

Aus dem Institut für Veterinärpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON
TUMORMETASTASEN FELINER MAMMAKARZINOME
IN DEN REGIONÄREN LYMPHKNOTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Jana Epping
Tierärztin aus Greven/Westf.

Berlin 1999
Journal-Nr.

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. K. Hartung
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. R. Rudolph
Zweiter Gutachter:	

Tag der Promotion:

1. EINLEITUNG **1**

2. LITERATURÜBERSICHT **2**

2.1.	Feline Mammatumoren.....	2
2.1.1.	Vorkommen.....	2
2.1.2.	Beeinflussende Faktoren	3
2.1.3.	Biologisches Verhalten.....	3
2.1.4.	Klassifikation.....	4
2.1.5.	Metastasierungslokalisation und Häufigkeit.....	4
2.1.6.	Bedeutung des Metastasierungsverhaltens für Therapie und Prognose	5
2.2.	Die Milchdrüse der Katze und ihre lymphatische Entsorgung....	6
2.3.	Definition und Diagnostik von Metastasen in der Humanmedizin.....	7
2.3.1.	Prognostische Bedeutung von Metastasen.....	8
2.4.	Intermediärfilamente.....	8
2.4.1.	Zytokeratine.....	8
2.4.1.1.	Zytokeratine in neoplastisch verändertem Gewebe	9
2.4.1.2.	Zytokeratine bei der Katze.....	9
2.4.1.3.	Zytokeratin - Antikörper	10
2.4.1.4.	Einfluß der Gewebsfixation und der Vorbehandlung der Gewebe auf die Zytokeratinantigene.....	10
2.5.	Immunhistochemische Färbeverfahren.....	10

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN **13**

3.1.	MATERIAL	13
3.1.1.	Patientengut	13
3.1.2.	Geräte und Materialien.....	14
3.1.2.1.	Antikörper.....	14
3.1.2.2.	Technische Geräte und Reagenzien.....	15
3.2.	METHODE.....	16
3.2.1.	Schnittanfertigung.....	16
3.2.1.1.	Vorversuch.....	16
3.2.1.2.	Hauptversuch.....	16
3.2.2.	Histologische Aufarbeitung.....	16
3.2.2.1.	Lymphknoten.....	16
3.2.2.2.	Mammakarzinom.....	16
3.2.3.	Immunhistochemische Aufarbeitung	17
3.2.3.1.	Vorversuche.....	17
3.2.3.1.1.	Herstellungsverfahren der benötigten Materialien und Reagenzien.....	17

3.2.3.1.2.	Austestung der Vorverdauungsmethoden.....	19
3.2.3.1.3.	Färbeanleitung der APAAP Methode.....	19
3.2.3.2.	Hauptversuche.....	19
3.2.3.2.1.	Immunhistochemische Färbeanleitung BSA System	19
3.2.3.3.	Kontrollen.....	20
3.2.3.3.1.	Positivkontrolle.....	20
3.2.3.3.2.	Negativkontrolle.....	21
3.2.4.	Auswertungskriterien bei der Befundung immunhistochemisch gefärbter Lymphknoten	21
3.2.5.	Kriterien zur Bewertung des Differenzierungsgrades der Metastasen im Vergleich zum Primärtumor.....	22
3.2.6.	Kriterien zur Bewertung des Methodenvergleichs zwischen HE- und Immunfärbung.....	22
3.3.	ERGEBNISSE.....	24
3.3.1.	Nationale.....	24
3.3.1.1.	Geschlechtsverteilung.....	24
3.3.1.2.	Altersverteilung.....	24
3.3.1.3.	Rassenverteilung.....	24
3.3.2.	Histologische Befunde an der Mamma.....	24
3.3.2.1.	Histologische Diagnosen S-Fälle	24
3.3.2.2.	Histologische Diagnosen E-Fälle	
3.3.2.3.	Klassifikation.....	29
3.3.2.4.	Metastasierungsverhalten der Karzinomtypen	29
3.3.2.5.	Morphologie der Primärtumore.....	30
3.3.3.	Lymphknoten.....	31
3.3.3.1.	Zusammenfassung der Einzelbefunde der Lymphknoten S- Fälle.....	31
3.3.3.2.	Zusammenfassung der Einzelbefunde der Lymphknoten E- Fälle.....	31
3.3.4.	Immunhistochemische Befunde an Mamma und Lymphknoten/Lymphgewebe	32
3.3.4.1.	Ergebnisse der Vorversuche.....	32
3.3.4.2.	Immunhistochemische Befunde der Kontrollen.....	32
3.3.4.3.	Immunhistochemische Lymphknotenbefunde der Hauptversuche.....	33
3.3.4.3.1.	Auswertung der Fälle und Entdeckung von Lymphgewebe	33
3.3.4.3.2.	Metastasen/Emboli Lymphknoten Schnittebenen.....	33
3.3.4.3.3.	Metastasen/Emboli Lymphknoten.....	34
3.3.4.3.4.	Metastasengröße.....	34
3.3.4.3.5.	Lokalisation der Metastasen.....	35
3.3.4.3.6.	Differenzierungsgrad der Metastasen.....	35
3.3.4.3.7.	Regressionsneigung der Metastasen	35

3.3.5.	Vergleich der immunhistochemischen Methode mit der H.E. Färbung bei der Entdeckung von Metastasen und Tumorzellemboli.....	35
3.3.6.	Sektionsergebnisse.....	36
4.	DISKUSSION	37
5.	ZUSAMMENFASSUNG	43
6.	SUMMARY	46
7.	ANHANG	48
I.	Zusammenfassung der Einzelbefunde der Lymphknoten und Primärtumore.....	48
II.	Bildteil	56
III.	Abkürzungsverzeichnis.....	59
8.	LITERATURVERZEICHNIS	61

1. EINLEITUNG

Auf dem Gebiet der Mammatumoren lag der Forschungsschwerpunkt in der Veterinärmedizin bis vor einiger Zeit bei der Untersuchung des biologischen Verhaltens caniner Neoplasien (Busch, 1993; Gutberlet, 1994; Walter, 1999). Seit einigen Jahren rücken jedoch auch die Mammatumoren der Katze immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses (Itoh et al., 1996; Hahn und Adams, 1997; Kessler und von Bomhard, 1997; Simon und Nolte, 1997; Vollmerhaus et. al., 1997; Muleya et. al., 1998).

Obwohl die Inzidenzrate feliner Mammatumoren im Vergleich zum Hund etwa 10 Mal geringer ist, stellt sie als dritthäufigste Neoplasieform doch einen nicht unerheblichen Anteil am Krankheitsgeschehen der Katze dar (Misdorp und Weijer, 1980).

Daher ist es wichtig, eingehendere Untersuchungen auf diesem Gebiet anzustellen, um die bisherigen Kenntnisse zu erweitern und zu vervollständigen und eventuell genauere Aussagen über Ursachen, Krankheitsverlauf und Prognose machen zu können.

Dabei ist es zum einen interessant festzustellen, inwieweit die Untersuchungen und Ergebnisse, die bisher beim Hund durchgeführt wurden, sich auf die Katze übertragen lassen.

Zum anderen stellt die Katze ein interessantes Modell zur Erforschung von Therapieformen in der Humanmedizin dar, da sich die Tumoren in ihrer Wuchsform und dem Wachstumsverhalten sehr ähneln (Hayden und Nielsen, 1971; Weijer, 1979; Misdorp und Weijer, 1980)

Ziel dieser Arbeit ist ein Beitrag zur Erforschung des biologischen Verhaltens feliner Mammatumoren, indem zunächst die Tumoren klassifiziert werden und anschließend die regionären Lymphknoten auf das Vorhandensein von Metastasen untersucht werden, sowie bei positivem Ergebnis deren Wuchsform bestimmt und eine Beziehung zum Primärtumor hergestellt wird.

Um die Fehlerquote beim Auffinden der Metastasen möglichst gering zu halten, soll, wie bereits an Mammatumoren von Mensch und Hund etabliert, eine immunhistochemische Färbemethode gefunden werden, die Tumorzellen im Primärtumor, als auch im Lymphknotengewebe sicher anfärbt und diese auf ihre Wichtigkeit bezüglich der Routinediagnostik hin geprüft werden.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Feline Mammatumoren

2.1.1. Vorkommen

Mammatumoren bilden nach den Hauttumoren und den Lymphosarkomen die dritthäufigste Neoplasieform der Katze (Misdorp und Weijer, 1980; Couto, 1989; Deligant et al., 1995).

Ihr Vorkommen beträgt 12% aller malignen Tumore, sowie 17% aller Neoplasien bei weiblichen Katzen. Die Inzidenzrate feliner Mammatumoren beträgt bei einer großangelegten 3-jährigen Studie in Alameda County 12,8 pro 100.000 Katzen, bei den weiblichen Katzen sind es 25,4 pro 100.000 (Dorn et al., 1968).

Eine Rassendisposition für Siamkatzen kann seit einer Studie von Kessler und von Bomhard (1997) als erwiesen angesehen werden. Sie untersuchten 2386 Fälle von Mammatumoren über einen Zeitraum von 6 Jahren und verglichen die Ergebnisse mit einer Referenzpopulation von 29270 Katzen. Dabei stellte sich heraus, daß Siamkatzen ausschließlich maligne Tumore zeigten, hingegen der Anteil maligner Tumore bei den europäischen Hauskatzen 92% und bei den Perserkatzen 83,3% betrug. Auch beim Vorhandensein von Lymphangiosis carcinomatosa liegt die Siamkatze mit 35,4% vor der europäischen Hauskatze mit 24,8% und der Perserkatze mit 17,3% an der Spitze. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits beschriebene Rassedisposition der Siamkatze von Hayes et al. (1981). Das gleichzeitig von Hayes et al. (1981) beschriebene frühere Auftreten von Mammatumoren bei dieser Rasse konnte von Kessler und von Bomhard (1997) nicht bestätigt werden, die keine signifikanten Unterschiede im Durchschnittsalter aller betroffenen Rassen feststellen konnten.

Das Durchschnittsalter, in dem Katzen am häufigsten an Mammatumoren erkranken, wird nahezu übereinstimmend mit 10 Jahren angegeben (Schmidt und Langham, 1967; Dorn et al., 1968; Weijer et al., 1972; Tomlinson et al., 1984; Hayes und Mooney, 1985; Frese et al., 1989; Kessler und von Bomhard, 1997). Das höchste Vorkommen lag in der Altersgruppe zwischen 10 und 14 Jahren (Hayden und Nielsen, 1971).

Allerdings ist die Zeitspanne, in der ein Auftreten dieser Neoplasien beobachtet wurde, mit 9 Monaten bis 19 Jahren sehr weit gefaßt (Weijer et al., 1972).

Bei der Verteilung der Tumoren auf die unterschiedlichen Mammarkomplexe sowie die beiden Gesäugeleisten bestehen verschiedene Meinungen.

Brodey (1969) findet, daß alle Gesäugekomplexe gleichermaßen betroffen seien, Hayden und Nielsen (1971) hingegen sehen im vorderen Gesäugepaar ein gehäuftes Auftreten. Bei Weijer et al. (1972) und Weijer und Hart (1983) waren der 1. und 2. abdominaler Komplex deutlich unterrepräsentiert.

Multiples Vorkommen liegt laut Hayes und Mooney (1985) bei Katzen bei 60%. Nach den Untersuchungen dieser Autoren sind 86 % der Mammatumoren maligne und 14% benigne. Auch hier sind Hayden und Nielsen (1971) aufgrund der Ergebnisse ihrer Studie anderer Meinung, da 68% der von ihnen untersuchten Tiere lediglich eine betreffende Drüse aufweisen. Weijer et al. (1972) untersuchten 142 Katzen und fanden bei 97 gleichfalls nur eine betroffene Drüse (68,3%).

Eine eindeutige Disposition besteht für weibliche Katzen (Schmidt und Langham, 1967; Stünzi, 1967; MacVean et al., 1978; Frese et al., 1989; Kessler und von Bomhard, 1997).

2.1.2. Beeinflussende Faktoren

Die Kastration wird von einigen Autoren als bedeutender Faktor zur Verringerung des Gesäugekrebsrisikos gesehen (Dorn et al., 1968; Misdorp et al., 1992). Dorn et al. (1968) stellen in der von ihnen untersuchten Population ein siebenmal höheres Risiko bei unkastrierten Katzen fest Mammatumoren zu entwickeln, als bei kastrierten Katzen. Misdorp et al. (1992) sehen eine Reduzierung des Risikos um 65% nach Kastration. Auch Kessler und von Bomhard (1997) bestätigen eine Prädisposition sexuell intakter weiblicher Tiere. Die Ursache für dieses Phänomen wurde noch nicht eindeutig geklärt, vermutlich spielen endogene Hormone, die im Ovar gebildet werden, eine Rolle. Das erhöhte Auftreten von Mammatumoren nach Gabe von Gestagenen zur Oestrusverhütung, das ebenfalls von Misdorp et al. (1992) beobachtet wurde, unterstützt die These, daß Hormone bei der Entstehung von Mammtumoren eine Rolle spielen. Sie entdeckten in ihrer Studie ein um 280% erhöhtes Risiko bei regelmäßiger Gabe von Gestagenen.

2.1.3. Biologisches Verhalten

Laut Gabbert (1984) ist die Invasion eines Tumors in das angrenzende Gewebe und dessen Gefäße der erste und entscheidende Schritt zur Metastasierung. Feline Mammatumoren wachsen häufig infiltrativ, sie enthalten oft ausgeprägte Nekrosen und sind von Lymphozyten und Plasmazellen infiltriert (Weijer et al., 1972). Sie wachsen in den meisten Fällen sehr schnell und metastasieren am häufigsten in die regionären Lymphknoten und die Lunge (Überreiter, 1968b; Hayden und Nielsen, 1971). Die Metastasierungsrate ist gemäß der Literaturmitteilungen jedoch großen Schwankungen unterworfen und reicht von 24 metastastasierten Fällen bei einer Gesamtzahl von 24 Fällen (100%) (Misdorp, 1964) bis zu einem metastasierten Fall bei einer Anzahl von 21 Fällen (Nielsen, 1952).

2.1.4. Klassifikation

Hampe und Misdorp (1974) haben für die Weltgesundheitsorganisation eine Klassifikation erarbeitet, die auch heute noch als grundlegend für die Einteilung der Mammatumoren der Katze gilt.

Darin werden die Karzinome wie folgt eingeteilt:

1. KARZINOME

A. Adenokarzinome

- tubulär
 - einfach
 - komplex
- papillär
 - einfach
 - komplex
- papillär-zystisch
 - einfach
 - komplex

B. solide Karzinome

- einfach
- komplex

C. Spindelzellkarzinome

- einfach
- komplex

D. Anaplastische Karzinome

E. Muzinöse Karzinome

F. Plattenepithelkarzinome

2. KARZINOSARKOME

Tubuläre und papilläre Adenokarzinome treten bei der Katze weitaus am häufigsten auf (> 90%), gefolgt von soliden Karzinomen (Cotchin, 1957; Überreiter, 1968a; Hayden und Nielsen, 1971; Weijer et al., 1972; Tomlinson et al., 1984; Kessler und von Bomhardt, 1997). Mischtumore, wie sie beim Hund häufiger auftreten, werden bei der Katze nicht (Hayden und Nielsen, 1971) oder nur sehr selten gesehen (Tomlinson et al., 1984).

2.1.5. Metastasierungslokalisierung und Häufigkeit

Feline Mammatumoren metastasieren am häufigsten in die Lunge und in die regionären Lymphknoten. Die Metastasierungsrate beträgt bei Hayden und Nielsen (1971) 31%, wobei die Lunge mit 35% den ersten, die regionären Lymphknoten mit 17,6% den zweiten Rang belegen. Gefolgt werden diese Lokalisationen von der Leber mit 11,7% und der Milz mit 5,8%.

Weijer et al. (1972) untersuchten 170 Katzen mit Mammatumoren, wobei 129 Obduktionsfälle und 41 Einzeleinsendungen vorlagen, bei letzteren konnte lediglich der Primärtumor untersucht werden.

Von den 129 obduzierten Katzen konnten in 120 Fällen Metastasen nachgewiesen werden. Das entspricht einer Metastasierungsrate von 93% und stimmt mit der Meinung von Kraft und Danckert (1997) überein, die eine Metastasierungsneigung feliner Mammatumoren von 80-90 % angeben.

Bei den von Metastasen bevorzugt betroffenen Organen teilen sich Lunge und Lymphknoten den ersten Platz, gefolgt von Pleura und Leber.

In einer Studie von Weijer und Hart (1983) wurde eine Metastasierungshäufigkeit von 65% angegeben, wobei die Lymphknoten hier zu 27% betroffen waren.

Geppert et al. (1984) untersuchten in einer humanmedizinischen Studie 231 Fälle von Mammakarzinomen bei der Frau und stellten fest, daß die Größe des Primärtumors einen hochsignifikanten Einfluß auf die Lymphknotenmetastasierung hat. Bei Tumoren über 2 cm waren bei 75 % der Patientinnen die Lymphknoten befallen, gegenüber 27 % bei den Tumoren unter 2cm Größe.

Die Zahl der Lymphknoten bei der Frau ist im Gegensatz zu Hund und Katze im Axillarbereich sehr hoch. Meist sind mehrere Lymphknoten von der Metastasierung betroffen.

Waren mehr als 3 Lymphknoten befallen, wurden signifikant häufiger über 12 Lymphknoten nachgewiesen, als bei Fällen mit weniger als 3 befallenen Lymphknoten und solchen ohne Metastasen.

Außerdem beobachteten Geppert et al. (1984) in ihrer Studie, daß sehr kleine Lymphknoten und solche mit fortgeschrittener Fettgewebsatrophie signifikant häufiger bei metastasenfremen Fällen nachgewiesen wurden und diese auch seltener als größere Lymphknoten von Karzinomen befallen waren.

2.1.6. Bedeutung des Metastasierungsverhaltens für Therapie und Prognose

Lymphknotenmetastasen gehören zu den ersten Anzeichen der Generalisation einer Geschwulstkrankheit (Grundmann, 1984).

Das Vorhandensein von tumor-positiven Lymphknoten stellt eine deutliche Verschlechterung der Prognose in Bezug auf die Überlebensrate von erkrankten Katzen dar (Weijer und Hart, 1983).

Dagegen besteht für Katzen, die nach Entdeckung der Krankheit einer radikalen Mastektomie unterzogen wurden, d.h. Entfernung aller 4 Einzelkomplexe einer Leiste plus inguinaler Lymphknoten unabhängig von der Lokalisation des Tumors innerhalb dieser Leiste, laut MacEwen et al. (1984) eine deutlich niedrigere Rückfallrate.

Aufgrund des raschen, infiltrativen Wachstums und der häufig auftretenden Penetration der Lymphgefäße empfehlen Weijer et al. (1972) eine Radikalexstirpation aller Komplexe einer Mammaleiste als Operationsmethode der Wahl.

