

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Allgemeines zur Milchdrüse, Mamma

Die Milchdrüse (Mamma) differenziert sich aus der Epidermis, einem Abkömmling des Ektoderms und wird nach BUDRAS und FRICKE (2000) den Hautdrüsen, nach WIESNER und RIBBEK (2000) den spezialisierten Hautorganen zugeordnet.

Nach SCHNORR (1996) ist es strittig, ob sie sich von den Schweißdrüsen, Talgdrüsen oder Haarfollikelanlagen ableiten lässt. DAHME und WEISS (1999) und SMOLLICH (1992) sind sich einig, dass es sich um eine modifizierte apokrine Hautdrüse handelt, die in den Dienst der Nachwuchsaufzucht getreten ist. Auch KOCH und BERG (1993), BUDRAS und FRICKE (2000), NICKEL et al. (1984) und LIEBICH (1993) betrachten sie als modifizierte Schweißdrüse, wobei BUDRAS (1992) die Begründung im identischen Entwicklungsmodus der beiden Drüsen sieht. KOCH und BERG (1993) führen weitergehend den Vergleich zu den primitiven Säugern an, die, ähnlich wie heute noch das eierlegende Schnabeltier, ihre Jungen durch das Sekret von Schweißdrüsen ernährten, die, meist in der Inguinalregion, auf bestimmte Areale zusammengedrängt, von den Jungtieren regelmäßig abgeleckt wurden. Erst später im Laufe der entwicklungsgeschichtlichen Differenzierung der Mamma treten die Drüsenmündungen auf der Höhe eines warzenartigen Gebildes zusammen, das dann als Zitze (Papilla mammae) bezeichnet wird (KOCH und BERG 1993).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Organen erreicht die Milchdrüse ihre volle Entfaltung bis zur Funktionsreife erst verhältnismäßig spät, nach der Pubertät, und zwar nur beim weiblichen Geschlecht und nur unter den besonderen Bedingungen der Gravidität (SMOLLICH und MICHEL 1993). Es werden zwar bei beiden Geschlechtern Mammakomplexe angelegt, jedoch kommen sie bei den männlichen Individuen aufgrund fehlender hormoneller Stimulation nicht zur Entwicklung, so dass sie hier lediglich jeweils aus einer Zitze mit rudimentärer Drüsenanlage bestehen (KOCH und BERG 1993). Jedoch können diese durch hormonelle Stimulation (paradoxe Hormongaben, Hormon produzierende Tumoren) auch zum Wachstum angeregt werden. In einigen seltenen Fällen können sie auch beim Rüden tatsächlich tumorös entarten. Rüden stellen nach BRODEY et al. (1983) und GOTTWALD (1998) maximal 1 % der Tumorträger dar. Bei der Hündin hingegen sind die Tumoren der Mamma die häufigsten Neoplasien (FERGUSON 1985; NERURKAR et al. 1989; MOULTON 1990; RUTTEMAN 2000; RUTTEMAN, WITHROW und MACEWEN 2001; MORRISON 2002).

## 2.2. Anatomie

### Aufbau

Als Milchdrüse wird im engeren Sinne jede Milchdrüseneinheit (Mammakomplex), die sich aus einem Drüsenkörper (Corpus mammae) und zugehöriger Zitze (Papilla mammae) zusammensetzt, verstanden. Der Begriff Milchdrüse bezeichnet, im weiteren Sinne gebraucht, die gesamte bei einer Tierart vorkommende Anzahl von Mammakomplexen. So besitzt der Hund nach EVANS (1993) und BUDRAS und FRICKE (2000) in der Regel jeweils 5 Mammakomplexe (seltener 4 oder 6) beiderseits der ventralen Medianlinie, die in ihrer Gesamtheit bei den Fleischfressern ebenfalls als Gesäuge bezeichnet werden. Die Milchdrüse stellt also ein bilateral symmetrisches, an der ventralen Rumpfwand, beim Hund thorakoinguinal, aufgehängtes Organ dar, zur Hälfte links und rechts der Medianen gelegen (NICKEL et al. 1984). KOCH und BERG (1993) und BUDRAS (2000) bezeichnen die Paare der Mammakomplexe entsprechend ihrer Lokalisation als thorakal cranial, thorakal caudal, abdominal cranial, abdominal caudal sowie inguinal. EVANS (1993) stellt des weiteren fest, dass im Größenvergleich die vier thorakalen Komplexe die kleinsten, die zwei inguinalen die größten und die vier abdominalen von mittlerer Größe sind. Die Haut des Gesäuges und die Zitzenbasis sind fein behaart, die Zitze selbst nicht. Ausgestattet sind diese feinen Haare mit kleinen Talgdrüsen und apokrinen Schlauchdrüsen. Auch TURNER (1939) fand an der Zitzenbasis Schweißdrüsen.

