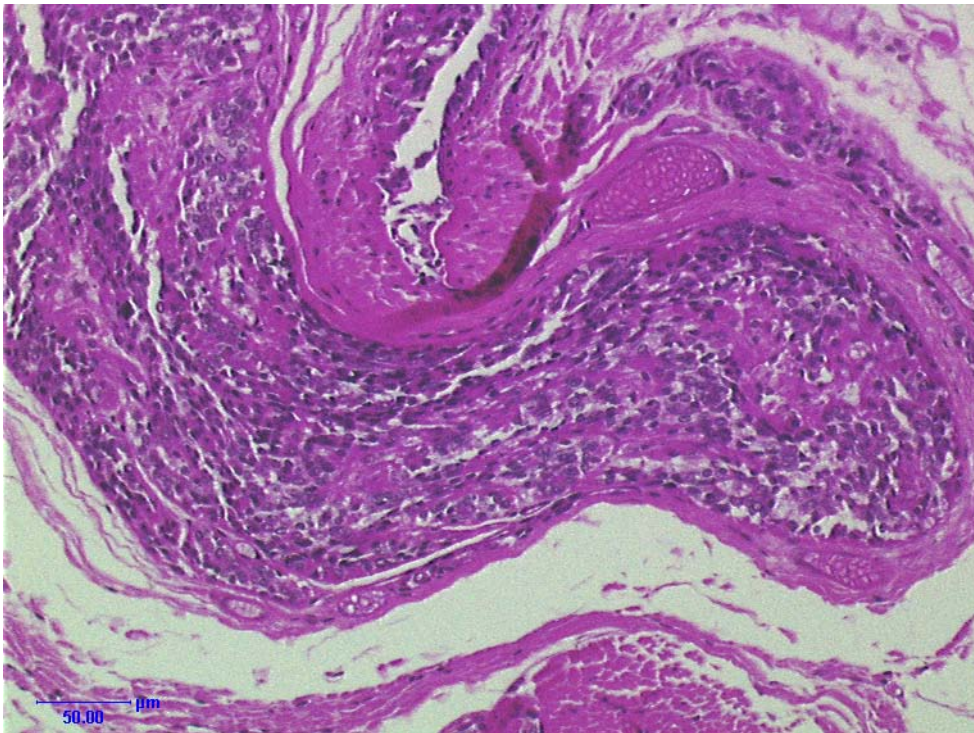


Abbildung 2: Histologische Beurteilung der veränderten Punkte nach Kategorien - Kategorie 4 - Kontrolltier 2, Komplex A2, Schnitt 11, Punkt 9