Vollmerhaus et al. (1997) empfehlen, bedingt durch die individuellen Unterschiede im Lymphabfluß der einzelnen Komplexe bei einer Mastektomie, die Entfernung aller Lymphknoten, die am Rande der Milchdrüse liegen, d.h. nicht nur des Inguinallymphknotens, wie von MacEwen et al. (1984) gefordert wird.

Da jedoch den Lymphknoten auch eine bedeutende Funktion in der Filterung und Beseitigung von Tumorzellen zukommt, führt Straw (1997) an seinem Institut keine prophylaktische Entfernung von Lymphknoten mehr durch, sondern nur, wenn diese makroskopisch verändert sind.

Seit neuestem versucht man in der Humanmedizin mit Hilfe der Szintigraphie sogenannte "Wächterlymphknoten" aufzuspüren und zu entfernen. Diese Lymphknoten sind dem Tumor direkt nachgeschaltet. Enthält der so entfernte Lymphknoten Metastasen, so ist eventuell eine genauere Aussage in bezug auf die Prognose möglich (Mac Masters et al., 1998). Eine noch laufende Studie an der Universitätsklinik in Kiel unter der Leitung von Dr. Ostertag soll zeigen, ob die für die Patientinnen mit sehr unangenehmen Folgen behaftete radikale Lymphonodoektomie aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse in weiterer Zukunft unterbleiben kann (Ostertag, 1999).

2.2. Die Milchdrüse der Katze und ihre lymphatische Entsorgung

Die Milchdrüse der Katze besteht aus 4 Mammakomplexen in jeder der zwei Milchleisten. Aufgrund ihrer Lokalisation werden die Komplexe als

- T1, erster thorakaler Komplex
- T2, zweiter thorakaler Komplex
- A1, erster abdominaler Komplex
- A2, zweiter abdominaler Komplex

bezeichnet.

In einer aktuellen Studie über die regionären Lymphknoten des Gesäuges der Hauskatze von Vollmerhaus et al. (1997), wurden zur Darstellung der afferenten Lymphgefäße subkutan bzw. intramammär Farblösungen (Berliner Blau, Tusche, Tinte) injiziert, zur Darstellung der efferenten Bahnen erfolgte die Injektion direkt in die Lymphknoten.

Dabei wurden folgenden Ergebnisse gewonnen:

An der Lymphdrainage des Gesäuges der Katze ist eine Kette von Lymphknoten beteiligt, die cranial, lateral und kaudal beider Gesäugeleisten zu finden ist.

Sie besteht von cranial nach caudal gesehen aus dem inkonstanten Ln. axillaris primae costae und den konstant vorkommenden Lnn. axillaris proprius, axillaris accessorii (Lc. axillare), die ihre Lymphe in den Venenwinkel entlassen und den Lnn. epigastrici caudales und inguinales supf. (Lc. inguinofemorale), die die Lymphe in Richtung Körperhöhle zum Lc. iliosacrale weiterleiten.

Demnach kann eine kraniale und eine kaudale Fließrichtung unterschieden werden, wobei die Grenze innerhalb der Mammarkomplexe variabel ist.

Sie liegt entweder zwischen T1 und T2, zwischen T2 und A1 oder zwischen A1 und A2.

2.3. Definition und Diagnostik von Metastasen in der Humanmedizin

Die Entdeckung auch kleinster Metastasen in den regionären Lymphknoten und ihre Bedeutung in bezug auf die Prognose spielt in der Humanmedizin nach wie vor eine große Rolle.

Auch beim Hund wurde der Nachweis von Mikrometastasen und ihr prognostischer Wert untersucht und die Relevanz für Prognose und Therapie bewiesen (Busch und Rudolph, 1995).

Die Problematik beim Nachweis solcher Kleinstmetastasen, die oft nur aus einzelnen Zellen bestehen, besteht zum einen in der Identifizierung der Tumorzellen. Da in der Routinediagnostik die H.E. Färbung bevorzugt wird, können Tumorzellen allein anhand ihrer Größe und Kernmorphologie, sowie eventuell der Kern-Plasma-Relation erkannt werden.

Um eine Tumorzelle im H.E. Schnitt zu erkennen, muß sie sich zum anderen erst einmal in der Schnittebene befinden.

Bei einer angenommenen Schnittdicke von 2 µm heißt das, daß ein Lymphknoten, egal welcher Größe, komplett histologisch aufgeschnitten werden müßte, um eine 1-zellige Mikrometastase zu finden.

Dies bedeutet jedoch einen nicht zu bewältigenden Zeitaufwand, da so bei einer durchschnittlichen Lymphknotengröße von 1 cm 5000 Schnitte anzufertigen und auszuwerten wären.

Deshalb beschäftigen sich in der Humanmedizin viele Studien mit der Verbesserung der Diagnostik von Mikrometastasen durch neuere Methoden oder erhöhte Schnittzahlen (Rosen et al., 1981; Fisher et al., 1983; Wells et al., 1984; Bosse und Schmitz, 1985; Bussolati et al., 1986; Trojani et al., 1987a; Trojani et al., 1987b; Friedmann et al., 1988; Apostolikas et al., 1989; Ronay et al., 1989; Group, 1990; Galea et al., 1991; Stosiek et al., 1991; Chen et al., 1993; Tsuchiya et al., 1996).

Nach Wilkinson und Hause (1974) liegt die Wahrscheinlichkeit, eine Metastase von 1mm Durchmesser in einem Lymphknoten von 3 mm Durchmesser zu finden, bei 100%, wenn man einen Zentral- und 2 Peripherschnitte anfertigt. Die Wahrscheinlichkeit sinkt mit zunehmender Größe des Lymphknotens und steigt mit zunehmender Größe der Metastase.

In den oben genannten Studien wurden die Metastasen als Mikrometastasen oder okkulte Metastasen bezeichnet, die in der Routinediagnostik nicht erkannt wurden.

2.3.1. Prognostische Bedeutung von Metastasen

Ab wann einer Metastase im Lymphknoten eine prognostische Bedeutung zukommt, ist nicht eindeutig geklärt.

Fisher et al. (1983) setzten die Risikogrenze für Mikrometastasen bei 3mm und mehr als 3 befallenen Lymphknoten für die Frau fest.

Einige Autoren sehen einen deutlichen Unterschied in der Überlebens- und Rezidivrate bei Patientinnen mit metastasenfreien Lymphknoten und solchen mit okkulten Mikrometastasen (Bussolati et al., 1986; Trojani et al., 1987a; Trojani et al., 1987b; de Mascarel, 1992)

Andere hingegen sehen keine Bedeutung in dem Vorhandensein von Mikrometastasen (Pickren, 1961; Fisher, 1978; Fisher, 1978; Tsuchiya et al., 1996).

2.4. Intermediärfilamente

Intermediärfilamente stellen Bestandteile des Zytoskeletts dar. Sie bestehen aus einer zentralen, bei allen Intermediärfilamenten übereinstimmenden Aminosäuresequenz, die von unterschiedlichen Kopf- und Schwanzstücken flankiert wird. Dadurch lassen sich diese Polypeptide, wie in Tabelle 1 dargestellt, in 5 Gruppen unterteilen (Steinert et al., 1985):

Tabelle 1: Subtypen der Intermediärfilamente

Gruppe	Vorkommen	MG
Desmin	Muskel	52 kd
Vimentin	mesenchymale Zellen	53 kd
Neurofilamente	neuronalen Zellen	65 kd, 105 kd, 135 kd
Gliafilamente	Astroglia	50 kd
Zytokeratine	epitheliale Zellen	40 - 70 kd

MG: Molekulargewicht; kd: Kilodalton

Diese Bestandteile des Zellskeletts bilden in den Zellen, in denen sie vorkommen, Antigene, die wiederum von geeigneten Antikörpern besetzt und somit "erkannt" werden können.

Dieses Prinzip macht sich die Immunhistochemie zu nutze, um die Herkunft einer Zelle bestimmen zu können.

Da es sich bei Mammagewebe um Zellen epithelialen Ursprungs handelt, sind die Zytokeratine im weiteren von Bedeutung und sollen daher eingehender besprochen werden.

2.4.1. Zytokeratine

Die Zytokeratine lassen sich weiter unterteilen in basische Zytokeratine, bestehend aus 8 Proteinen mit einem Molekulargewicht von 54 - 70 kd (CK 1-9) und saure Zytokeratine, bestehend aus 12 Proteinen mit einem Molekulargewicht von 40 - 64 kd (CK 10-19) (Cooper et al., 1985; Moll, 1986). Durch diese Vielzahl von Proteinen ist es möglich, einzelne epitheliale Gewebe noch weiter zu differenzieren, da jedes Gewebe sein eigenes Zytokeratinmuster exprimiert.

Dabei treten basische und saure Zytokeratine in Kombinationen mit etwa dem gleichen Molekulargewicht auf (Moll, 1986).

Ist das Zytokeratinmuster eines Gewebes bekannt, kann bei Gewebe unbekannter Herkunft, wie z. B. bei gering differenzierten Tumoren, deren Herkunft mit Hilfe der Immunhistochemie bestimmt werden (Altmannsberger et al., 1981a; Osborn und Weber, 1982; Erlandson, 1984; Osborn, 1984; Quinlan et al., 1984; Moll, 1986; Lobeck, 1990)

2.4.1.1. Zytokeratine in neoplastisch verändertem Gewebe

Das Zytokeratinmuster eines Gewebes wird auch in entdifferenzierten Zellen nahezu vollständig beibehalten.

Dadurch ist es möglich, auch in stark neoplastisch veränderten Geweben, wie Metastasen, dieses Muster nachzuweisen und so die Herkunft dieser Metastasen zu bestimmen (Osborn und Weber, 1983; Erlandson, 1984; Virtanen et al., 1984; Altmannsberger, 1988; Lobeck, 1990).

2.4.1.2. Zytokeratine bei der Katze

Wohingegen das Zytokeratinmuster der Mamma beim Mensch weitestgehend bekannt ist (Altmannsberger et al., 1981a; Altmannsberger et al., 1981b; Osborn und Weber, 1983; Miettinen et al., 1984; Altmannsberger et al., 1985; Altmannsberger, 1988), gibt es bei der Katze bisher nur wenige Untersuchungen zu diesem Thema (Moore et al., 1989; Ivanyi et al., 1992; Ivanyi et al., 1993).

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Mamma der Katze hauptsächlich Zytokeratine mit geringem Molekulargewicht exprimiert.

Ivanyi et al. (1992) untersuchten sowohl Mammagewebe gesunder Katzen als auch Karzinomzelllinien feliner Mammakarzinome in vitro mit cytokeratinspezifischen Antikörpern und verglichen die Ergebnisse mit denen von Epithelien des Menschen. Bei der Katze wurden in normalem Mammagewebe das Gangepithel und die Drüsenendstücke von Antikörpern angefärbt, die die Cytokeratine 7, 18, 5 und 8, sowie 6 und 18 enthielten.

In den Karzinomzelllinien färbten die Antikörper mit Cytokeratin 4, 14 und 17, 7, 18, 19, 5 und 8 sowie Vimentin. Aus den genannten Untersuchungen geht hervor, daß bei der Katze hauptsächlich die sauren Zytokeratine - hier noch

insbesondere CK 18/19 - von Bedeutung sind. Im Vergleich mit den Ergebnissen der Epithelien des Menschen stellten sie fest, daß die Cytokeratine von beiden Spezies durch die gleichen Antikörper erkannt werden, was die Ähnlichkeit der Epitope beweist. Auch das Verteilungsmuster der Cytokeratine in den einzelnen Geweben ist vergleichbar.

2.4.1.3. Zytokeratin - Antikörper

Mittlerweile sind aus der Humanmedizin eine große Anzahl Antikörper erhältlich. Dabei unterscheidet man zwischen spezifischen, monoklonalen Antikörpern, die nur einen einzigen Zytokeratintyp identifizieren und sogenannten "Breitspektrum " Antikörpern, die eine ganze Gruppe von Zytokeratinantikörpern enthalten (Muijen et al., 1984; Gown und Vogel, 1985; Lobeck, 1990).

2.4.1.4. Einfluß der Gewebefixation und der Vorbehandlung der Gewebe auf die Zytokeratinantigene

Die Immunreaktivität der Zytokeratinantigene wird am besten in Gefrierschnitten bewahrt, die zuvor in Alkohol fixiert und in Paraffin eingebettet wurden.

Die in der Routinediagnostik übliche Gewebefixation durch Formalin hingegen scheint die Proteine mit zunehmender Dauer der Fixation erheblich zu schädigen (Battifora, 1988; Miettinen, 1989). Daher empfiehlt sich eine Vorbehandlung der Schnitte, um die Antigene zu demaskieren. Die Vorverdauung durch Enzyme hat sich hierbei als wertvolles Mittel erwiesen. Es stehen verschiedene Trypsine (Curran und Gregory, 1977; Pinkus et al., 1985), Pepsin (Miettinen, 1989) oder Pronase (Battifora und Kopinski, 1986) zur Verfügung. Die Einwirkzeit der Verdauungsenzyme hängt von der vorangegangenen Dauer der Fixation ab, die allerdings bei Einsendungen oder Archivmaterial nicht mehr zu bestimmen ist. Die Angaben in der Literatur reichen von 10 min. bis zu 2 Stunden.

Der Mechanismus, mit dem die Antigene durch die Vorverdauung demaskiert werden, beruht auf dem Aufbrechen von Disulfid-Brücken, die sich unter dem Einfluß von Formalin bilden, und somit die Tertiärstruktur der Proteine verändern (Walter, 1999).

2.5. Immunhistochemische Färbeverfahren

Zur immunhistochemischen Darstellung von Zytokeratinen in epithelialen Geweben stehen heute verschiedene immunhistochemische Färbeverfahren zur Verfügung.

Die ABC-Methode und die APAAP- Methode sind dabei seit längerem bekannt und etabliert (Cordell et al., 1984; Denk, 1986; Boenisch, 1989; Duhm, 1990; Davidoff et al., 1991).

Allen Methoden liegt das Prinzip der Antigen-Antikörperbindung zu Grunde. Die Methode ist um so sensitiver, je stärker die Affinität von Link- und Enzym-Antikörper-Komplex ist und wie viele Bindungsstellen wiederum der Komplex den Enzym-Chromogenmolekülen bietet.

Im allgemeinen beträgt die Bindungsaffinität 10^8 M^{-1} .

Bei dem Biotin-Streptavidin amplifizierten System, einer neueren Methode in der Immunhistochemie ist die Bindungsaffinität zwischen Streptavidin und Biotin um über 1 Million höher, nämlich 10^{15} M^{-1} und stellt somit die stärkste aller bekannten nichtkovalenten Bindungen dar (Chaiet und Wolf, 1964).

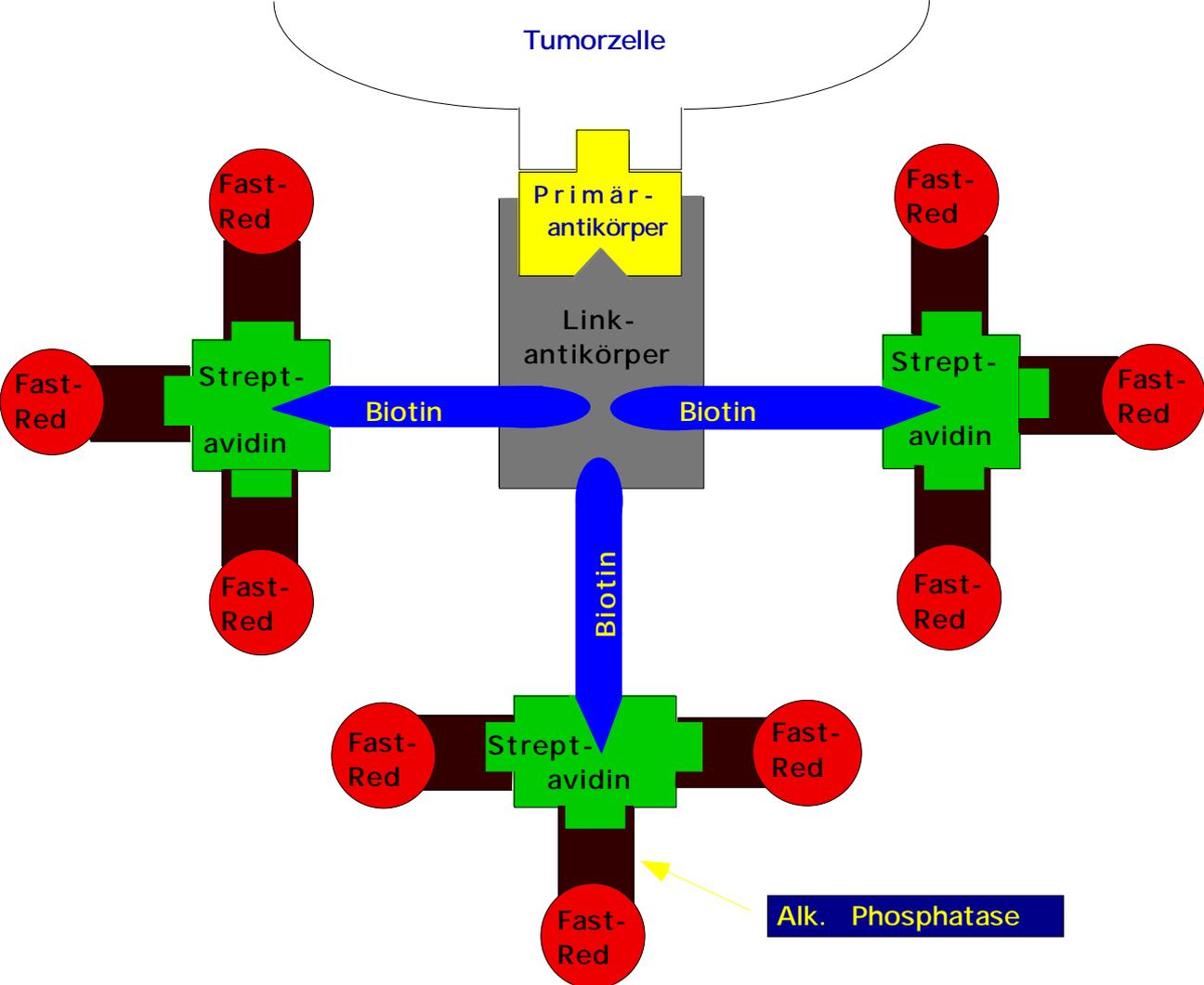
Gegenüber Avidin besitzt Streptavidin den Vorteil, keine Carboanhydrate zu enthalten, die unspezifisch an Lectin-ähnliche Substanzen binden können, die im normalen Geweben gefunden werden (Woods und Warnke, 1981; Naritoku und Taylor, 1982).

Eine weitere Problematik stellt die durch die Biotinylierung veränderte Rezeptorqualität des Link-Antikörpers dar. Im BSA System ist es jedoch gelungen, die Biotinmoleküle an den Link-Antikörper zu binden, ohne daß die Affinität des Rezeptors beeinträchtigt wurde.