### Blutgefäßversorgung

Die arterielle Blutversorgung der thorakalen Mammakomplexe erfolgt über die Rr. perforantes der A. thoracica interna sowie der Aa. intercostales. Zudem werden die hinteren thorakalen und die vorderen abdominalen Gesäugeabschnitte von den Rr. mammarii der A. epigastrica cranialis superficialis versorgt. Die abdominalen und inguinalen Mammakomplexe werden durch die A. pudenda externa (EVANS 1993), die auch den oberflächlichen Inguinallymphknoten (Ln. inguinalis superficialis) vaskularisiert, mit Blut versorgt.

Die Venen verlaufen annähernd parallel dazu. Die Hauptgefäße der venösen Entsorgung des Gesäuges sind die Vv. pudendae externae und die Vv. epigastricae craniales superficiales (NICKEL et al. 1984). Erst genannte führen das venöse Blut der inguinalen, caudalen abdominalen und von Teilen der cranialen abdominalen Mammakomplexe ab, während das venöse Blut des cranialen abdominalen sowie auch der thorakalen Mammakomplexe über die Vv. epigastrica craniales superficiales abfließt. Venovenöse Anastomosen sind zahlreich vorhanden.

### Lymphatische Drainage des Gesäuges

Jeder Mammakomplex hat seine eigenen Lymphkapillarnetze, welche durch Anastomosen die Basis der Zitze umgeben. Diese lymphatischen Plexus sind im Parenchym, in der Subcutis

und in der Zitze zu finden. Gewöhnlich verlassen ein bis drei Hauptgefäße die glandulären Plexus und führen oberflächlich zum nächstliegenden Lymphknoten (EVANS 1993). Die Untersuchungen von SAUTET et al. (1992) ergaben das folgend dargestellte Schema der Lymphdrainage der einzelnen Mammakomplexe: Während der craniale thorakale und der inguinale Mammakomplex ihre Lymphe ausschließlich über den ihnen nächstliegenden Lymphknoten ihrer Seite entsorgen, und zwar erstgenannter über den axillären Lymphknoten und letztgenannter über den Lymphonodus inguinalis superficialis, sind bei dem caudalen thorakalen, dem cranialen und dem caudalen abdominalen Mammakomplex ein Lymphabfluss zum axillären sowie oberflächlichen inguinalen Lymphknoten nachweisbar. Des Weiteren wurde ein Abfluss der Lymphe der beiden thorakalen und des cranialen abdominalen Mammakomplexen zu den cranialen sternalen Lymphknoten dargestellt (SAUTET et al. 1992; STALKER und SCHLOTTHAUER 1936).

Interglanduläre Verbindungen der Lymphgefäßsysteme der einzelnen Mammakomplexe wurden zum einen zwischen den caudalen thorakalen und den cranialen, sowie caudalen abdominalen Mammakomplexen beschrieben. Die Verbindungen zwischen den cranialen und caudalen abdominalen Mammakomplex sollen plexiform sein. Es ist anzumerken, dass die anatomische Ausbildung dieser lymphatischen Drainagewege bei den einzelnen Hündinnen eine hohe Variabilität aufweist.

Zwischen den Milchleisten der beiden Körperseiten bestehen keine Anastomosen, d.h. sie haben keine lymphatische Verbindung (SAUTET et al. 1992; PATSIKAS und DISSIRIS 1996a).