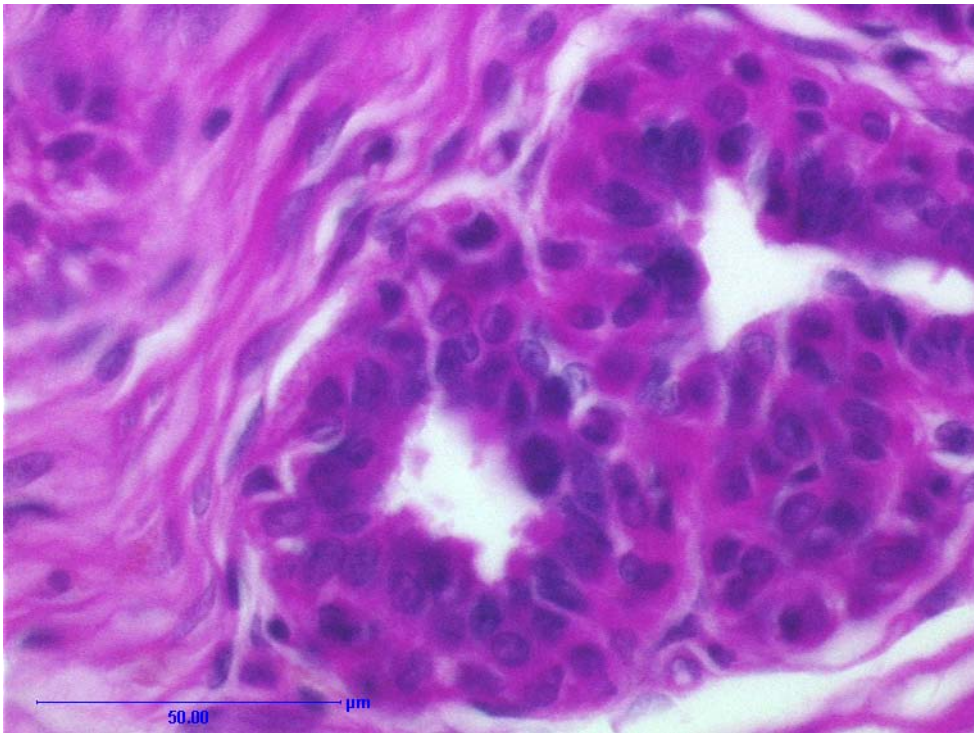


Abbildung 3: Histologische Beurteilung der veränderten Punkte nach Kategorien - Kategorie 5 - Tumortier F, Komplex T1, Schnitt 3

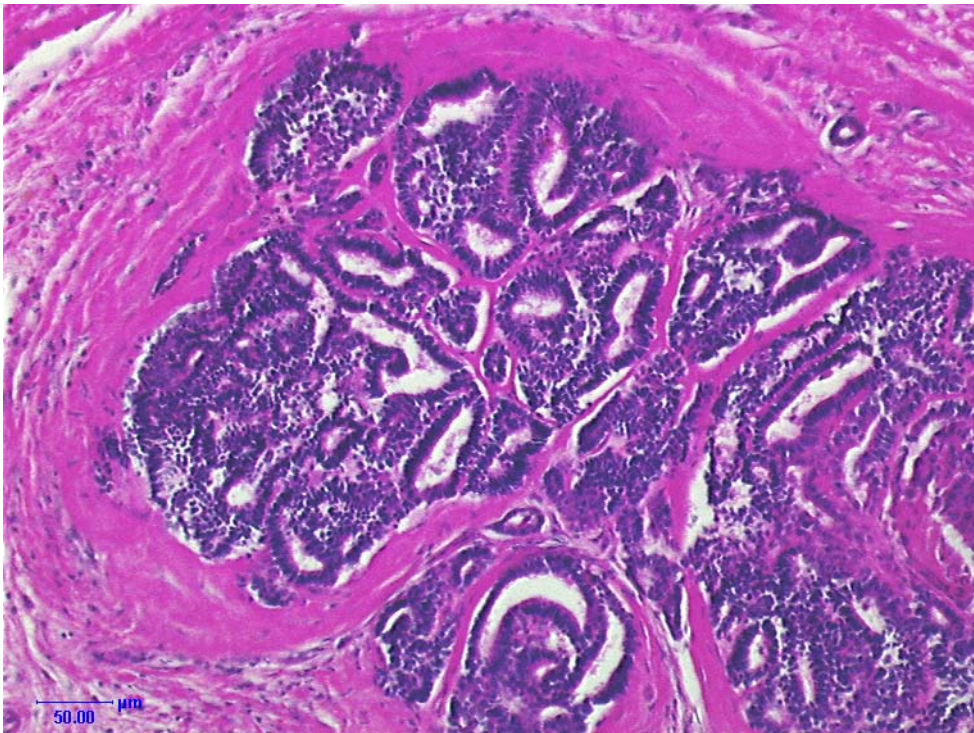


Abbildung 4: Histologische Beurteilung der veränderten Punkte nach Kategorien - Kategorie 6 - Tumortier E, Komplex A2, Schnitt 11