Die unspezifischen Bindungseffekte, die bei der Verwendung von Avidin häufig auftraten, werden beim Streptavidin minimiert, da dieses seinen isoelektrischen Punkt in der Nähe des Neutralpunktes hat und daher nicht wie das Avidin positiv geladen vorliegt.

Die oben genannten Zusammenhänge werden in Schema 1, Seite 12 verdeutlicht:

Schema 1: BSA-Methode



3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. MATERIAL

3.1.1. Patientengut

Zur Verfügung standen 334 Mammagewebe von 277 Katzen aus dem Archiv des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin.

Die Fälle wurden anhand der routinemäßigen mittels H. E. gefärbten Schnitte mikroskopisch auf das Vorhandensein von Lymphknoten untersucht.

Dabei enthielten 35 Proben, die von 1992 - 1996 zur Einzeleinsendung gelangt waren, sowie 15 Proben, die innerhalb der routinemäßigen Untersuchung im Rahmen der Sektionen von 1987 - 1996 entnommen wurden, jeweils mindestens einen Lymphknoten oder Lymphgewebe. Die Gesamtzahl der vorhandenen Lymphknoten betrug 54, darüber hinaus wurde sechs Mal ausschließlich Lymphgewebe gefunden.

Die Proben waren in Paraffin eingebettet und wurden je nach Zustand umgebettet.

Aus jeder Probe wurde ein histologischer Schnitt mit einer Dicke von 4 µm entnommen und zur erneuten Klassifizierung mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Bei allen Tieren wurde in der zum Zeitpunkt der Einsendung bzw. Sektion durchgeführten Routinehistologie ein Mammarkarzinom befundet. Von den untersuchten Fällen waren bei 15 Fällen keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen worden.

Für die Vorversuche wurden 5 Katzen (S 860/97, S 866/97, S 890/97, S 895/97, S 931/97) mit unverändertem Mammagewebe, sowie 2 Katzen (S 1123/97, S 1255/97) mit Mammarkarzinom und metastasenpositiven Lymphknoten ausgewählt.

3.1.2. Geräte und Materialien

3.1.2.1. Antikörper

Innerhalb der Vorversuche wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Antikörper auf ihre Eignung zur Darstellung von Mammagewebe bzw. Tumor und Lymphknotenmetastasen getestet und ausgewertet.

Tabelle 2: Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Methode	Bestellnummer	Spezifität	Verdünnung
AE1	Zymed S.F.	APAAP	18-0153	saure CK-Anteile (Ausnahme: CK12,17,18)	1:50, 1:100
AE1	Biogenex	BSA	AM0754 M		unverdünnt
AE1	Zymed S.F.	BSA	s.o.		1:500, 1:1000,
CK 8/18/19	Biogenex	APAAP	AM1315 M	CK 8/18/19	unverdünnt
CK 8/18/19	Biogenex	BSA	s.o.		unverdünnt

Literatur:

AE1 Antikörper : (Cooper et al., 1985; Sorenson et al., 1987; Sandusky, 1991; Walter, 1999)

CK (8/18/19) : (Makin et al., 1984; Bartek et al., 1991; Galea et al., 1991; Sandusky, 1991; Walter, 1999)

3.1.2.2. Technische Geräte und Reagenzien

Die zur Anfertigung der histologischen Schnitte und Färbungen benötigten Reagenzien und Geräte sind nachstehend in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Hersteller	Bestellnummer
Objektträger	Langenbrinck	100236
Sequenza	Shandon	-
Cover Plates	Shandon	72110013
Kaiser's Gyceringelatine	Meck	9242
Hämatoxylin	Chroma	5B535
Eosin	Merck	15935
Silan	Sigma	A 3648
Xylol	Merck	108685
Aceton	Merck	100013
Trizma-Base	Sigma	T1508
Trizma-HCL	Sigma	T3253
NaCl	Merck	6404
Aqua destillata	hergestellt im Institut	
RPMI 1640	Seromed	1215
Fetales Kälberserum	Seromed	0-113
Natriumazid	Merck	6688
Link-Antikörper	Biogenex Testkit	745622
Label-Antikörper	"	"
Pronase	Sigma	P 6911
N,N-Dimethylformamid	Sigma	D4254
1 M Levamisole	Sigma	L 9756
Fast-Red-TR Salz	Sigma	F 2768
Naphtol-AS-MX-Phosphat	Sigma	N 4875

3.2. METHODE

3.2.1. Schnittanfertigung

3.2.1.1 Vorversuch

Aus den für die Vorversuche ausgewählten Proben wurden je Katze aus einer Schnittstufe 30 Serienschnitte mit einer Dicke von 4 µm entnommen, auf Silan-beschichtete Objektträger aufgezogen und eine Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

3.2.1.2. Hauptversuch

Den in Paraffin eingebetteten Lymphknoten wurden in Abständen von 150 µm jeweils 4 Serienschnitte mit einer Dicke von 2 µm entnommen. Dabei dienten 2 Schnitte als Reserve.

Es wurden in den meisten Fällen 3 Ebenen geschnitten, bei 14 Fällen waren es aufgrund des geringen Durchmessers der Proben nur 2 Ebenen, bei zwei Fällen nur eine Ebene.

Von den entsprechenden Mammatumoren wurden jeweils 4 Schnitte mit einer Dicke von 2 µm angefertigt, sofern sie nicht in einem Paraffinblock mit den Lymphknoten eingebettet waren.

Alle Schnitte wurden auf Silan-beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

3.2.2. Histologische Aufarbeitung

3.2.2.1. Lymphknoten

Von den seriellen Lymphknotenschnitten der Hauptversuche wurden je Ebene ein Schnitt mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Diese Schnitte dienten zum Vergleich der methodisch begründeten Aussagekraft mit der immunhistochemischen Färbung.

3.2.2.2. Mammakarzinom

Falls der Primärtumor nicht mit dem Lymphknoten in einen Paraffinblock eingebettet war, wurde ein Schnitt mit Hämatoxylin Eosin gefärbt und diente zur Klassifizierung in Anlehnung an die WHO-Klassifikation (Hampe und Misdorp, 1974).

3.2.3. Immunhistochemische Aufarbeitung

3.2.3.1. Vorversuche

Im Rahmen der Vorversuche wurde zunächst unverändertes Mammagewebe von zwei der zur Verfügung stehenden Sektionskatzen mit den in Tabelle 2, S. 14 angegebenen Antikörpern immunhistochemisch angefärbt.

Dabei wurden drei verschiedene Vorverdauungsverfahren (Protease, Mikrowelle, Harnstoff), sowie die Verdünnungsstufen unverdünnt (Biogenex AK), 1:50, 1:100 (Zymed S.F. AK) mit der APAAP und der BSA Methode ausgetestet.

Aufgrund der Ergebnisse wurden die Gewebeproben aller Vorversuchstiere nach einer Protease Vorverdauung mit dem Antikörper AE1 in den Verdünnungen 1:500 und 1:1000 angefärbt.

Anschließend wurde das Tumorgewebe, sowie die Lymphknoten der Katzen S 856/97 und S 1059/97 nach Protease Vorverdauung mit dem Antikörper AE1 (Zymed S.F.) in der Verdünnung 1:1000 gefärbt.

3.2.3.1.1. Herstellungsverfahren der benötigten Materialien und Reagenzien gemäß Walter (1999)

- Herstellung Citratpuffer

Zitronensäure Monohydrat	2,1g
NaOH (bis pH 6,0)	13 ml
auf 1000 ml mit Aqua demineralisata auffüllen	

- Herstellung Silan-beschichteter Objektträger

3-Aminopropyltriethoxysilane	12 ml
Aceton	588 ml
Objektträger in frische Lösung einstellen	1 min
In Azeton waschen	2 x
Trocknen im Wärmeschrank bei 50°C	über Nacht

- Herstellung des Tris Based Saline Puffers

Trizma Base	4,5 g
Trizma HCL	33,0 g
NaCl	43,9 g
Aqua dest.	5000 ml
mit Trizma Base und Trizma HCL auf pH 7,4 - 7,6 einstellen.	

- Herstellung der Protease-Vorverdauungslösung 0,1%

Protease XXV	10,0 mg
--------------	---------

TBS Puffer 10,0 ml

- Herstellung des RPMI Verdünnungspuffers 1 (für primären Antikörper)

RPMI 1640 50,0 ml
fetales Kälberserum 5,0 ml
Na-Azid 50,0 mg

- Herstellung der primären Antikörperverdünnung

Für den Hauptversuch wurde der Zytokeratinantikörper AE1 in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Als Verdünnungsmedium diente der RPMI 1 Verdünnungspuffer

- Herstellung der Fast Red Lösung:

TBS-Puffer, auf pH 8,2 eingestellt 98,0 ml
Naphtol-AS-MX-Phosphat 20,0 mg
N,N Dimethylformamid (DMF) 2,0 ml

Naphtol-AS-MX-Phosphat in DMF lösen, dann mit TBS auffüllen.

Levamisole, 1M (2,408mg) in Aqua dest. gelöst 100,0 ml
Fast Red TR Salz 100,0 mg

Unmittelbar vor Gebrauch wird Levamisole hinzugefügt, Fast Red Salz gelöst, dann die Lösung in eine Küvette filtrieren.

- Herstellung der Hämalaun-Färbelösung nach Mayer:

Hämatoxylin 1,0 g
Na-Jodat 0,2 g
Aluminium-Kalium-Sulfat 50,0 g
Chloralhydrat 50,0 g
Citronensäure DAB 6 1,0 g
Gereinigtes Wasser der Ionenaust. 1000,0 g

- Herstellung des Ammoniakwassers:

Ammoniak 25%ig 1 ml
Aqua dest. auf 1000 ml

3.2.3.1.2. Austestung der Vorverdauungsmethoden

- a) Vorverdauung der Schnitte in Citratpuffer 2x5 min. in der Mikrowelle bei 600 W
- b) Vorverdauung der Schnitte in 6 M Harnstofflösung 2x5 min. in der Mikrowelle bei 600 W
- c) Vorverdauung der Schnitte 10 min mit Protease bei 37°C im Brutschrank.

bei a) und b) anschließend jeweils Abkühlung der Schnitte um 10 min.

3.2.3.1.3. Färbeanleitung der APAAP Methode

gemäß Walter (1999)

3.2.3.2. Hauptversuche

Im Hauptversuch wurde ein Schnitt aus jeder Ebene mit Hämytoxylin/Eosin gefärbt, der zweite Schnitt mit dem Antikörper AE1 in der *Verdünnung 1:1000* nach einer Protease Vorverdauung mit einer modifizierten BSA Methode.

3.2.3.2.1. Immunhistochemische Färbeanleitung BSA System modifiziert nach Gebrauchsanleitung für Super Sensitive Nachweissysteme, Biogenex, Hamburg (die modifizierten Anteile sind kursiv gedruckt)

- Entparaffinisierung der Schnitte
 - 20 min in Xylol
 - 15 min in Aceton 100%
 - 15 min in Aceton/TBS
- Spülung 2 mal 10 min in TBS Puffer
- *Vorverdauung der Schnitte 10 min mit Pronase bei 37°C im Brutschrank.*
- Spülen mit TBS Puffer.
- *Auflegen der Schnitte auf die Cover plates und einlegen in den Sequenza*
- Spülen mit TBS Puffer.
- Inkubation mit Primärantikörper *30 min.* (100 µl pro Schnitt)

- Spülen mit TBS Puffer 3x5 min.
- Inkubation mit Link-Antikörper 20 min (100 µl pro Schnitt).
- Spülen mit TBS Puffer 3x5 min.
- Inkubation mit Label-Antikörper 20 min (100 µl pro Schnitt).
- Spülen mit TBS Puffer 2x5 min.
- Entfernung der Schnitte aus dem Sequenza.
- Spülen mit TBS Puffer.
- *Inkubation mit der Fast-Red Lösung 30 min auf dem Schüttler.*
- Spülen mit TBS Puffer.
- Gegenfärbung mit *Hämalaun 30 sec.*
- Waschen mit Leitungswasser 10 min.
- Kurz eintauchen in Ammoniakwasser.
- Spülen mit Leitungswasser.
- Eindeckeln mit Glycerin-Gelatine.

3.2.3.3. Kontrollen

3.2.3.3.1. Positivkontrolle

Um die richtige Anwendung der immunhistochemischen Färbemethode zu überprüfen, wurde in jedem Färbedurchgang das dem Lymphknoten zugehörige Mammatumorgewebe mitgefärbt. Gleichzeitig diente dieser Schnitt dazu, bei metastasennegativen Lymphknoten zu kontrollieren, ob der Primärtumor zytokeratin-positiv war, d.h. im Falle einer Nichtanfärbbarkeit des Primärtumors wäre ein metastasennegativer Lymphknoten besonders kritisch zu beurteilen gewesen.

Dies war allerdings bei keinem der Primärtumoren der Fall.

3.2.3.3.2. Negativkontrolle

Als Negativkontrolle diente ein Schnitt mit unverändertem Mammagewebe der Katze, das statt mit dem Primärantikörper AE1 mit 100 µl TBS Puffer inkubiert wurde. Ansonsten durchlief der Schnitt alle unter Kap. 2.3.2.1. S.19 + 20 angegebenen Färbeschritte. Das Gewebe dieser Schnitte durfte sich nicht anfärben.

3.2.4. Auswertungskriterien bei der Befundung immunhistochemisch gefärbter Lymphknoten

Eine Zelle wurde als positiv befundet, wenn das Zytoplasma den Zellkern vollkommen umschloß und der Zellkern innerhalb der Schnittebene lag.

Die Größe der Metastasen wurde anhand der Zellanzahl in 5 verschiedene Gruppen eingeteilt. Dabei wurden die Zellen gezählt, die untereinander Kontakt hatten und in einer Schnittebene lagen.

Im Laufe der Auswertung stellte sich folgende Einteilung als sinnvoll heraus:

- 1-20 Zellen
- > 20 - 200 Zellen
- > 200 - 20.000 Zellen
- > 20.000 - 40.000 Zellen
- > 40.000 Zellen

Bei mehr als einer Metastase innerhalb eines Lymphknotens mußten die Zellen in allen vorhandenen Schnittebenen isoliert vorliegen.

Metastasen mit über 20.000 Zellen, bei denen alle Lokalisationen des Lymphknotens betroffen waren, wurden als "Makrometastasen" bezeichnet, alle übrigen Metastasen als "Mikrometastasen".

Bei der Feststellung des Metastasierungsverhaltens der Karzinomtypen ging metastasenpositives Lymphgewebe ebenfalls in die Bewertung mit ein.

Als Tumorzellemboli wurden Einzelzellen oder Zellverbände ohne Stroma bezeichnet, die innerhalb von Gefäßen im Lymphknoten oder in zuführenden Gefäßen lagen und dort keinerlei Wandhaftung aufwiesen.

Für die Bestimmung der Lokalisation der Metastasen wurden die morphologisch abgrenzbaren Funktionseinheiten des Lymphknotens gewählt:

- das Lymphgefäßsystem mit Randsinus, Intermediärsinus, Marksinus
- das Parenchym mit Kortex, Parakortex und Mark

Bei mehr als 5 Metastasen in mehr als 3 verschiedenen Lokalisationen wurde der Terminus "diffus von Metastasen durchsetzt" gewählt.

Zur Bestimmung der Morphologie der Metastasen wurden der Typ (s. Kap. 2.1.4. S.4), die Invasivität des Wachstums, das Vorhandensein von Blutungen, sowie Nekrosen vermerkt.

Als metastasenpositiv wurde ein Lymphknoten bezeichnet, wenn er mindestens in einer der vorhandenen Schnittebenen eine Metastase gleich welcher Größe aufwies.

Als metastasenfrei wurde ein Lymphknoten bezeichnet, wenn er keine markierten Tumorzellen oder ausschließlich Tumorzellemboli enthielt.

3.2.5. Kriterien zur Bewertung des Differenzierungsgrades der Metastasen im Vergleich zum Primärtumor

- besser differenziert war eine Metastase, wenn sie im Gegensatz zum Primärtumor kein infiltratives Wachstum aufwies, der Primärtumor als solides Karzinom eingestuft worden war, die Metastase jedoch als Adenokarzinom oder aber Klassifikation und Wuchsform übereinstimmend waren, die Metastase im Gegensatz zum Primärtumor jedoch keine Regression zeigte.

- gleich differenziert war die Metastase, wenn Tumortyp und weitere morphologische Kriterien übereinstimmten.

- schlechter differenziert war die Metastase, wenn der Primärtumor als Adenokarzinom eingestuft wurde, die Metastase jedoch als solides Karzinom, und wenn sie, anders als der Primärtumor, Regression oder infiltratives Wachstum zeigte.

3.2.6. Kriterien zur Bewertung des Methodenvergleichs zwischen HE- und Immunfärbung

Die seriellen H.E. Schnitte wurden anhand eines Blindversuches befundet, d.h. dem Untersucher waren weder die Eingangsnummer, noch der immunhistochemische Befund bekannt.

Die so erhobenen Befunde wurden mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchung verglichen.

Als übereinstimmend wurden die Befunde gewertet, wenn

- der histologische Befund und der immunhistochemische Befund positiv waren und die Metastasen in den gleichen Lokalisationen auftraten.

- der histologische Befund und der immunhistochemische Befund negativ waren.

Als nicht übereinstimmend wurden die Befunde gewertet, wenn

- der histologische Befund negativ, der immunhistochemische Befund positiv,
- der histologische Befund positiv, der immunhistochemische Befund negativ,
- der histologische Befund positiv, der immunhistochemische Befund ebenfalls positiv, aber in unterschiedlichen Lokalisationen war.

3.3. ERGEBNISSE

3.3.1. Nationale

3.3.1.1. Geschlechtsverteilung

Bei den untersuchten Tieren handelt es sich ausschließlich um weibliche Katzen. Von insgesamt 50 Tieren waren 14 (28%) kastriert.

3.3.1.2. Altersverteilung

Die Tiere waren im Durchschnitt 12,1 Jahre alt. Dabei waren eine Perserkatze sowie eine Burma Katze mit jeweils 6 Jahren die jüngsten Patienten. Bei 3 Katzen fehlte die Altersangabe.

3.3.1.3. Rassenverteilung

Das Patientengut bestand zu 87,5 % aus Europäischen Hauskatzen. Des weiteren waren 2 Perserkatzen, 1 Burmakatze, 1 Perser-Mix und ein Karthäuser-Mix vertreten. Bei 7 Katzen war die Rasse nicht zu ermitteln.