### **Innervation**

Die sensible Nervenversorgung übernehmen cranial die Nn. interkostales und caudal die Nn. iliohypogastricus cranialis und caudalis, die mit Rr. cutanei laterales und mit Rr. cutanei ventrales nahe der Linea alba an das Gesäuge herantreten (BUDRAS und FRICKE 2000). Die inguinalen Mammakomplexe werden außerdem vom N. genitofemoralis innerviert.

## **2.3. Histologie**

Ein Mammakomplex besteht aus einem Drüsenkörper (Corpus mammae) und seinem papillenförmigen Anhang, der Zitze. Der Drüsenkörper enthält das Drüsenparenchym (16-20 Glandulae mammae) und das interparenchymatöse Bindegewebe, das die Leitungsbahnen führt.

Die folgend dargestellte histologische Beschreibung stellt die Milchdrüse nach ihrer vollen Entwicklung dar, d.h. zu einem Zeitpunkt, in dem sie strukturell ausdifferenziert ist und die volle Funktionsfähigkeit für die Laktation erreicht hat.

Die einheitliche Grundstruktur dieser tubuloalveolären Drüse besteht aus den alveolären Drüsenendstücken, den sich anschließenden Gängen, die sich zu größeren, dann auch interlobulär verlaufenden, so genannten Milchgängen (Ductus lactiferi) vereinigen und

anschließend in die Milchzisternen (Sinus lactiferi) münden, die beim Hund nicht weiträumige Milchsammelräume, sondern schlauchartige Gebilde darstellen. Ein Teil dieser Zisternen befindet sich noch im Drüsenkörper (Pars glandularis), der sich anschließende Teil wird bereits in der Zitze geführt (Pars papillaris) und mündet über die Strichkanäle (Ductus papillares) an der Oberfläche der Zitze.

Das Parenchym der Milchdrüse wird durch die nachfolgend dargestellten Zelltypen charakterisiert:

1. Die zur Milchsynthese befähigten, einschichtig angeordneten **Drüsenepithelzellen**, stellen den Hauptbestandteil der Alveolarwand dar. Da nur ein Zelltyp gefunden wird, muss angenommen werden, dass jede Zelle sämtliche Milchbestandteile sezerniert (MOSIMANN und KOHLER 1990).

Die intralobulär lokalisierten englumigen Proximalabschnitte des Ausführungsgangsystems besitzen nach SMOLLICH und MICHEL (1993) ein einschichtiges, noch zur Sekretion befähigtes Epithel. Die folgenden Milchgänge, sind mit einem zweischichtigen Epithel ausgestattet.

2. Die zur Kontraktion befähigten **Myoepithelzellen** umspannen die alveolären Drüsenendstücke netzartig sowie auch Teile der Milchgänge. Sie sind nach LIEBICH (1993) modifizierte Derivate des ektodermalen Hautblattes, welche die Funktion glatter Muskelzellen erfüllen. Auch MOSIMANN und KOHLER (1990) sehen sie als differenzierte Epithelzellen an. An ihrer Oberfläche tragen sie Oxytocinrezeptoren, deren Aktivierung eine Kontraktion der Zelle bewirkt. Somit tragen sie entscheidend zur Milchejektion bei (MOSIMANN und KOHLER 1990) (Näheres zur Myoepithelzelle s. Punkt 2.10.1.)

Das interstitielle Bindegewebe ist Träger für ein dichtes Kapillarnetz, Arteriolen, Venolen, Lymphgefäße und vegetative Nerven. In der ruhenden oder juvenilen Milchdrüse sind in das lockere Bindegewebe eine tierartlich unterschiedliche Anzahl von Fettzellen eingelagert.

## **2.4. Pre- und postnatale Entwicklung und zyklusbedingte Veränderungen der Milchdrüse des weiblichen Hundes**

Die Milchdrüse der Hündin erfährt gravierende Veränderungen in ihrer Größe, Form, Gestalt und in ihrer Funktion in Verbindung mit, bzw. in Abhängigkeit von ihrem pränatalen und infantilen Wachstum, der Pubertät, den Brunstzyklen, der Trächtigkeit und der postlaktalen Involution.