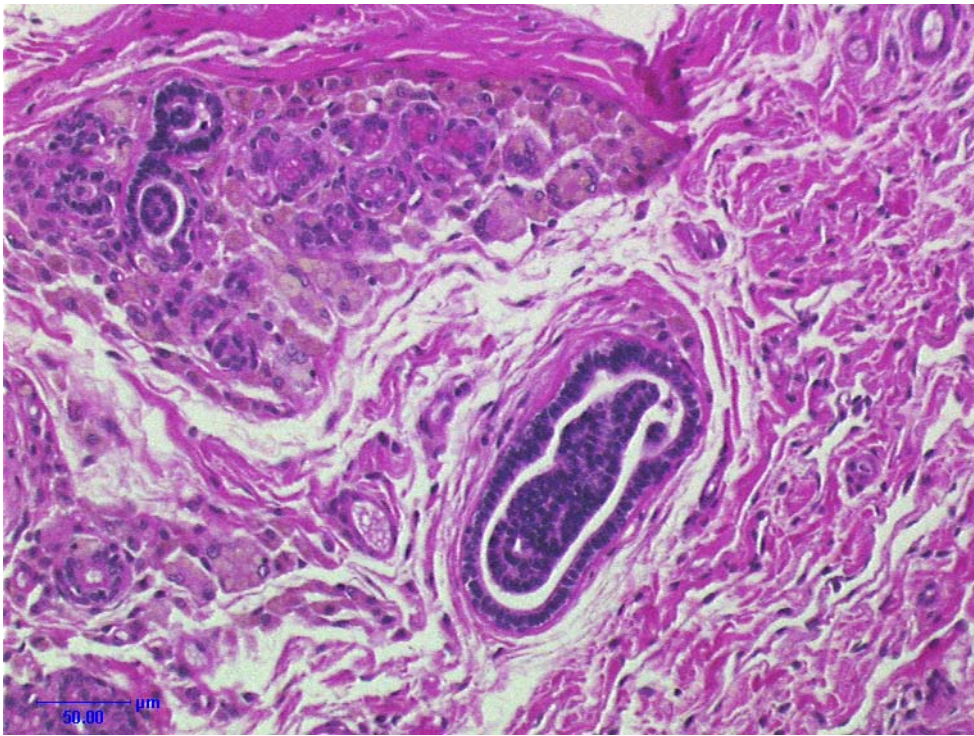


Abbildung 5: Histologische Beurteilung der veränderten Punkte nach Kategorien - Kategorie 7 - Tumortier D, Komplex T2, Schnitt 2

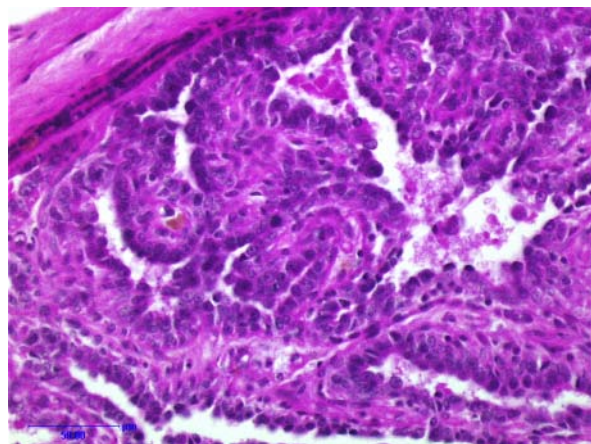
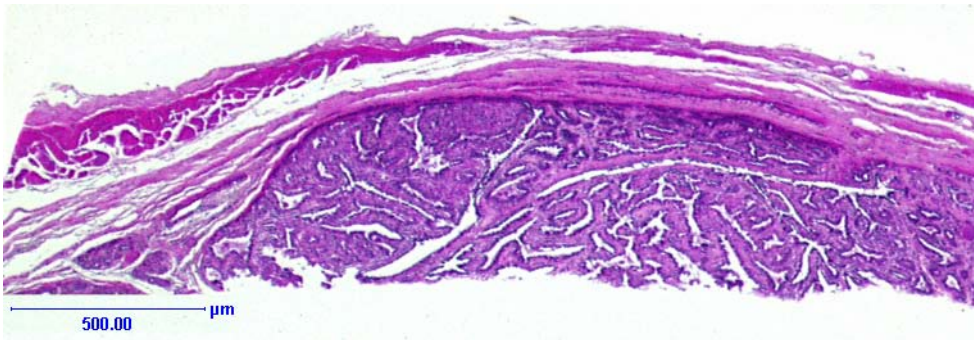


Abbildung 6: Histologische Beurteilung der veränderten Punkte nach Kategorien - Adenokarzinom - Kontrolleiste 1, rechte Leiste, Komplex A1, Schnitt 6 Punkt 3; oben: Übersicht, unten Detailansicht

- Kategorie 6:** > Auftreten einer Kapsel um eng zusammengedrückte Alveolen, die kein eigenes, zusätzliches Stroma besitzen.
> Entzündung = ja / nein (Beispiel s. Abbildung 4, S.15)
- Kategorie 7:** > Alveolen besitzen ein basaliomartiges Aussehen.
> Entzündung = ja / nein (Beispiel s. Abbildung 5, S.16)
- Kategorie 8:** > Alveolen sind größtenteils durch eine massive Entzündung, Nekrose oder ähnliches zerstört.
- Kategorie X:** > In diesem Fall handelt es sich nicht um angeschnittenes Alveolargewebe, sondern um Muskulatur, Blutgefäße oder ähnliches.