3.3.2. Histologische Befunde an der Mamma

3.3.2.1. Histologische Diagnosen S-Fälle

Nr.	S-Nr.	HE-Befund
01	319/87	Multilobuläres, durch schmale bindegewebige Stränge septiertes, überwiegend solide bis papillär und infiltrativ wachsendes Adenokarzinom der Mamma. Ausgeprägte Lymphangiosis carcinomatosa, Nekrose und periphere Lymphozytenansammlung.
02	1083/87	Infiltrativ wachsendes alveoläres Adenokarzinom mit Nekrosen und peripherer Lymphozytenansammlung.
03	1832/89	Weitgehend solide wachsendes, mit nur wenig bindegewebigem Stroma versehenes, zentral überwiegend nekrotisierendes Karzinom, das in einigen Abschnitten alveoläre Differenzierungstendenz aufweist. Infiltratives Wachstum sowie periphere Lymphozytenansammlung.
04	2056/90	Primär multiples papilläres Adenokarzinom mit soliden Anteilen, infiltratives Wachstum, teilweise Kapselbildung, Lymphangiosis carcinomatosa.

05	42/92	Solide Karzinome der Mamma. Ausgeprägte Nekrose in inneren Bezirken der Tumoren, Begleitentzündung, infiltratives Wachstum durch die Kapsel und Einbrüche in Blutgefäße.
06	425/92	Hochmalignes infiltrativ wachsendes Adenocarcinom der Mamma mit überwiegend tubulärem, teilweise solidem Wachstum. Abschnittsweise ist der Tumor aufgrund seiner Nekroseneigungen als Komedo-Karzinom ansprechbar.
07	1911/ 92	Papilläres Adenokarzinom mit soliden Anteilen, Nekrose, infiltratives Wachstum und periphere Lymphozytenansammlung.
08	1955/ 92	Metastasierendes, infiltrativ wachsendes Karzinom der Mamma, überwiegend solide, teilweise papillären Typs mit früher Nekroseneigung.
09	298/93	Es wurde kein Primärtumor gefunden.
10	206/95	Solides Karzinom mit Fibrosierung, infiltrativem Wachstum, Nekrotisierungstendenz, Kapselbildung und -durchbrüchen, Blutungen, Hämosiderose und Begleitentzündung. Gleichzeitig intaktes und hyperplastisches Mammagewebe vorhanden.
11	368/95	Multinoduläres weitgehend solides Karzinom mit infiltrativem Wachstum.
12	1465/ 95	Es wurde kein eigentlicher Primärtumor gefunden.
13	559/96	Papilläre Adenokarzinome primär multipler Genese, infiltrativ, Invasion des Coriums, Lymphangiosis, teilweise solide Anteile mit Kernatypien, kleinere Lymphozytenansammlungen in den Randbezirken und im Fettgewebe.
14	716/96	Solides Karzinom der Mamma mit multiplen, konfluierenden Nekrosen und infiltrativem Wachstum.
15	1370/ 96	Tubuläres Adenokarzinom mit infiltrativem Wachstum, keine Kapselbildung, diffuse Lymphozyteninfiltration.

3.3.2.2. Histologische Diagnosen E-Fälle:

Nr.	E-Nr.	HE-Befund
01	701/ 92	Solides Karzinom mit Nekrosen, infiltrativem Wachstum, Blutungen und peripherer Lymphozytenansammlung.
02	1119/ 92	Tubuläres Adenokarzinom mit soliden Wachstumstendenzen. Teilweise fehlende Kapselbildung und infiltratives Wachstum, Lymphangiomas carcinomatosa.
03	1958/ 92	Tubuläres Adenokarzinom mit papillär-zystischen und soliden Anteilen, primär multipel, infiltratives Wachstum in Muskulatur und Corium, besonders in Lymphgefäße, Begleitentzündung und Blutungen.
04	2832/ 92	Papillär-zystisches Adenokarzinom der Mamma mit soliden Anteilen, Nekrosen, infiltrativem Wachstum und peripherer Lymphozytenansammlung.
05	2950/ 92	Tubuläres Adenokarzinom mit soliden Anteilen auf multifokaler Grundlage. Infiltratives Wachstum durch die Kapsel in mehreren Bereichen, insbesondere auch Infiltration in das Korium und durch das Plattenepithel mit Ulcusbildung, periphere Lymphozytenansammlung.
06	25/93	Papillär-zystisches Adenokarzinom von einer starken bindegewebigen Kapsel umgeben mit zentraler Nekrose. Im Randbereich findet sich eine Begleitentzündung.
07	233/93	Multifokales, papillär-zystisches Adenokarzinom mit soliden Anteilen, Begleitentzündung und infiltrativem Wachstum.
08	390/93	Papilläres Adenokarzinom mit wenigen Zysten, Lymphozyteninfiltrate in der Umgebung des Tumors, infiltratives Wachstum, in einigen Bereichen fehlende Kapselbildung.
09	531/93	Solides Karzinom mit infiltrativem Wachstum.
10	949/93	Papillär-zystisches Adenokarzinom primär multipler Genese mit fortgeschrittener Vernarbungstendenz, infiltrativem Wachstum und chronischer Begleitentzündung. Sekundäre Zystenbildungen infolge von Abflußbehinderungen.
11	1284/ 93	Tubuläres Adenokarzinom mit soliden Anteilen, Infiltration des Koriums, ausgeprägte Nekroseneigung, geringgradige Lymphozyteninfiltration in der Peripherie des Tumors.

12	1363/ 93	Tubuläres Adenokarzinom multifokale Genese, Lymphozytenansammlung in Randbereiches des Tumors, ausgedehnte Nekrosen, infiltratives Wachstum, teilweise fehlende Kapselbildung, Lymphangiosis carcinomatosa.
13	1409/ 93	Tubuläres Adenokarzinom mit wenigen papillären Anteilen und ausgedehnter und früher Nekroseneigung. Infiltratives Wachstum und chronische Begleitentzündung, Lymphangiosis carcinomatosa, sowohl im Bereich des Koriumgewebes der Haut als auch in der Tiefe zwischen eigentlichem Mammagewebe und der Muskulatur. In einem Seitenbereich Einbruch in eine Vene.
14	1651/ 93	Papillär-zystisches Adenokarzinom mit soliden Anteilen in der Zysten kapsel, Lymphozytenansammlungen in der Peripherie, primär multipel, ausgeprägte Vernarbungstendenz, Blutungen und Nekrosen.
15	129/94	Multiple, papillär-zystische Adenokarzinome, infiltratives Wachstum, wobei multiple atypische Krebszellen innerhalb von Stromaspalten liegen und den Eindruck einer Lymphangiosis carcinomatosa ergeben. Nekroseneigung und ausgeprägte Begleitentzündung.
16	1592/ 94	Nur Lymphknoten, Mammaleisten vor 1 Jahr entfernt.
17	2163/ 94	Solides Karzinom, Kernatypien, invasives Wachstum auch in die Muskulatur, Nekrosen.
18	2680/ 94	Alveoläre Adenokarzinome mit soliden Anteilen und ausgedehnten Nekrosen, weiterhin multiple frühe Karzinomentwicklungen in weiteren Mammaläppchen; infiltratives Wachstum und periphere Lymphozytenansammlung.
19	381/95	Tubuläres Adenokarzinom mit Lymphangiosis carcinomatosa
20	526/95	Solides Karzinom mit schneller Nekroseneigung, ausgeprägtem infiltrativen Wachstum mit Lymphangiosis carcinomatosa. Gleichzeitiges Vorhandensein eines Plattenepithelkarzinoms.
21	676/95	Multiple solide Karzinome mit infiltrativem Wachstum, Nekrosen und peripherer Lymphozytenaggregation.
22	710/95	Papilläres Adenokarzinom mit soliden Wachstumstendenzen, einzelnen großen Zysten, infiltrativem Wachstum, Nekrosen und chronischer Begleitentzündung, sowie Lymphangiosis carcinomatosa.

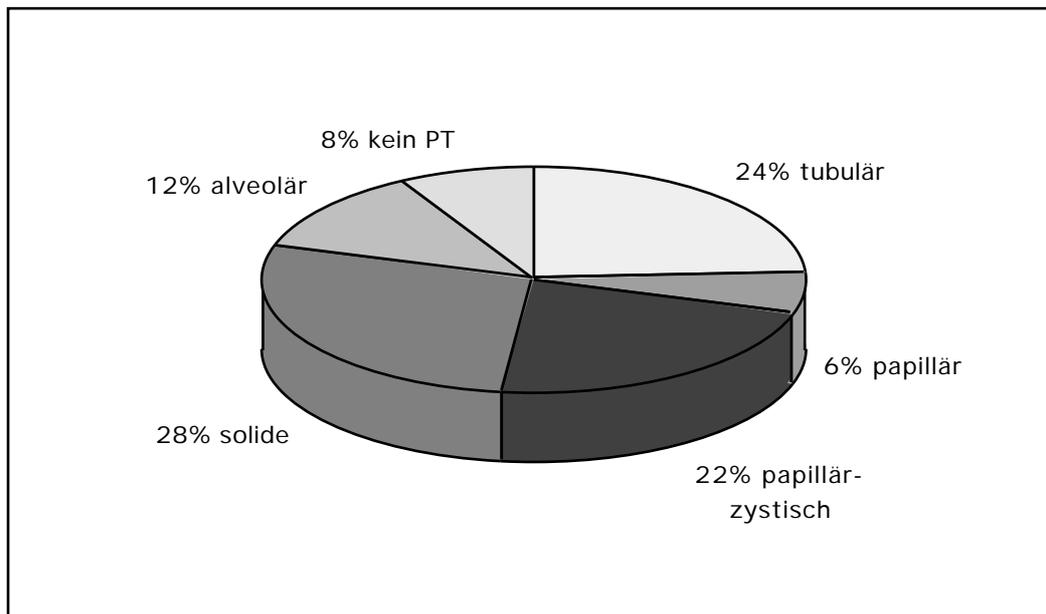
23	841/95	Papillär-zystische Adenokarzinome primär multipler Genese, infiltratives Wachstum, kleinere Lymphozytenansammlungen, Lymphangiosis carcinomatosa.
24	995/95	Papillär-zystische Adenokarzinome multipler Genese, infiltratives Wachstum, Lymphozytenansammlungen und Nekroseneigung.
25	1254/ 95	Alveoläres Adenokarzinom.
26	1863/ 95	Solides Karzinom mit papillären Anteilen, Nekroseneigung, Blutungen und Fibrosierungen.
27	2002/ 95	Tubuläres Adenokarzinom, ausgesprochen infiltratives Wachstum, keine Begrenzung gegenüber dem umliegenden Drüsengewebe.
28	2129/ 95	Ausschließlich Lymphknoten eingesandt.
29	2820/ 95	Alveoläres Adenokarzinom mit peripher abnehmendem Differenzierungsgrad und solidem Wachstum, dünne Kapselbildung und Lymphozyteninfiltration.
30	115/96	Papillär-zystisches Adenokarzinom, stark infiltratives Wachstum, Nekrosen, einige Bezirke mit früher Karzinombildung bzw. Drüsenhyperplasie.
31	273/96	Primär multiple, solide Karzinome mit infiltrativem Wachstum, Invasion des Koriums und Ulzerationen der Haut. Ausgeprägte Nekroseneigung, Lymphozyteninfiltration, Lymphangiosis carcinomatosa.
32	713/96	Multiple, tubuläre Adenokarzinome mit ausgeprägt infiltrativem Wachstum, Invasion des Koriums, kaum Kapselbildung erkennbar, Nekrosen, Lymphozytenansammlung in der Umgebung des Tumors, Lymphangiosis carcinomatosa.
33	737/96	Multiple, alveoläre Adenokarzinome mit Lymphangiosis carcinomatosa sowie ausgedehnten Nekrosen, infiltrativem Wachstum und peripherer Lymphozytenansammlung.
34	1708/ 96	Multiple, tubuläre Adenokarzinome mit soliden Anteilen, invasives und infiltratives Wachstum, Nekrosen, Blutungen, Lymphozyteninfiltration.
35	2159/ 96	Alveoläres Adenokarzinom mit soliden Anteilen, infiltrativem Wachstum und peripherer Lymphozytenansammlung.

3.3.2.3. Klassifikation

Bei der Klassifikation der Tumore wurden 72% einfache Adenokarzinome und 28% einfache solide Karzinome gefunden.

Bei den Adenokarzinomen waren 12 Fälle (24 %) vom tubulären Typ, 11 Fälle (22 %) vom papillär-zystischen Typ, 6 Fälle (12 %) vom alveolären Typ und 3 Fälle (6 %) vom papillären Typ. Bei 4 Fällen (8%) konnte kein Primärtumor gefunden werden (siehe Graphik 1).

Graphik 1: Qualitative Aufteilung der n=50 Fälle mit Karzinomen



PT: Primärtumor

3.3.2.4. Metastasierungsverhalten der Karzinomtypen

Die soliden Karzinome zeigten zusammen mit den tubulären Adenokarzinomen über 2/3 der Makrometastasen, aber auch insgesamt sechs metastasenfrie Lymphknoten. Die alveolären und die papillär-zystischen Adenokarzinome zeigten zusammen 12 von 18 metastasenfrie Lymphknoten und nur 4 Makrometastasen.

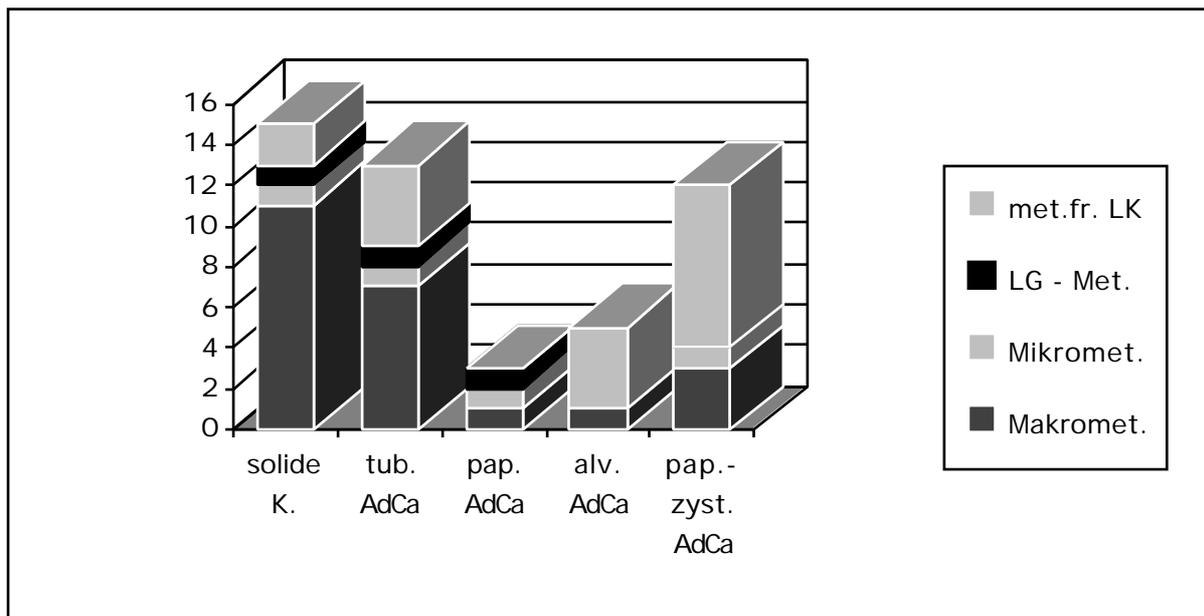
Eine Übersicht aller Ergebnisse ist in Tabelle 4 und in Graphik 2, Seite 30, dargestellt.

Tabelle 4: Metastasierungsverhalten der Karzinomtypen

Mamma	Lymphknoten			
	Makromet.	Mikromet.	LG - Met.	met.fr. LK
solide K.	11	1	1	2
tub. AdKa	7	1	1	4
pap. AdKa	1	1	1	-
alv. AdKa	1	-	-	4
pap.-zyst. A.	3	1	-	8

AdKa : Adenokarzinom; tub.: tubulär; pap.: papillär; alv.: alveolär; pap.-zyst.: papillär-zystisch; A.: Adenokarzinom; K.: Karzinom; Makromet.: Makrometastase; Mikromet.: Mikrometastase; LG - Met.: Lymphgewebemetastase; met.fr. LK: metastasenfrie Lymphknoten

Graphik 2: Metastasierungsverhalten der Karzinomtypen



AdKa : Adenokarzinom; tub.: tubulär; pap.: papillär; alv.: alveolär; pap.-zyst.: papillär-zystisch; A.: Adenokarzinom; K.: Karzinom; Makromet.: Makrometastase; Mikromet.: Mikrometastase; LG - Met.: Lymphgewebemetastase; met.fr. LK: metastasenfrie Lymphknoten

3.3.2.5. Morphologie der Primärtumore

An morphologischen Kriterien wurden die Nekroseneigung, infiltratives Wachstum, das Vorhandensein von soliden Anteilen bei den Adenokarzinomen,

sowie die Lymphozytenansammlung peripher oder innerhalb des Tumors bestimmt.

Dabei ergaben sich folgenden Ergebnisse:

Nekroseneigung zeigten 30 Fälle (65,2 %)
infiltratives Wachstum 37 Fälle (80,4 %)
solide Anteile 18 Fälle (54,5 %) von 72 % Adenokarzinomen
Lymphozytenansammlung 34 Fälle (74 %)

3.3.3. Lymphknoten

3.3.3.1. Zusammenfassung der Einzelbefunde der Lymphknoten S-Fälle

Von den 15 Fällen wurden bei einem Fall ausschließlich Lymphgewebe festgestellt, bei 11 Fällen wurde ein Lymphknoten, bei drei Fällen zwei Lymphknoten gefunden. Von den 14 Fällen mit Lymphknoten war bei einem Fall der Lymphknoten metastasenfrei beurteilt worden. Bei dem Lymphgewebe waren drei Fälle metastasenfrei und einer metastasenpositiv.

Tumorzellemboli wurden in der H.E. Färbung bei zwei Fällen gefunden.

Bei neun Fällen traten Metastasen in allen Lokalisationen auf, bei einem Fall nur in Kortex und Randsinus und bei einem weiteren Fall nur in Kortex, Parakortex, Randsinus und Intermediärsinus.

Auflistung der Ergebnisse s. Anhang, S. 48-50

3.3.3.2. Zusammenfassung Einzelbefunde der Lymphknoten E-Fälle

Von den 35 E-Fällen zeigten fünf Fälle ausschließlich Lymphgewebe. 25 Fälle enthielten einen Lymphknoten, drei Fälle zwei Lymphknoten, ein Fall drei Lymphknoten und ein Fall vier Lymphknoten.

14 Fälle wurden metastasenfrei befundet, von den insgesamt fünf Fällen mit Lymphgewebe wurden vier metastasenfrei befundet.

Tumorzellemboli wurde in drei Fällen gefunden.

Bei 14 Fällen traten die Metastasen in allen Lokalisationen auf, in einem Fall nur im Kortex.

Auflistung der Ergebnisse s. Anhang, S. 50-55

3.3.4. Immunhistochemische Befunde an Mamma und Lymphknoten/Lymphgewebe

3.3.4.1. Ergebnisse der Vorversuche

Der CK-Antikörper 8/18/19 färbte das Mammagewebe bei der Katze auch in unverdünnter Form und nach verschiedenen Vorbehandlungen der Schnitte nur teilweise und wenn, sehr blaß an.