## Ontogenese der Mamma

### - Erste Anlagen -

Das Parenchym der Milchdrüse entsteht aus der Epidermis des ektodermalen Hautblattes. Ihre Anlagen erscheinen in der embryonalen Entwicklung relativ früh, nach RÜSSE und SINOWATZ (1991) bei den meisten Spezies mit einer SSL von 12 - 16 mm in Form eines verdickten Epidermisstreifens (Milchlinie oder Milchstreifen) beiderseits am Rand der Stammzone und Extremitätenleiste des Embryos. Diese frühen Anlagen entwickeln sich durch Proliferation der Epithelzellen zur so genannten Milchleiste, an welcher durch rasche lokale Zellvermehrungen in bestimmten Abständen kleine Epidermisverdickungen, die Milchhügel, auftreten. Der Rest der Milchleiste bildet sich zurück. Die Milchhügel sind die Vorläufer der späteren Mammakomplexe, deren Anzahl und Lage tierartlich charakteristisch sind (NICKEL et al. 1984). Zeitgleich mit der Umformung zu den Milchhügeln wird durch Wachstum und Differenzierung der seitlichen Körperwand die Milchdrüsenanlage von dorsal nach ventral verlagert.

### - Bildung der Mammaknospe und ihre Differenzierung -

In der weiteren Entwicklung erfolgt eine starke Proliferation des Epithels der Milchhügel, und es wächst als zapfenförmiger solider Spross die Mammaknospe in die Tiefe, während sich das umgebende Mesenchymgewebe zum Areolargewebe verdichtet (RÜSSE und SINOWATZ 1991). An der Oberfläche verhornt das Epithel, was zur Bildung eines längere Zeit bestehen bleibenden Hornpfropfes führt. Nach dessen Schrumpfung bildet sich als leichte Eindellung der Oberfläche die so genannte Zitzen- oder Mammatasche. Zur gleichen Zeit wachsen von der Basis der Mammaknospen solide Epithelstränge, so genannte Primärsprosse, ins Mesenchym ein, aus welchen wiederum weitere Generationen von Sprossen (Sekundär- und Tertiärsprosse) hervorgehen. Die Anzahl der gebildeten Primärsprosse entspricht der tierartlich spezifischen späteren Anzahl von Strichkanälen (Ductus lactiferi) pro Mammakomplex. Die Sekundärsprosse differenzieren sich später zu den Milchgängen, Tertiärsprosse entwickeln sich erst zum Zeitpunkt der Pubertät, bzw. der ersten Trächtigkeit und bilden dann das eigentliche sezernierende Milchdrüsenengewebe. Dies bedeutet, dass die Milchdrüse bei der Geburt aus einem relativ einfachen Gangsystem besteht: die Sekundärsprosse sind noch wenig entwickelt, d.h. ihre vorwachsenden Epithelstränge bestehen noch aus soliden Zellsträngen (RÜSSE und SINOWATZ 1991).

Das Stroma der Mamma (Blutgefäße, Lymphgefäße, Bindegewebe und Fett) entwickelt sich aus dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm (BALDWIN und PLUCINSKI 1977).

Das sekretorische, das Gangsystem auskleidende Epithel, wie auch die Myoepithelzellen der Mamma sind ektodermaler Herkunft. Durch die Aktinfilamente in ihrem Zytoplasma besitzen die Myoepithelzellen kontraktile Eigenschaften, welche über einen neurohormonalen Reflexbogen gesteuert werden.

Die Nervenbahnen, welche die Milchdrüse versorgen, wachsen von der Neuralleiste und dem Zentralnervensystem aus (SILVER 1966), das ebenfalls vom Ektoderm abstammt.

## **Postnatale Entwicklung**

Bis zur Geschlechtsreife entwickelt sich die Milchdrüse kaum weiter und besteht nur aus dem verzweigten Gangsystem (RÜSSE und SINOWATZ 1991), welches nach SMOLLICH (1996) in einen zellreichen Bindegewebeskomplex eingebettet ist. Die Gänge sind wenig differenziert und durch eine oder mehrere Lagen ruhig erscheinenden Epithels gekennzeichnet (SEKHRI und FAUKIN 1970).