Der Antikörper AE1 hingegen färbte die Drüsenepithelien in den Verdünnungen 1:50 und 1:100 (Zymed S.F.) sowie unverdünnt (Biogenex) sowohl im Mammagewebe, als auch im Lymphknoten sehr intensiv, eine Hintergrundfärbung war kaum vorhanden.

Aufgrund dieses Ergebnisses und den von Busch (1993) gewonnenen Erkenntnissen, wurde der Antikörper der Firma Zymed S.F. in weiteren Versuchen auf 1: 500 und schließlich auf 1:1000 verdünnt, wobei die Färbung der Epithelien ausgezeichnet blieb, die Hintergrundfärbung verschwand.

Zur Vorbehandlung wurden 3 verschiedene Methoden getestet (s. Kap. 3.2.3.1.2., S. 19), von denen sich die Vorverdauung mit Pronase als die beste herausstellte.

Die unterschiedlichen Methoden brachten zwar gleich gute färberische Ergebnisse, jedoch waren bei der Vorbehandlung durch Pronase keine Verluste durch "Abschwimmen" der Schnitte vom Objektträger aufgetreten, wie es bei der Mikrowellenvorverdauung mit Citratpuffer und mit Harnstoff zu über 50 % der Fall war. Weitere Modifikationen der von der Firma Biogenex übernommenen Färbanleitung zur Verbesserung des Färbeergebnisses, sind dem Kapitel 3.2.3.2.1., S. 19 zu entnehmen.

Beim Vergleich der beiden Methoden war die BSA Methode der APAPP Methode durch die leichtere Handhabung der Reagenzien, vor allem aber durch die höhere Sensitivität überlegen, die eine Verdünnung des Zymed Antikörpers auf 1:1000 erlaubte, bei gleicher Qualität der Färbung, die sich bei der APAAP Methode bei 1:100 zeigte.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Antikörper AE 1 der Firma Zymed in der Verdünnung 1:1000 ausgewählt, die Schnitte wurden mit Pronase vorverdaut und mit der BSA Methode und den Reagenzien der Firma Biogenex gefärbt.

3.3.4.2. Immunhistochemische Befunde der Kontrollen

Die Positivkontrollen stammten von Mammagewebe des Hundes, sie reagierten einheitlich positiv.

Die Negativkontrollen (ebenfalls Mammagewebe des Hundes) wurden nicht markiert.

3.3.4.3. Immunhistochemische Lymphknotenbefunde der Hauptversuche

3.3.4.3.1. Auswertung der Fälle und Entdeckung von Lymphgewebe

Bei der Durchsicht der Primärtumore wurde Gewebe entdeckt, das einem Lymphknoten ähnelt, jedoch nicht die typische Lymphknoten-anatomie aufweist. Das Gewebe liegt in Nachbarschaft zum Tumorgewebe, von diesem jedoch deutlich durch Fettgewebe getrennt und dadurch ohne Verbindung zum Tumor selbst. Ein Aufbau aus Mark und Rindenregion, sowie Lymphgefäßsystem fehlt, es können jedoch Gefäßanschnitte innerhalb des Gewebes gefunden werden (s. Abb. 1 S. 56)

In 9 von 50 Fällen (18%) wurde derartiges Gewebe gefunden, dabei stellte sich bei 5 Fällen heraus, daß es sich hier ausschließlich um Lymphgewebe und nicht um Lymphknoten handelt.

- von den 9 Fällen (18%) waren 7 Fälle (78%) metastasenfrei
- bei den metastasenpositiven Lymphgeweben war in einem Fall ausschließlich Lymphgewebe vorhanden, in einem Fall gleichzeitig ein metastasenpositiver Lymphknoten

Bei den restlichen Fällen handelte es sich um die Einsendung bzw. Probenentnahme von einem oder mehreren Lymphknoten pro Fall.

- es waren bei insgesamt 45 Fällen 30 Fälle (66,7 %) metastasenpositiv
- 14 Fälle (31 %) von 45 wiesen zusätzlich Tumorzellemboli auf
- in einem Fall von 45 wies der Lymphknoten ausschließlich Tumorzellemboli auf

3.3.4.3.2. Metastasen/Emboli Lymphknoten Schnittebenen

Es wurden insgesamt 141 Schnittebenen angefertigt. Nur in einem Fall wurde eine Mikrometastase erst in der dritten angefertigten Ebene erkannt.

In allen übrigen Fällen waren entweder alle Ebenen ohne Metastasen oder metastasenpositiv.

Abweichungen in der Beurteilung bestanden lediglich in der genauen Lokalisation der Metastasen.

Bei den Tumorzellemboli waren von den 141 Schnittebenen 25 positiv.

3.3.4.3.3. Metastasen/Emboli Lymphknoten

Insgesamt wurden bei 45 Fällen mit Lymphknotenproben 54 Lymphknoten untersucht.

- 36 Lymphknoten von insgesamt 54 waren metastasenpositiv (66,7 %)
- 14 Lymphknoten von 54 enthielten zusätzlich Tumorzellemboli (25,9 %)
- 1 Lymphknoten von 54 enthielt ausschließlich Tumorzellemboli (1,8 %)

3.3.4.3.4. Metastasengröße

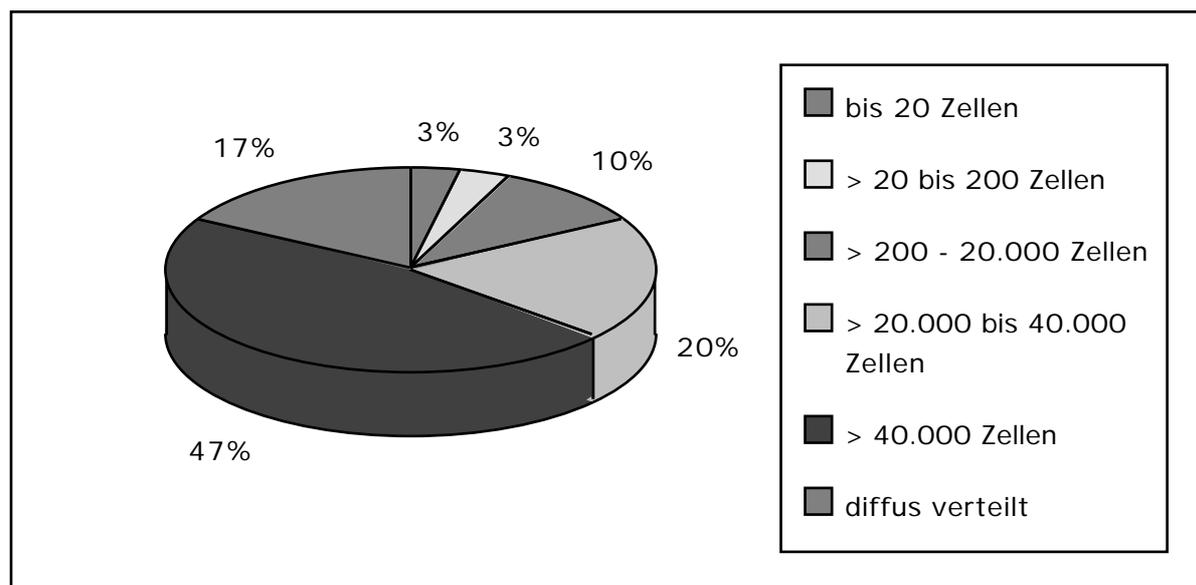
Bei der Metastasengröße dominierte deutlich die Gruppe mit "> 40.000 Zellen" mit 14 von insgesamt 30 Fällen. Die kleineren Metastasen von "- 20" und "20 - 200 Zellen" waren nur mit jeweils einem Fall vertreten.

Die Metastasengröße verteilte sich weiter wie in Tabelle 4 aufgeführt und in Graphik 3 dargestellt:

Tabelle 4: Metastasengröße

- 20 Zellen	20 - 200 Zellen	> 200 - 20.000 Zellen	> 20.000 - 40.000 Zellen	> 40.000 Zellen	diffus verteilt
1 Fall	1 Fall	3 Fälle	6 Fälle	14 Fälle	5 Fälle

Graphik 3: Metastasengröße



3.3.4.3.5. Lokalisation der Metastasen

Es ergab sich, daß in 25 Fällen (86%) alle Lokalisationen des Lymphknotens betroffen waren. Bei den übrigen 5 Fällen (14 %) waren bei 2 Fällen nur Kortex, Parakortex, Randsinus und Intermediärsinus betroffen, bei 3 Fällen war nur der Kortex betroffen.

Bei den 2 Fällen handelte es sich um Lymphknoten, die diffus von kleineren Einzelmetastasen durchsetzt waren.

Bei den restlichen Fällen, bei denen die Metastase nur den Kortex betraf, war in einem Fall die Metastase bis 20 Zellen groß, in einem weiteren 20 - 200 und im dritten Fall 200 - 20.000 Zellen groß.

3.3.4.3.6. Differenzierungsgrad der Metastasen

Der Differenzierungsgrad der Metastasen wurde in Beziehung zum Primärtumor gesetzt.

Aufgrund des auf S. 21 genannten Auswertungsschemas fanden sich in 12 Fällen gleicher Differenzierungsgrad von Metastase und Primärtumor, in 13 Fällen war die Metastase schlechter differenziert als der Primärtumor und in 3 Fällen war sie besser differenziert als der Primärtumor.

3.3.4.3.7. Regressionsneigung der Metastasen

Bei den morphologischen Kriterien wurde die Nekroseneigung der Metastasen zur Bestimmung der Regressionsneigung der Metastase im Vergleich zum Primärtumor gesondert ausgewertet:

geringere Regressionsneigung bestand bei 6 Fällen,

eine stärkere Regressionsneigung der Metastase trat in keinem Fall auf.

3.3.5. Vergleich der immunhistochemischen Methode mit der H.E. Färbung bei der Entdeckung von Metastasen und Tumorzellemboli

Von den untersuchten 54 untersuchten Lymphknoten waren in der H.E. Befundung 35 positiv, 19 als metastasenfrem befundet worden.

Bei der immunhistochemischen Färbung wurden 36 Lymphknoten positiv beurteilt und 18 negativ.

Bei dem einen abweichenden Fall handelte es sich um eine Mikrometastase, die erst in der 3. Schnittebene der immunhistochemischen Ebene sichtbar wurde, aber in der H.E. Färbung der entsprechenden Ebene nicht erkannt worden war (s. Abb. 2, S. 57).

Es wurde kein Fall in der H.E. Färbung als positiv beurteilt, der sich dann in der Immunfärbung als negativ herausstellte.

Bei den Tumorzellemboli wurden 2 Lymphknoten übereinstimmend positiv beurteilt, bei 8 Lymphknoten hingegen wurden die Tumorzellemboli in der H.E. Färbung nicht erkannt.

2 Lymphknoten waren in der H.E. Färbung falsch positiv beurteilt worden; in der Immunfärbung war zu sehen, daß es sich bei den Zellen nicht um Tumorzellen handelte.

3.3.6. Sektionsergebnisse

Die Auswertung der Sektionsergebnisse im Hinblick auf die Lokalisation vorhandener Metastasen ergab folgendes:

ausschließlich Lungenmetastasen: 2 Fälle,
davon ein metastasenfrier Lymphknoten und einmal metastasenfrees
Lymphgewebe

Lungen- und Lymphknotenmetastasen: 9 Fälle

Lungen-, Lymphknoten- und zusätzliche Organmetastasen: 4 Fälle

4. DISKUSSION

Bei den in dieser Arbeit untersuchten 50 Tieren handelt es sich ausschließlich um weibliche Tiere. 14 von ihnen waren kastriert (28%). Diese Angaben sind jedoch aufgrund der nicht immer verlässlich ausgefüllten Begleitschreiben der Einsendungen vorsichtig zu interpretieren.

Das Durchschnittsalter der erkrankten Katzen lag bei 12,1 Jahren. Somit findet sich eine Übereinstimmung mit Hayden und Nielsen (1971), die die höchste Inzidenzrate in der Altersgruppe von 10 - 14 Jahren sehen.

In unserem Fall bestand das Patientengut größtenteils aus Europäischen Hauskatzen (87,5 %). Siamkatzen, die von Hayes et al. (1981) und von Kessler und von Bomhard (1997) als prädisponierte Rasse gesehen werden, waren in dieser Arbeit nicht vertreten.

Besonders im Fall der Rassendisposition sind die oben aufgeführten Ergebnisse aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Fälle nur eingeschränkt aussagekräftig. Die im Abschluß befindliche Dissertation von Annette Rathmann am Institut für Veterinär-Pathologie der FU Berlin, die mit einer Anzahl von 277 Fällen feline Mammatumoren auf Gefäßeinbrüche untersucht, wird hier sicherlich weitere Aussagen zulassen.

Bei der Klassifikation der Mammatumoren standen erwartungsgemäß die Karzinome im Vordergrund.

Anders als beim Hund spielen benigne Mammatumoren, wie komplexe Adenome oder benigne Mischtumoren, bei der Katze kaum eine Rolle.

Die Fibroadenomatose, eine Besonderheit der Katze, die beim Hund nicht bekannt ist, ging aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu den Dysplasien nicht in diese Studie ein.

Es wurden bei der Klassifikation der Primärtumore der vorliegenden Untersuchung ausschließlich Adenokarzinome (72%) und solide Karzinome (28%) gefunden. In 4 Fällen konnte trotz Vorhandenseins eines metastasenpositiven Lymphknotens kein Primärtumor ermittelt werden. Dieser war entweder bereits in einer früheren Operation entfernt worden, oder der Primärtumor wurde nicht mit dem Lymphknoten zusammen zur Untersuchung eingesandt.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden bei den Adenokarzinomen mit abnehmender Häufigkeit tubuläre, papillär-zystische, alveoläre und papilläre Wuchsformen ermittelt.

Bei der Katze fehlten in dieser Untersuchung jedoch komplexe Adenokarzinome, wie sie beim Hund relativ häufig sind, völlig. Auch bei den soliden Karzinomen konnten keine komplexen Tumore gesehen werden.

Ebenso von untergeordneter Bedeutung sind bei der Katze die Sarkome und die malignen Mammamischtumoren.

Das Verteilungsspektrum der bösartigen Mammatumoren entspricht bei der Katze demnach wesentlich mehr demjenigen des Menschen als dem des Hundes (Misdorp und Weijer, 1980)

Bei der Morphologie der Primärtumore waren in Übereinstimmung mit der Literatur eine deutliche Nekroseneigung sowie infiltratives Wachstum und periphere Lymphozytenansammlung in über 65% der Fälle vorhanden (Weijer et al., 1972). Bei den Adenokarzinomen zeigten 54,5% solide Wachstumstendenzen, was insgesamt die Malignität dieser Tumore unterstreicht.

Für die Untersuchung der Lymphknoten auf das Vorhandensein von Metastasen gab es bisher für die Katze keine Möglichkeit, die ein sicheres, selektives Anfärben der Tumorzellen im Lymphknoten ermöglichte.

Die Vorversuche zur Ermittlung einer solchen Methode ergaben, daß die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper AE1 in Verbindung mit einer modifizierten BSA-Methode zum ersten Mal bei der Katze eine solche Möglichkeit bietet.

Mit dieser Methode wurden alle vorhandenen Tumorzellen sicher angefärbt, Unterschiede in der Intensität der Farbreaktion mögen durch ungünstige Fixationsmethoden und Lagerungszeit bedingt sein, die bei Archivmaterial bekanntermaßen eine Rolle spielen.

Der Antikörper CK 8/18/19 hingegen färbte unter allen Bedingungen nur sehr unzureichend. Die Ergebnisse von Ivanyi et al. (1992), die mehrere Antikörper an Mammakarzinomzelllinien der Katze getestet haben, lassen sich somit nicht bestätigen. Allerdings spielen auch hier, wie oben erwähnt, die unterschiedlichen Fixations-, Vorbereitungs- und Färbemethoden eine Rolle.

Bei der Auswertung der Lymphknotenpräparate fiel zunächst auf, daß im Gegensatz zu den Ergebnissen beim Hund (Busch, 1993), eine große Anzahl von Makrometastasen vorlag. Diese Lymphknoten waren sogar häufig in der Routinediagnostik nicht als solche erkannt worden, da sie nur noch in den Randgebieten Lymphknotengewebe zeigten und ansonsten völlig von Metastasen zerstört waren (s. Abb. 3, S.58). Im Gegenzug war die Zahl der metastasenfrenen Lymphknoten mit 34 % recht hoch.

Setzt man nun die Ergebnisse der Auswertungen der Primärtumore mit denen der Lymphknoten in Beziehung, so ergibt sich folgendes Metastasierungsverhalten der einzelnen Karzinomtypen:

Solide Karzinome, die auch zu 100 % infiltrativ wachsen, zeigten fast ausschließlich Makrometastasen in den betroffenen Lymphknoten, jedoch auch 2 (bei 13 soliden K.) metastasenfrenen Lymphknoten. Da die Zeit zwischen dem ersten Auftreten der Primärtumore und der operativen Entfernung des Tumors und der Lymphknoten nicht bekannt ist, ist es jedoch schwierig zu sagen,

inwieweit dieses Zeitintervall bei spät operierten Tieren zur Ausbildung der Makrometastasen beigetragen hat. Es ist jedoch eher anzunehmen, daß die soliden Karzinome durch ihr aggressives Wachstum sehr schnell metastasieren und die Zeit, in der ausschließlich Mikrometastasen und Tumorzellemboli auftreten, relativ kurz ist. Da die Anzahl der Makrometastasen ein Zeichen für die Malignität ist folgen die tubulären Adenokarzinome vor den papillären. Die größte Anzahl metastasenfrier Lymphknoten stellten die papillär-zystischen Adenokarzinome vor den alveolären, die jedoch in geringerer Anzahl vorkamen. Da auch infiltratives Wachstum und Nekroseneigung bei den alveolären Adenokarzinomen in geringerem Ausmaß vorkam, kann man annehmen, daß es sich bei dieser Wuchsform um die am wenigsten maligne handelt. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Annette Rathmann, bei denen sich bei der Untersuchung der Lymphangiosis karzinomatosa ein ähnliches Bild abzeichnet (Rathmann, 1998).

Wie bereits oben erwähnt, waren überdurchschnittlich viele Metastasen mit über 40.000 Zellen vorhanden, die sich in allen Fällen über alle Lokalisationen des Lymphknotens erstreckten und daher als Makrometastasen bezeichnet wurden. Ebenfalls zu dieser Gruppe zählten die Lymphknoten, in denen diffus über den gesamten Lymphknotenschnitt verteilt einzelne Metastasen von unterschiedlicher Größe vorlagen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß Tumore vom soliden und tubulären Typ am häufigsten metastasieren und wenn sie das tun, sehr schnell Makrometastasen entstehen, die eine weitere Ausbreitung des Tumors z. B. in die Lunge sehr wahrscheinlich erscheinen lassen. Diese Aussage wird unterstützt durch die Auswertung der Sektionsfälle, bei denen in 11 von 15 Fällen Lungenmetastasen auftraten, dabei entfielen 9 der 11 Fälle auf die Gruppe der soliden Karzinome und tubulären Adenokarzinome.

Tumore vom alveolären Typ metastasieren am wenigsten häufig.

Es finden sich entweder Makrometastasen oder die Lymphknoten sind metastasenfrier. Zwischenstufen mit ausschließlich Tumorzellemboli und Mikrometastasen, wie sie beim Hund sehr häufig vorkommen (Busch, 1993), findet man bei der Katze wahrscheinlich nur für eine sehr kurze Zeit.

Bei den metastasenfrieren Lymphknoten hingegen läßt die Wuchsform der Primärtumore, die ja fast ausschließlich infiltrativ wachsen und teilweise auch höchstmalignen Karzinomtypen angehören, den Schluß zu, daß hier die Tumorzellen den Lymphknoten "übersprungen" haben und sich bereits in anderen Organen, wie zum Beispiel der Lunge, angesiedelt haben. Laut Grundmann (1984) ist die Filtrationsleistung des Lymphknotens für Tumorzellen sehr gering und die Metastasierung im Lymphknoten ein im Vergleich zur zirkulierenden Krebszellzahl seltenes Phänomen. Bei den Sektionsfällen läßt sich diese These bestätigen, denn sowohl der Fall mit metastasenfrierem Lymphgewebe, als auch der einzige Fall mit einem metastasenfrieren Lymphknoten wiesen Lungenmetastasen auf.

Leider ist in der Retrospektive eine weitergehende Aufarbeitung der Daten der Einsendungen in diesem Punkt nicht möglich.

Bei der Untersuchung des Differenzierungsgrades der Metastasen waren die Metastasen erwartungsgemäß in fast allen Fällen gleich oder schlechter differenziert, als der Primärtumor. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die Tumorzellen, die in den Lymphknoten gelangen und dort durch Weiterteilung Metastasen bilden, zunächst im Vergleich zu den übrigen Zellen des Primärtumors entdifferenzieren. Dadurch sind sie in der Lage, sich aus dem Tumorzellverband zu lösen, und erlangen die Fähigkeit zur aktiven Lokomotion, die die Voraussetzung zur Invasion des Wirtsgewebes und der Gefäße darstellt (Gabbert, 1984). Gelangen diese Zellen nun auf diesem Wege in die regionären Lymphknoten und bilden dort Metastasen, sind diese in den meisten Fällen gleich oder schlechter differenziert als der ursprüngliche Primärtumor. Wächst der Primärtumor jedoch schneller als die Metastase, so kann es auch dazu kommen, daß der Primärtumor zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits schlechter differenziert ist, als die Metastase. Dies war in dieser Untersuchung jedoch nur bei einer sehr geringen Anzahl Tiere der Fall.

Die Auswertung der Regressionsneigung der Metastasen, bei denen in keinem Fall eine stärkere Regressionsneigung der Metastase gegenüber dem Primärtumor nachzuweisen war, zeigte, daß die Metastasen trotz geringerer Differenzierung nicht gleichermaßen zur Regression neigen.

Im Vergleich der immunhistochemischen Methode mit der Routinediagnostik zur Auffindung von Metastasen im Lymphknoten, lassen die bisher genannten Ergebnisse bereits vermuten, daß die immunhistochemische Methode der H.E. Färbung bei der Katze in den hier untersuchten Fällen nicht überlegen ist.

Bei der Größe der vorhandenen Metastasen ist es nicht verwunderlich, daß diese bereits in der H.E. Färbung als solche erkannt wurden. Lediglich das noch vorhandene Lymphgewebe trat bei der Immunfärbung durch den Farbkontrast zur Metastase deutlicher hervor, so daß der Nachweis eines noch vorhandenen Lymphknotenrestes teilweise erst eindeutig in der Immunfärbung gelang.

Bei den metastasenfreen Lymphknoten wurde nur in einem Fall eine Mikrometastase entdeckt, die in der Routinediagnostik nicht erkannt wurde. Dies war jedoch auch die einzige Mikrometastase aus unter 20 Zellen bestehend, die in dieser Studie vorkam.

Bei den Tumorzellemboli war das Ergebnis erwartungsgemäß anders. Die abweichende Beurteilung ist auf die Anzahl der Zellen zurückzuführen. Einzelzellen oder kleinere Zellverbände heben sich durch die Immunfärbung deutlich von der Umgebung ab und können so sicherer erkannt werden. Aber auch im umgekehrten Fall kann eine Zelle, die sich in der Immunfärbung bei sonst einheitlich starker Anfärbung nicht färbt, als Tumorzelle ausgeschlossen werden.

Insgesamt ist die Bedeutung der Tumorzellemboli bei der Katze jedoch gering, traten doch nur in einem Fall ausschließlich Tumorzellemboli im Lymphknoten auf, die für die Prognose von Bedeutung sein könnten. In allen übrigen Fällen waren sie zusätzlich zu einer Metastase vorhanden und daher diagnostisch von untergeordneter Bedeutung.

Ungewöhnlich war bei der Durchsicht des Archivmaterials die Entdeckung von Lymphaggregaten in der Umgebung eines Tumors.

Es handelt sich dabei um lymphknotenähnliche Strukturen, die aus Ansammlungen von Lymphozyten bestehen und sich im tumorperipheren Fettgewebe befinden, jedoch ohne Verbindung zum Tumor selbst. Sie sind von Gefäßen durchzogen, besitzen jedoch nicht die typische Lymphknotenstruktur von Rand-, Intermediär- und Marksinus. Auch die Bildung von Keimzentren konnte nicht beobachtet werden. Auffallend war, daß die Lymphozytenaggregate keine regelmäßige Form aufwiesen, sondern häufig von Fettgewebszellen durchsetzt waren.

In der Literatur wurde dieses Phänomen von Geppert et al. (1984) beschrieben. Diese Studie wurde an Patientinnen mit Brustkrebs durchgeführt, bei denen eine Lymphonodektomie der Axillarymphknoten stattgefunden hatte. Wie beim Mensch üblich wurden durchschnittlich 12 Lymphknoten pro Fall entfernt. Bei der Katze gibt es laut Vollmerhaus et al. (1997) je Seite nur einen Ln. axillaris proprius, sowie einen bis zwei Lnn. axillares accessorii. Auch bei den Inguinallymphknoten wurde bei der Katze nur ein Ln. inguinalis superficialis gefunden. Es ist daher unwahrscheinlich, daß es sich in der vorliegenden Untersuchung um konstant vorkommendes Lymphgewebe in den erwähnten Gebieten handelt.

Geppert et al. (1984) beobachteten, daß mit zunehmendem Lymphknotenbefall häufiger überdurchschnittlich viele Lymphknoten nachgewiesen wurden, als bei Fällen mit weniger befallenen Lymphknoten. Die Lymphknoten metastasierter Karzinomfälle waren größer als die von metastasenfremen Fällen. Sehr kleine Lymphknoten und solche mit fortgeschrittener Fettgewebsatrophie wurden häufiger bei den metastasenfremen Fällen nachgewiesen, und sie wiesen hochsignifikant seltener als größere Lymphknoten Metastasen auf. Besonders in diesem Punkt ließen sich die Ergebnisse von Geppert et al. (1984) in unserer Untersuchung bestätigen.

Es ist daher möglich, daß im Gegensatz zum Hund bei der Katze eine ähnliche Situation vorliegt, wie beim Mensch, nämlich daß eventuell mit zunehmender Stimulation des Immunsystems durch die Einschwemmung von Tumorzellen, neue Lymphknoten bzw. ähnliches Gewebe gebildet werden können. Dies würde durch die Tatsache unterstützt, daß in den kleinen, von Fettgewebe durchzogenen Lymphaggregaten weniger häufig Metastasen nachgewiesen werden konnten. Sollten sich diese erst im Laufe des Metastasierungsgeschehens bilden, so wäre es verständlich, wenn sie zuletzt von Metastasen befallen würden. Somit könnte dem Nachweis von Metastasen

in diesen kleinen Lymphansammlungen eine besondere prognostische ungünstige Bedeutung zukommen.

Eine weitere Untersuchung dieses Themenkomplexes wäre unter Einbeziehung postoperativer, bzw. den Krankheitsverlauf betreffender Daten wünschenswert, da ein Bezug auf die Prognose sehr interessant wäre. Aufgrund der relativ geringeren Inzidenzrate feliner Mammatumoren wird dies jedoch entsprechend zeiterfordernd sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Immunhistochemischer Nachweis von Tumormetastasen feliner Mammarkarzinome in den regionären Lymphknoten

In der Forschung auf dem Gebiet der Mammatumoren trat die Katze gegenüber dem Hund lange Zeit in den Hintergrund. Dem lag wohl unter anderem die geringere Inzidenzrate und demnach die schwierigere Verfügbarkeit von umfangreichem Probenmaterial zu Grunde.

Daher sollte mit Hilfe einer retrospektive Studie das biologische Verhalten feliner Mammatumoren genauer untersucht werden und gleichzeitig auch für die Katze ein geeigneter Antikörper zum immunhistochemischen Nachweis von Tumorzellen in Primärtumor und Lymphknoten gefunden werden, wie er in der Routinediagnostik beim Hund bereits eingesetzt wird.

Für diese Untersuchung standen zur Austestung der Antikörper zwei Katzen mit Mammatumoren und metastasenpositiven Lymphknoten zur Verfügung, die im April 1997 zur Sektion in das Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin gebracht wurden.

An ihnen wurde erstmalig bei der Katze durch verschiedene Testreihen ermittelt, daß der Antikörper AE1 der Firma Zymed, wenn er mittels einer modifizierten BSA-Methode angewendet wird, ein sicheres und intensives Anfärben von Tumorzellen sowohl im Primärtumor, als auch im Lymphknoten ermöglicht.

Es handelt sich hierbei um einen Zytokeratinantikörper, der die Gruppe der sauren Zytokeratine erfasst und bereits mit Erfolg in der Routinediagnostik beim caninen Mammarkarzinom eingesetzt wird.

Als Grundlage für die Färbung diente die Gebrauchsanleitung für Super Sensitive Nachweissysteme der Firma Biogenex, Hamburg.

Abweichend zu den dort angegebenen Schritten wurden die Schnitte nach der Entparaffinisierung durch Xylol und Aceton 10 Minuten mit dem Enzym Protease bei 37°C im Brutschrank vorverdaut und anschließend auf Cover plates aufgebracht und in den Sequenza verbracht (Walter 1999). Dort erfolgte eine Inkubation mit dem zuvor ausgetesteten Primärantikörper AE1 in der Verdünnung 1:1000, dem Link-Antikörper und dem Label-Antikörper. Die Einwirkzeit des Primärantikörpers wurde dabei gegenüber der des Link- und des Label-Antikörpers um 10 Minuten auf 30 Minuten verlängert. Die Sichtbarmachung des Antigen-Antikörperkomplexes gelang, ebenfalls nicht wie von der Firma empfohlen, am besten durch eine dreißigminütige Inkubation mit einer Fast-Red Lösung nach Walter (1999).

Die Gegenfärbung wurde, statt wie angegeben, mit Hämalaun und nicht mit Hämatoxylin durchgeführt.

Als Material für diese retrospektive Studie stand Archivmaterial der letzten 10 Jahre aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin zur Verfügung. Nachdem dies durchgesehen und teilweise wieder aufbereitet

worden war, blieben von 277 Katzen mit Mammatumoren 35 Fälle, die von 1992 - 1996 zur Tumor-Einsendung gelangt waren und 15 Fälle, bei denen von 1987 - 1996 Gewebeproben im Rahmen von Sektionen entnommen worden waren. Bei diesen insgesamt 50 Fällen wurde sowohl Tumorgewebe als auch Lymphknoten entdeckt. Insgesamt wurden bei 54 Lymphknoten je nach Größe aus bis zu 3 Ebenen jeweils 2 Serienschnitte entnommen.

Um einen Vergleich der immunhistochemischen Methode mit der üblichen Routinediagnostik aufgrund von H.E. Schnitten zu ermöglichen, wurde jeweils ein Schnitt jeder Ebene mit dem Antikörper AE 1 (Verdünnung 1:1000) mittels der modifizierten BSA-Methode, der zweite, in Serie entnommene Schnitt, mit H.E. gefärbt.

Bei der Klassifikation der Tumore wurden 72% einfache Adenokarzinome und 28% einfache solide Karzinome gefunden.

Bei der Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte ergab sich ein Anteil von 66 % metastasenpositiven Fällen, 31% dieser Fälle wiesen zusätzlich Tumorzellemboli auf. Nur ein einziger Fall wies ausschließlich Tumorzellemboli auf.

Die Bestimmung der Metastasengröße zeigte, daß die größte Gruppe mit 47% von den Metastasen aus "> 40.000 Zellen" gebildet wurde. Es folgte die Gruppe mit "20.000 - 40.000 Zellen" mit 20%, die Fälle, bei denen im Lymphknoten mehrere kleine Metastasen "diffus verteilt" waren, mit 17% und die Gruppe von "> 200 - 20.000 Zellen" mit 10%. Nur jeweils 1 Fall (3%) entfiel auf die Gruppen "bis 20" und "20 - 200 Zellen".

Das Metastasierungsverhalten der Karzinomtypen läßt erkennen, daß die meisten Makrometastasen bei den soliden Karzinomen vorkommen.

Bei den Adenokarzinomen zeigten die Tumore vom tubulären Typ die größte Anzahl Makrometastasen, die meisten metastasenfrenen Lymphknoten finden sich bei den papillär-zystischen Adenokarzinomen.

Der Differenzierungsgrad der Metastasen war zu nahezu gleichen Teilen geringer bzw. übereinstimmend mit dem Primärtumor. Nur in drei von 28 Fällen war die Metastase besser differenziert als der Primärtumor.

Interessant war das bei der Durchsicht der Mammatumoren auf das Vorhandensein von Lymphknoten entdeckte Lymphgewebe. Es zeigte keine typischen Lymphknotenstrukturen, wurde jedoch von Gefäßen durchzogen und lag durch Fettgewebe von dem Primärtumor getrennt, jedoch trotzdem in seiner Umgebung.

Dieses Gewebe wurde in 18% der Fälle entdeckt, in 10% der Fälle wurde ausschließlich Lymphgewebe und kein Lymphknoten gefunden. In zwei Fällen wiesen diese Lymphgewebe auch Metastasen auf.

Bei dem Vergleich der beiden Färbemethoden wurde deutlich, daß nur in einem Fall in der H.E. Färbung eine Mikrometastase aufgrund ihres geringen Durchmessers nicht erkannt worden war und somit eine Fehldiagnose gestellt wurde. Bei den Tumorzellemboli war das Verhältnis nicht erkannte zu übereinstimmend positiv beurteilte Lymphknoten 8:2. Da jedoch die Tumorzellemboli fast ausschließlich in Kombination mit Metastasen auftraten, war dies für die Gesamtbeurteilung des Falles ohne Belang.

Somit läßt sich sagen, daß der Zytokeratin-Antikörper AE1 die Mammakarzinomzellen bei der Katze auch im Lymphknoten zuverlässig anfärbt, und die modifizierte BSA- Methode hinsichtlich der Sensitivität der APAAP Methode überlegen ist.

Insgesamt gesehen ist die immunhistochemische Methode der H.E. Färbung bei den vorliegend untersuchten Fällen jedoch nur bedingt überlegen, da die bei der Katze zum Operationszeitpunkt bzw. Sektionszeitpunkt fast ausschließlich aufgetretenen Makrometastasen mühelos in der H.E. Färbung erkannt wurden. Die bei der Hündin vorkommende große Anzahl an Tumorzellemboli und Mikrometastasen ohne gleichzeitige Anwesenheit von Makrometastasen gibt es bei der Katze in dem vorliegenden Einsendegut nicht.

6. SUMMARY

Immunocytochemical detection of tumor metastases in the regional lymph nodes in feline mammary carcinoma

Concerning the investigation of mammary tumors the cat was for a long time of minor importance than the dog. Among other things the reason for it was probably the lower incidence rate and therefore the difficulty in gaining extensive test material.

By help of a retrospective study the biological behaviour of feline mammary carcinoma was now to be investigated more exactly. Another aim of the study was to find an adequate antibody for the immunocytochemical detection of tumor cells in the primary tumor as it is already used in the routine diagnostic in the dog.

The tissue used for testing the antibody belonged to two cats with mammary tumors and metastases-positive lymph nodes which were sent to the institute for veterinary pathology of the Free University of Berlin for dissection in April 1997. Varying tests on these tissues showed for the first time in the cat that the incubation with antibody AE1 (Zymed) prior to staining with a modified BSA method give best results in sensitivity and intensity in the primary tumor as well as in the lymph node.

This antibody reacts with the group of acid cytoceramins and is already used successfully in the routine diagnostic of canine mammary carcinoma.

Basis for the staining was the instruction guide for super sensitive detections systems of Biogenex, Hamburg.

Divergent to the recommend staining steps the slides were cleared of paraffin with Xylol and Aceton for 10 minutes, predigested with Protease at 37 °C and applied to cover plates in the sequenza (Walter 1999). After this the slides were incubated with the primary antibody AE1 (dilution 1:1000), the link- and the label antibody. The incubation time of the primary antibody was prolonged for 10 minutes up to 30 minutes compared to the link- and label antibody.

The staining of the antigen-antibody-complex was best after incubation with an own Fast Red solution (see p. 18 (Walter 1999)). The counterstaining was carried out with hämalaun and not as recommended with hämatoxylin.

For the retrospective study archive material of the past ten years from the institute for veterinary pathology of the Freie Universität Berlin was examined and reembedded in paraffin. Out of 277 cases with mammary tumors 35 samples were submitted for examination from 1991 - 1996 and 15 samples were taken from dissections from 1986 - 1996 contained tumor tissue as well as lymph nodes. Depending on the individual size of each of the entire 58 lymph nodes two serial sections each were taken from up to 3 levels of every node.

To compare the results of the immunocytochemical method with those of the routine diagnostic based on H.E. staining efficiently, the first section of every level was stained with the antibody AE 1 by means of the BSA method, the second section was stained with H.E..

At the classification of the tumors 72% simple adenocarcinomas and 28% simple solid carcinomas were found.

In 66% of the immunocytochemically stained cases lymph node metastases were detected, in 31% of the cases the lymph nodes contained tumor cell emboli. Only one single case showed tumor cell embolism exclusively .

The determination of the size of metastases showed, that in most cases (47%) metastases with "> 40,000 cells" were present, followed by the group of "20,000 - 40,000 cells" (20%), the cases in which metastases were "diffusely distributed" (17%) and the group of " > 200 - 20,000 cells" with 10%. One case (3%) only showed "-20 cells" and one "20-200 cells".

Comparing the metastasizing behaviour of different types of carcinoma, macrometastases mostly derived from solid carcinomas. Of the adenocarcinomas, the tubular type presented most macrometastases, the greatest number of metastases-free lymph nodes were found in the papillary cystic adenocarcinomas.

The discovery of lymphatic tissue during the examination of the mammary tumors was very interesting. It did not show typical lymph node structures but was penetrated by vessels and surrounded by fatty tissue.

This lymphatic tissue was found in 18% of all cases, in 10% of all cases had exclusively lymphatic tissue and no lymph node was present. 78% of these lymphatic tissue were free of metastases.

Comparing the two staining methods only one micrometastasis was not revealed in the H.E. staining. Concerning tumor cell embolism the relation between "false negative" and "correctly judged" lymph nodes was 8:2. As tumor cell embolism was found almost exclusively in combination with metastases, these results were not important for the judgement of the whole case.

Detection of mammary carcinoma cells in lymph nodes of the cat by the antibody AE1 is reliable. The modified BSA method is superior to the APAAP method.

In conclusion immunocytochemical method is not superior to the H.E. staining in the current cases, as, at the time of operation, most cats are suffering from macrometastases that can easily be detected by H.E. staining. The high incidence of tumor cell emboli and micrometastases in dogs is not found in the cat.

S-Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter	LK Nr.	met.frei LK HE	met.frei LK Im.	met.frei LG HE	met.frei LG Im.	Emboli HE	Emboli Imm.	Anzahl Met.
319/87	EKH	weiblich	12 J.	I	nein	nein	nein	nein	nein	nein	1
1083/ 87	EKH	weiblich	12 J.	II	nein	nein			nein	ja	1
1832/ 89	Karth. Mix	weiblich	11 J.	I	nein	nein			nein	nein	1
2056/ 90	EKH	weiblich	12 J.	I	nein	nein			nein	nein	2
42/92	EKH	weiblich	8 J.	I	nein	nein	ja	ja	nein	ja	2
425/92	EKH	weiblich- kastriert	12 J.	II	nein	nein			nein	nein	1
1911/ 92	EKH	weiblich- kastriert	13 J.	I	nein	nein	ja	ja	ja	ja	
1955/ 92	EKH	weiblich- kastriert		II	nein	nein			nein	nein	1
298/93	EKH	weiblich	17 J.	I	nein	nein	ja	ja	nein	nein	
206/95	EKH	weiblich	14 J.	I	nein	nein			ja	nein	1
368/95		weiblich	10 J.	I	ja	ja			nein	nein	
1465/ 95	EKH	weiblich- kastriert	9 J.				ja	ja	nein	nein	
559/96	EKH	weiblich	13 J.	I	nein	nein			nein	nein	1
716/96	EKH	weiblich	14 J.	I	nein	nein			nein	nein	1
1370/ 96	EKH	weiblich- kastriert	10 J.	I	nein	nein			nein	nein	1

S-Nr.	größte Met.	Lokalisation Immun.	Lokalisation HE	Diff. übereinst.	besser diff.	schlechter diff.	< regress.	Lungenmet.	Typ Met.	Typ PT
319/87	> 40.000	alle	alle	nein	nein	ja	nein	ja	solides K.	solides K.
1083/87	> 40.000	alle	alle	nein	nein	ja	nein	ja	solides K.	alveolär
1832/89	> 40.000	alle	alle	ja	nein	nein	nein	ja	solides K	solides K.
2056/90	> 200	Cortex, Paracortex, Randsinus, Interm.sinus	Cortex, Paracortex, Randsinus, Interm.sinus	ja	nein	nein	nein		papillär	papillär
42/92	20 - 200	Cortex, Randsinus	Cortex, Randsinus	ja	nein	nein	nein	ja	solides K.	solides K.
425/92	> 20.000	alle	alle	ja	nein	nein	nein	ja	tubulär	tubulär
1911/92	diffus durchsetzt			ja	nein	nein	nein		papillär	papillär
1955/92	> 20.000	alle	alle	nein	nein	ja	nein	ja	solides K.	solides K.
298/93	diffus durchsetzt			ja	nein	nein	nein	ja	solides K.	solides K.
206/95	> 20.000	alle	alle	ja	nein	nein	nein		solides K.	solides K.
368/95								ja		solides K.
1465/95								ja		
559/96	> 200	alle	alle	nein	nein	ja	nein	ja	solides K.	papillär
716/96	> 20.000	alle	alle	nein	ja	nein	nein		alveolär	solides K.

1370/ 96	> 200	alle	alle	nein	nein	ja	nein	ja	solides K.	tubulär
-------------	-------	------	------	------	------	----	------	----	------------	---------

E-Nr.	Rasse	Geschlecht	Alter	LK Nr.	met.frei LK HE	met.frei LK Im.	met.frei LG HE	met.frei LG Im.	Emboli HE	Emboli Imm.	Anzahl Met.	größte Met.
701/92				I	nein	nein			nein	ja	1	> 20.000
1119/ 92	EKH	weiblich	12 J	I	nein	nein			nein	nein	1	> 40.000
1958/ 92	EKH	weiblich	14 J.				nein	nein	nein	nein		
2835/ 92				I	ja	ja			nein	nein		
2950/ 92	EKH	weiblich- kastriert	12 J.	IV	ja	ja			nein	nein		
25/93	Perser	weiblich	6 J.	I	ja	ja						
233/93		weiblich	7 J.	I	ja	ja			nein	nein		
390/93	EKH	weiblich	7 J.	I	nein	nein	ja	ja	nein	nein	3	> 40.000
531/93				I			ja	ja	nein	nein		
949/93	EKH	weiblich- kastriert	14 J.	I	ja	ja			nein	nein		
1284/ 93	EKH	weiblich	14 J.	I	ja	ja			nein	nein		
1363/ 93	EKH	weiblich	17 J.	I	nein	nein			nein	nein	1	> 40.000

1409/ 93	Burma	weiblich- kastriert	6 J.	I	nein	nein	nein			nein	nein	1	> 40.000
1651/ 93	EKH	weiblich	13 J.			ja	ja		ja	nein	nein		
129/94		weiblich	14 J.	I	ja	nein				nein	nein	1	bis 20
1592/ 94	EKH	weiblich- kastriert	15 J.	II	nein	nein				nein	nein	1	> 40.000
2163/ 94		weiblich	10 J.				ja		ja	nein	ja		
2680/ 94		weiblich	11 J.	I	ja	ja				nein	nein		
381/ 95	EKH	weiblich	10 J.	I/I	nein	nein				nein	ja	1/1	>40.000/ >20.000
526/95	Perser- Mix	weiblich	11 J.	I	nein	nein				ja	ja		diffus durchsetzt
676/95	EKH	weiblich- kastriert	10 J.	I	nein	nein				nein	nein		diffus durchsetzt
710/95	EKH	weiblich	14 J.	I/I	nein	nein				nein	nein	3	> 40.000/ > 20.000
841/95	Perser	weiblich		I/II/III	nein	nein				nein	ja	1/1/0	> 20.000
995/95	EKH	weiblich- kastriert	12 J.	I	ja	ja				nein	nein		
1254/ 95				I	ja	ja				nein	nein		
1863/ 95		weiblich	14 J.	I	nein	nein				ja	nein	1	> 40.000

2002/ 95		weiblich- kastriert	15 J.	I	ja	ja			nein	nein		
2129/ 95	EKH	weiblich	9 J.	I	nein	nein			nein	nein	1	> 40.000
2820/ 95	EKH	weiblich	13 J.	I	ja	ja			nein	nein		
115/96	EKH	weiblich	9 J.	I	ja	ja			nein	nein		
273/96	EKH	weiblich	13 J.	I	nein	nein			ja	ja		diffus durchsetzt
713/96	EKH	weiblich	11 J.	I	nein	nein			nein	nein	1	> 40.000
737/96	EKH	weiblich		I	ja	ja			nein	nein		
1708/ 96	EKH	weiblich- kastriert	16 J.				ja	ja	nein	nein		
2159/ 96	EKH	weiblich- kastriert	14 J.	I	nein	nein			nein	ja		diffus durchsetzt

E-Nr.	Lokalisation Immun.	Lokalisation HE	Diff. übereinst.	besser diff.	schlechter diff.	< regress.	Lungen- metastas.	Typ Metasta.	Typ PT	Bemer- kungen
701/92	alle	alle	ja	nein	nein	ja		solides K.	solides K	
1119/ 92			nein	nein	ja	nein		tubuär, solide Anteile	tubuär	
1958/ 92								solides K.	tubuär	

129/94	Cortex		nein	nein	ja	ja		solides Karzinom	papillär-zystisch	kein PT
1592/94	alle	alle								
2163/94									solides Karzinom	
2680/94									alveolär	
381/95	alle	alle	ja	nein	nein	ja		tubulär, solide Anteile	tubulär	
526/95	Cortex	Cortex	ja	nein	nein	ja		solides Karzinom	solides Karzinom	Rezidiv
676/95	alle	alle	nein	ja	nein	nein			solides Karzinom	
710/95	alle	alle	nein	nein	ja	nein		solides Karzinom	papillär-zystisch	
841/95	alle	alle	nein	nein	ja	nein		solides Karzinom	papillär-zystisch	
995/95									papillär-zystisch	
1254/95									alveolär	
1863/95	alle	alle	ja	nein	nein	ja		solides Karzinom	solides Karzinom	

2002/ 95											tubulär	
2129/ 95	alle	alle	ja	nein	nein	nein	nein	nein	solides Karzinom	solides Karzinom	solides Karzinom	
2820/ 95											alveolär	
115/96											papillär- zystisch	
273/96	alle	alle	nein	ja	nein	nein	nein	nein	tubulär, solide Anteile	solides Karzinom		
713/96	alle	alle	nein	nein	ja	nein	ja	ja	solides Karzinom	tubulär		
737/96											alveolär	
1708/ 96											tubulär	
2159/ 96	alle	alle	ja	nein	nein	nein	nein	nein	alveolär	alveolär	alveolär	

E.: Einsendung; Diff.: Differenzierung; diff.: differenziert; HE: Hämatoxylin und Eosin; Im.: Immunfärbung; Imm.: Immunfärbung; Immun.: Immunfärbung; Interm.sinus: Intermediärsinus; J.: Jahre; K.: Karzinom; LG: Lymphgewebe; LK: Lymphknoten; Met.: Metastase; met.frei: metastasenfrei; Nr.: Nummer; PT: Primärtumor; regress.: regressiv; S: Sektion; übereinst.: übereinstimmend; weiblich-k.: weiblich-kastriert.

II. Bildteil

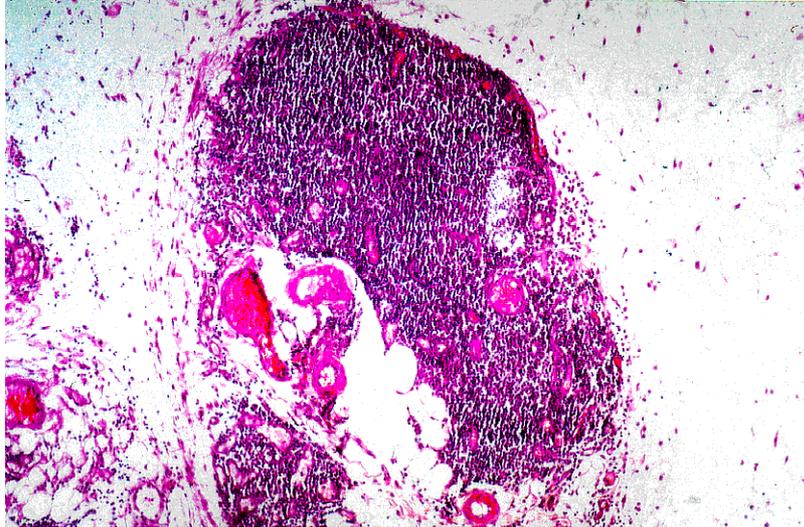


Abb. 1: Lymphgewebe in der Umgebung eines Tumors (H.E. Färbung, 100 fache Vergrößerung).

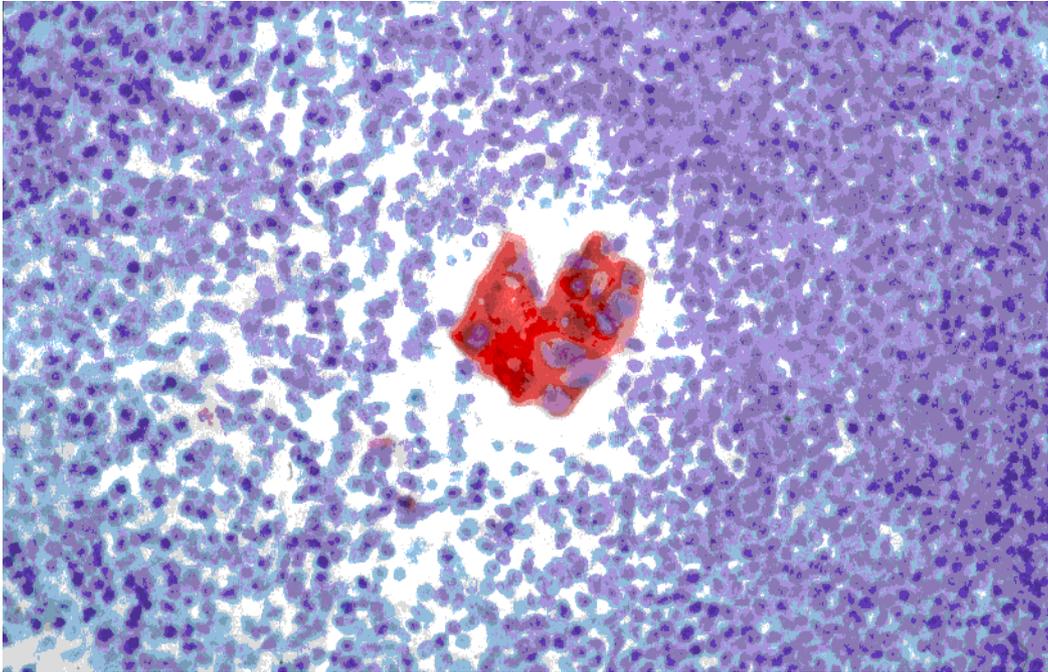


Abb. 2. Mikrometastase im Cortex eines Lymphknotens (Immunhistochemische Färbung unter Verwendung des Antikörpers AE1, modifizierte BSA-Methode, Gegenfärbung mit Hämalaun, 400 fache Vergrößerung).

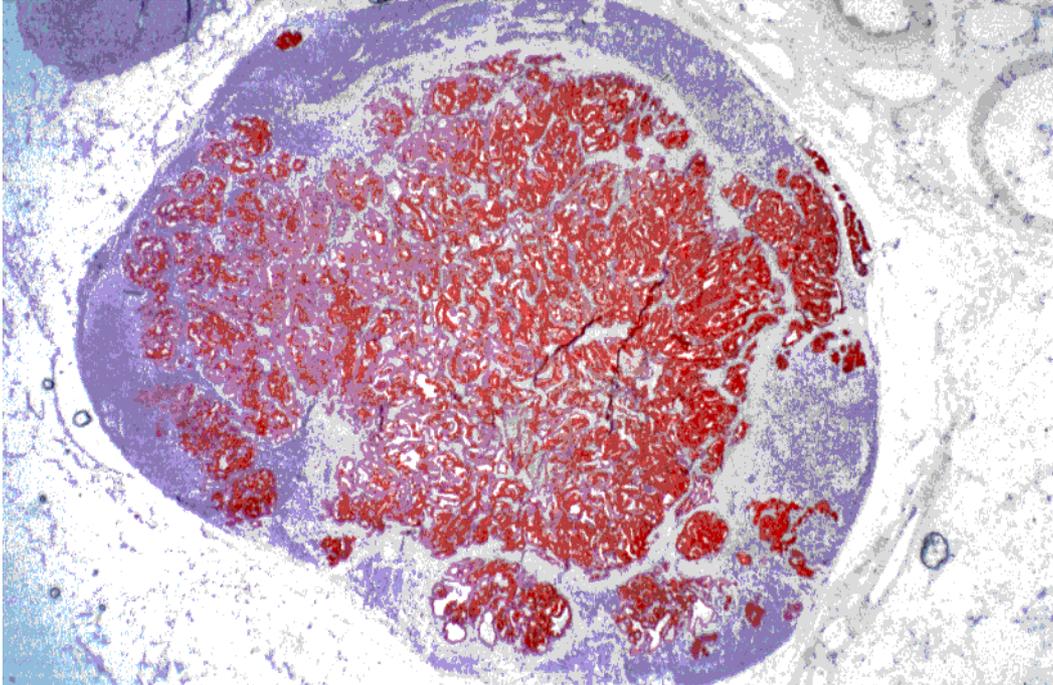


Abb. 3: Makrometastase - das Lymphknotengewebe wurde beinahe vollständig zerstört (Immunhistochemische Färbung unter Verwendung Antikörpers AE1, modifizierte BSA-Methode, Gegenfärbung mit Hämalaun, 25 fache Vergrößerung).

III. Abkürzungsverzeichnis

Alle Abkürzungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, werden im folgenden alphabetisch aufgelistet:

A.:	Adenokarzinom
Abb.:	Abbildung
Adka:	Adenokarzinom
AK:	Antikörper
alv.	alveolär
APAAP:	Alkalische - Phosphatase - Anti-Alkalische - Phosphatase
BSA:	Biotin-Streptavidin
CK:	Cytokeratin
diff.:	differenziert
E-Fälle:	Einsendungs-Fälle
ENR:	Einsendungsnummer
HCL:	Hydrochlorid
H.E.:	Hämatoxylin Eosin
Immun.:	Immunfärbung
K.:	Karzinome
Kap.:	Kapitel
kd:	kilodalton
Lc.:	Lymphocentrum
LG:	Lymphgewebe
LK:	Lymphknoten
Ln.:	Lymphonodus
Lnn.:	Lymphonoduli
Met.:	Metastase(n)
met.frei:	metastasenfrei
Mikromet.:	Mikrometastase
Makromet.:	Makrometastase
MG:	Molekulargewicht
µl:	microliter
µm:	micrometer
NaCl:	Natriumchlorid
pap.:	papillär
pap.-zyst.:	papillär-zystisch
PT:	Primärtumor
RPMI-Puffer:	Royal-Park-Memoria-Institute-Puffer
S-Fälle:	Sektionsfälle
SNR:	Sektionsnummer
s.S.:	siehe Seite
TBS:	Tri-buffer-saline

tub.:
WHO:

tubulär
World Health Organisation

8. LITERATURVERZEICHNIS

Altmannsberger, M. (1988). Intermediärfilamentproteine als Marker in der Tumordiagnostik. Stuttgart, New York, Fischer.

Altmannsberger, M., Osborn, M., Heise, E., Dirk, T., Droese, M. (1985). Cytokeratine in Mammacarcinomen. Verh. Dtsch. Ges. Pathol. **69**: 204-205.

Altmannsberger, M., Osborn, M., Schauer, A., Weber, K. (1981a). Antibodies to different intermediate filament proteins. Lab. Invest. **45 (5)**: 427-443.

Altmannsberger, M., Osborn, M., Weber, K., Hilscher, A., Schauer, A. (1981b). The distribution of keratin type intermediate filaments in human breast cancer. Virchows Arch. (B) **37**: 277-284.

Apostolikas, N., Petraki, C., Agnantis, N. (1989). The reliability of histologically negative axillary lymph nodes in breast cancer. Path. Res. Pract. **184**: 35-38.

Bartek, J., Vojtesek, B., Bartkova, J., Kerekes, Z., Rejthar, A. (1991). A series of 14 new monoclonal antibodies to keratins: charakterization and value in diagnostic histopathology. Journal of Pathology **164**: 215-224.

Battifora, H. (1988). The biology of the keratins and their diagnostic applications. New York, De Lellis, RA. (Hrsg.).

Battifora, H., Kopinski, M. (1986). The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. Histochem. Cytochem. **34**: 1095-1100.

Boenisch, T. (1989). Handbuch II Immunchemischer Färbemethoden. Naish, S., Dako Corporation: 22-27.

Bosse, U., Schmitz, F.-J. (1985). Immunhistochemische Diagnostik des klinisch und mammographisch occulteren metastasierten Mamma-Carcinoms. Verh. Dtsch. Ges. Pathol. **69**: 485.

Brodey, R. S. (1969). Canine and feline neoplasms. Adv. Vet. Sci. **24**: 309-354.

Busch, U. (1993). Immunhistochemischer Nachweis von okkulteren

Mikrometastasen in den regionären Lymphknoten beim kaninen Mammakarzinom sowie eine postoperative Studie am Mammakarzinom operierter Hündinnen. Dissertation, Freie Universität Berlin.

Busch, U., Rudolph, R. (1995). Mammakarzinom der Hündin: Eine neue Routinediagnostik zum Nachweis okkultter Mikrometastasen in den regionären Lymphknoten.
Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **108**: 43-46.

Bussolati, G., Gugliotta, P., Morra, I., Pietribasi, F., Berardengo, E. (1986). The immunohistochemical detection of lymph node metastases from infiltrating lobular carcinoma of the breast.
Br. J. Cancer **54**: 631-636.

Chaiet, L., Wolf, F.J. (1964). The properties of streptavidin, a biotin.binding protein produced by streptomyces.
Arch. Biochem. Biophys. **106**: 1-5.

Chen, Z., Perez, S., Holmes, E., Wang, H., Coulson, W. (1993). Frequency and distribution of occult micrometastases in lymph nodes of patients with non-small-cell lung carcinoma.
Nat. Cancer Instit. **85(6)**: 493-498.

Cooper, D., Schermer, A., Pruss, R., Sun, T.-T. (1985). The use of aIF, AE1, and AE3 monoclonal antibodies for the identification and classification of mammalian epithel keratins.
Different **28**: 30-35.

Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z. (1984). Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes).
Histochem. Cytochem. **32(2)**: 219-229.

Cotchin, E. (1957). Neoplasia in the cat.
Vet. record **69**: 425-434.

Curran, R. C., Gregory, J. (1977). The unmasking of antigens in paraffin sections of tissue by trypsin.
Experientia (Basel) **33**: 1400.

Davidoff, M. S., Schulze, W., Holstein, A. F. (1991). Combination of alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP)- and avidin-biotin-alkaline

phosphatase complex (ABAP)-techniques for amplification of immunocytochemical staining of human testicular tissue. *Andrologia* **23**: 353-356.

de Mascarel, I., Bonichon, F., Coindre, J.M., Trojani, M. (1992). Prognostic significance of breast cancer axillary lymph node micrometastases assessed by two special techniques: reevaluation with longer follow-up. *Br. J. cancer* **66**: 523-527.

Denk, H. (1986). Morphologische Nachweismethoden: Methodisches Spektrum (Prinzipien, Mechanismen und Wertigkeit). *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **70**: 18-27.

Dorn, C. R., Taylor, D. O., Schneider, R., Hibbard, H. H., Klauber, M. R. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute* **40**: 307-318.

Duhm, B. (1990). Darstellung von Intermediärfilamenten mit Hilfe der APAAP-Methode. *mta* **5**: 15-19.

Erlanson, R. (1984). Diagnostic immunohistochemistry of human tumors. An interim evaluation. Editorial. *Am. J. Surg. Path.* **8 (8)**: 615-624.

Fisher, B., Bauer, M., Wickerham, D., Redmond, C. und Fisher, E. (1983). Relation of number of positive nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. *Cancer* **52**: 1551-1557.

Fisher, E., Swamidoss, S., Lee, C., Rockette, H., Redmond, C., Fisher, B. (1978a). Detection and significance of occult axillary node metastases in patients with invasive breast cancer. *Cancer* **42**: 2025-2031.

Fisher, E., Palekar, A., Rockette, H., Redmond, C., Fisher, B. (1978b). Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast project (protocol No.4). *Cancer* **42**: 2032-2038.

Frese, K., Durchfeld, B., Eskens, U. (1989). Klassifikation und biologisches Verhalten der Haut- und Mammatumoren von Hund und Katze. *Der praktische Tierarzt* **70**: 69-84.

Friedmann, S., Bertin, F., Mouriessse, H., Benchabat, A., Genin, J. (1988). Importance of tumor cells in axillary node sinus margins ("clandestine" metastases) discovered by serial sectioning in operable breast carcinoma. *Acta Oncol.* **27**: 483-487.

Gabbert, H. (1984). Invasionsmechanismen maligner Tumoren. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **68**: 18-32.

Galea, M., Athanassiou, E., Bell, J., Dilks, B., Robertson, J. (1991). Occult regional lymph node metastases from breast carcinoma: Immunohistological detection with antibodies CAM 5.2 and NCRC-11. *J. Pathol.* **165**: 221-227.

Geppert, M., Pawlowski, Z., Beinhofer, R. (1984). Zur Frage der Relevanz histologischer Befunde an axillären Lymphknoten beim Mammkarzinom. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **68**: 272-275.

Gown, A., Vogel, A. (1985). Monoclonal antibodies to intermediate filament proteins. III. Analysis of tumours. *Am. J. Clin. Pathol.* **84**: 413-424.

Group, I. L. B. C. S. (1990). Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancer. *Lancet* **335**: 1565-1568.

Grundmann, E. (1984). Die lymphogene Metastasierung. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **68**: 33-46.

Gutberlet, K. (1994). Mammatumoren bei Hunden: Immunhistochemische Darstellung von Gefäßendothel bei Krebszelleinbrüchen und Überarbeitung der WHO-Klassifikation. Dissertation, Freie Universität Berlin.

Hahn, K., Adams, W. (1997). Feline mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis and treatment alternatives. *Feline practice* **25**: 2, 5-11.

Hampe, J. F., Misdorp, W. (1974). Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bulletin of the World Health Organization* **50**: 114-133.

Hayden, D. W., Nielsen, S. W. (1971). Feline mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice* **12**: 687-697.

- Hayes, A., Mooney, S. (1985). Feline mammary tumors. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* **15**(3): 513-520.
- Hayes, H. M., Milne, K. L., Mandell, C. P. (1981). Epidemiological features of feline mammary carcinoma. *Veterinary Record* **108**: 476-479.
- Itoh, T., Kadosawa, T., Mochizuki, M., Matsunaga, S., Nishimura, R., Sasaki, N. (1996). Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. *Journal of Vet. Med. Science* **58**(8): 723-726.
- Ivanyi, D., Minke, J. M. H. M., Hageman, P. C., Groeneveld, E., Doornewaard van, G. (1992). Patterns of expression of feline cytokeratins in healthy epithelia and mammary carcinoma cells. *American Journal of Veterinary Research* **53**(3): 304-314.
- Ivanyi, D., Minke, J. M. H. M., Hageman, P. C., Groeneveld, E., Doornewaard van, G. (1993). Cytokeratins as markers of initial stages of squamous metaplasia in feline mammary carcinomas. *American Journal of Veterinary Research* **54**(7): 1095-1102.
- Kessler, M., von Bomhard, D. (1997). Mammatumoren bei Katzen - Eine Auswertung von 2386 Fällen (1990 - 1995). *Kleintierpraxis* **42**(6): 459-465.
- Kraft, W. und Danckert, D. (1997). Entwicklungstendenz des Lebensalters einer Katzenpopulation. *Kleintierpraxis* **42**: 21-28.
- Lobeck, H. (1990). Orthologie und Pathologie der Zytokeratine. Habilitation. Freie Universität Berlin.
- MacEwen, E. G., Hayes, A. A., Harvey, H. J., Patnaik, A. K., Mooney, S. (1984). Prognostic factors for feline mammary tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **185**(2): 201-204.
- Mac Masters, K. M., Giuliano, A. E., Ross, M. I., Reintgen, D. S., Hunt, K. K. (1998). Sentinel lymph node Biopsy for breast cancer - not yet the standard of care. *New England Journal of Medicine* **339,2**: 990 - 995.
- MacVean, D. W., Monlux, A. W., Anderson Jr., P. S., Silberg, S. L. und Roszel, F. J. (1978). Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Veterinary Pathology* **15**: 700-715.

Makin, C., Bobrow, L., Bodmer, W. (1984). Monoclonal antibody to cytokeratin for use in routine histopathology.
J. Clin. Pathol. **37**: 975-983.

Miettinen, M. (1989). Immunostaining of intermediate filament proteins in paraffin sections. Evaluation of optimal protease treatment to improve the immunoreactivity.
Path. res. Pract. **184**: 431-436.

Miettinen, M., Lehto, V., Virtanen, I. (1984). Antibodies to intermediate filament proteins in the diagnosis and classification of human tumors.
Ultrastruct. Pathol. **7**: 83-107.

Misdorp, W. (1964). Malignant mammary tumors in the dog and the cat compared with the same in the woman. Thesis. Utrecht.

Misdorp, W., Romijn, A. und Hart, A. A. M. (1992). Over de betekenis van ovariectomie en progestativa voor het ontstaan van het mammacarcinoom bij de kat (The significance of ovariectomy and progestogens in the development of mammary carcinoma in the cat).
Tijdschrift voor Diergeneeskunde **117**: 2-4.

Misdorp, W., Weijer, K. (1980). Animal model of human disease: breast cancer. Animal model: feline mammary carcinoma.
Am. J. Pathol. **98**: 573-576.

Moll, R. (1986). Epitheliale Tumormarker.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. **70**: 28-50.

Moore, A. S., Madewell, B. R., Lund, J. K. (1989). Immunohistochemical evaluation of intermediate filament expression in canine and feline neoplasms.
Am. J. Vet. Res. **50**(1): 88-92.

Muijen, G. v., Ruiters, D., Ponc, M., Mey, C. v. d., Warnaar, S. (1984). Monoclonal antibodies with different specificities against cytokeratins. An immunohistochemical study of normal tissues and tumors.
Am. J. Path. **114**: 9-15.

Muleya, JS., Nakaichi, M., Sugahara, J., Taura, Y., Murata, T., Nakama, S. (1998). Establishment and characterisation of a new cell line derived from feline mammary tumor.
Journal of Vet. Med. Science **60**(8): 931-935.

Naritoku, W. Y., Taylor, C. R. (1982). A comparative study of the use of monoclonal antibodies using three different immunohistochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.* **30**: 253-260.

Nielsen, S. W. (1952). The malignancy of mammary tumours in cats. *North American Veterinary April*: 245-252.

Osborn, M. (1984). Summary: Intermediate filaments 1984. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **455**: 669-681.

Osborn, M., Weber, K. (1982). Intermediate filaments: Cell-type-specific markers in differentiation and pathology. *Cell* **31**: 303-306.

Osborn, M., Weber, K. (1983). Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab. Invest.* **48**: 372-394.

Ostertag, R. (1999). pers. Mittlg.

Pickren, J. (1961). Significance of occult metastases. *Cancer* **14 (6)**: 1266-1271.

Pinkus, G., O'Connor, E., Ethridge, C., Corson, J. (1985). Optimal immunoreactivity of keratin proteins in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue requires preliminary trypsination. *Histochem. Cytochem.* **33**: 465-473.

Quinlan, R., Schiller, D., Hatzfeld, M., Achtstätter, T., Moll, R. (1984). Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann. New York Acad. Sci.* **455**: 282-306.

Rathmann, A. (1998). pers. Mittlg.

Ronay, G., A., T., Tulusan, A. (1989). Mikrometastasen in axillären Lymphknoten beim Mammakarzinom. Eine immunhistochemische Untersuchung. *Pathologe* **10 (5)**: 289-293.

Rosen, P., Saigo, P., Braun, D., Weathers, E., Fracchia, A. (1981). Axillary micro- and macrometastases in breast cancer. *Ann. Surg.* **194**: 585-590.

Sandusky, G., Wightman, K., Carlton, W. (1991). Immunocytochemical study of tissues from clinically normal dogs and of neoplasms, using keratin monoclonal antibodies.

Am. J. Vet. Res. **52**(4): 613 - 618.

Schmidt, R. E., Langham, R. F. (1967). A survey of feline neoplasms.

J. Am. Vet. Med. Assoc. **151**: 1325-1328.

Simon, D., Nolte, I. (1997). Mammatumoren bei der Katze - Prognose und Therapie.

Praktische Tierarzt **78**: SONDER, 22-25.

Sorenson, S., Asch, B., Conolly, J., Burstein, N., Asch, H. (1987).

Structural distinctions among human breast epithelial cells revealed by the monoclonal antikeratin antibodies AE1 and AE3.

J. Pathol. **153** (2): 151-162.

Steinert, P., Steven, A., Roop, D. (1985). The molecular biology of intermediate filaments.

Cell **42**: 411-419.

Stosiek, P., Kasper, M., Karsten, U., Goertchen, R. (1991). Detection of cancer metastases in regional lymph nodes: comparative histological and immunohistological investigation with the broad range anticytokeratin monoclonal antibody A45-B/B3.

Neoplasma **38** (1): 43-47.

Straw, R. C. (1997). Surgical oncology principles. 43. Jahrestagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fachgruppe Kleintierkrankheiten, Hannover.

Stünzi, H. (1967). Krebsstatistik bei Katzen.

Schweizer Archiv für Tierheilkunde **109**: 1-8.

Tomlinson, M. J., Barteaux, L., Ferns, L. E., Angelopoulos, E. (1984). Feline mammary carcinoma: A retrospective evaluation of 17 cases.

Canadian Veterinary Journal **25**: 435-439.

Trojani, M., de Mascarel, D., Bonichon, F., Coindre, J., Delsol, G. (1987a). Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of the breast:

detection by immunochemistry and prognostic significance.

Br. J. Cancer **55**: 303-306.

- Trojani, M., de Mascarel, D., Bonichon, F., Coindre, J. (1987b).
Micrometastases to axillary lymph nodes from invasive lobular carcinoma of the breast: detection by immunocytochemistry and prognostic significance.
Br. J. Cancer **56**: 838-839.
- Tsuchiya, A., Sugano, K., Kimijima, I., Abe, R. (1996). Immunohistochemical evaluation of lymph node micrometastases from breast cancer.
Acta Oncologica **35**(4): 425-428.
- Überreiter, O. (1968a). Klinische Ergebnisse bei Geschwülsten der Mamma bei Hund und Katze.
Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B **15**: 116-123.
- Überreiter, O. (1968b). Die Tumoren der Mamma bei Hund und Katze.
Wiener Tierärztliche Monatsschrift **55**: 415-442.
- Virtanen, I., Miettinen, M., Lehto, V. (1984). Diagnostic application of monoclonal antibodies to intermediate filaments.
Ann. N.Y. Acad. Sci. **455**: 635-647.
- Vollmerhaus, B., Roos, H., Meier, A. (1997). Über die regionären Lymphknoten des Gesäuges der Hauskatze - eine summative Studie.
Kleintierpraxis **42**: 221-229.
- Walter (1998). pers. Mittlg.
- Walter, J. (1999). Epikrise epithelialer Neoplasien beim Hund
Epidemiologische, biochemische und immunhistochemische Untersuchungen.
Habilitation. Freie Universität Berlin.
- Weijer, K. (1979). Feline mammary tumors and dysplasias. Rotterdam,
University of Rotterdam.
- Weijer, K., Hart, A. A. M. (1983). Prognostic factors in feline mammary carcinoma.
Journal of the National Cancer Institute **70**(4): 709-716.
- Weijer, K., Head, K. W., Misdorp, W., Hampe, J. F. (1972). Feline malignant mammary tumors. I. Morphology and biology: some comparisons with human and canine mammary carcinomas.
Journal of the National Cancer Institute **49**(6): 1697-1704.
- Wells, C., Heryet, A., Brochier, J., Gatter, K., Mason, D. (1984). The immunocytochemical detection of axillary micrometastases in breast cancer.

Br. J. Cancer **50**: 193-197.

Wilkinson, E., Hause, L. (1974). Probability in lymph node sectioning.
Cancer **33**: 1269-1274.

Woods, G. S., Warnke, R. (1981). Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection system.
J. Cytochem. Histochem. **29 (10)**: 1196-1204.

LEBENS LAUF

Name	Jana Epping
Geburtsdatum	13. Juli 1970
Geburtsort	Greven
Eltern	Dr. Werner Epping, Arzt Monika Epping, Hausfrau

Ausbildung

1976 - 1880	Grundschule Wentorf
1980 - 1989	Gymnasium Wentorf
1989 - 1991	Ausbildung zur Pharmazeutisch-technischen Assistentin
1991 - 1997	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
Februar 1997	Abschluß der Tierärztlichen Prüfung
April 1997	Approbation als Tierärztin

Berufstätigkeit

Seit April 1997	Durchführung der Arbeiten zur Dissertation am Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin
Seit April 1998	Assistentin an der Kleintierklinik Dr. Ursula Zips-Weber in Kirchen/Sieg

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. R. Rudolph für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte geduldige Unterstützung und Beratung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Kathrin Gutberlet bedanken, die, wenn immer es ihr möglich war, Zeit für klärende und lehrreiche Gespräche gefunden hat, sowie bei Dr. Jakob Walter für die Unterstützung bei computertechnischen Problemen.

Außerdem hatten die Gespräche, sowie die Anteilnahme der Mitarbeiter und Doktoranden des Instituts für Veterinärpathologie, einen wichtigen Anteil am Gelingen dieser Arbeit, hier danke ich insbesondere Annette Rathmann, Andrea Golombiewski und Ute Schulden.

Der herzlichste Dank geht jedoch an meine Eltern, meine Familie und meine Freunde, deren persönliche und fachliche Unterstützung unersetzbar war.

Hiermit erkläre ich, daß ich alle Hilfsmittel und Hilfen angegeben habe und versichere, auf dieser Grundlage die Arbeit selbständig verfaßt zu haben. Die Arbeit ist nicht schon einmal in einem früheren Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt worden.