Die juvenile Milchdrüse besteht somit größtenteils aus Binde- und Fettgewebe, das als Platzhalter für das eigentliche Drüsengewebe dient (DAHME und WEISS 1999). Im Interstitium vom Fleischfresser kommen im Gegensatz zum Rind und Pferd nur wenige Fettzellen vor (SINOWATZ und RÜSSE 1991).

Mit Beginn der Pubertät setzt bei weiblichen Tieren unter dem Einfluss der zyklisch sezernierten Geschlechtshormone (Östrogen und Progesteron) im Zusammenwirken mit Steroidhormonen der Nebenniere und dem Somatotropin der Hypophyse das weitere Wachstum der embryonal angelegten primitiven Milchgänge ein (RÜSSE und SINOWATZ 1991), und es kommt zu einem Ausbau des Drüsenparenchyms (DAHME und WEISS 1999). In tierartlich unterschiedlichem Maße proliferiert das interlobuläre Binde- und Fettgewebe.

Trotz einer gewissen Weiterentwicklung der weiblichen Milchdrüse während der Pubertät weist das Drüsengewebe auch postpubertär einen gewissen primitiven Bau auf (SMOLLICH 1996). Die endgültige Evolution der Milchdrüse erfolgt erst während der ersten Trächtigkeit (SCHNORR 1996). Durch das Zusammenwirken maternaler Geschlechtshormone mit Hormonen der Plazenta erreicht sie ihre endgültige Ausgestaltung und die volle Aufnahme ihrer Funktion (RÜSSE und SINOWATZ 1991).

Beim männlichen Geschlecht bleibt der präpubertäre Zustand der Milchdrüse nach der Pubertät unverändert erhalten.

## **Durch den Sexualzyklus bedingte Veränderungen im Mammaparenchym**

Die Milchdrüse des weiblichen Hundes unterliegt hormoneller Regulation, welche die initiale Entwicklung der Mamma bei Eintritt in die Geschlechtsreife und die Veränderungen im Mammaparenchym während des Brunstzyklus und während der Trächtigkeit mit anschließender Laktationsperiode steuert (MOULTON 1990).

Die Hündin gehört zu den saisonal monöstrischen Tieren, eine Ovulation erfolgt nur ein oder zweimal im Jahr (WALTER 2003). Das durchschnittliche Läufigkeitsintervall beträgt nach ARNOLD (2001) sechs bis sieben Monate, wobei die Autoren auf die erheblichen rassebedingten und individuellen Unterschiede hinweisen. So sehen sie als normale Schwankungsbreite 4 - 12 Monate an, wobei kurze Läufigkeitsintervalle bei klein-wüchsigen und lange bei großwüchsigen Rassen, wie zum Beispiel 12 Monate beim Basenji, vorkommen. Die Dauer des Läufigkeitsintervalls ist bei einer bestimmten Hündin normalerweise konstant.

Jeder ablaufende Brunstzyklus fördert zu Beginn die Ausbildung neuer Strukturen im Parenchym der Milchdrüse, die im weiteren Verlauf bei nicht Belegung der Hündin wieder

zurückgebildet werden müssen. Die Hündin zeichnet sich im Vergleich zu den anderen Haussäugetieren durch besondere Zyklusbedingungen aus, die in einer stark verlängerten Gelbkörperphase mit entsprechend hohem Progesteronspiegel zu sehen sind. Durch diese ausgeprägte lange Zeitspanne lutealer Aktivität kommt es bei der Hündin in jedem Zyklus zur Ausbildung von sezernierenden Alveolen.

In den Phasen des Sexualzyklusses, die vom Kliniker als Läufigkeit bezeichnet werden, nämlich Proöstrus, Östrus und die ersten Wochen des Metöstrus, bewirken die in diesen Stadien wirkenden Hormonspiegel eine gezielte Anbildung der Drüse zur Vorbereitung auf eine eventuell stattfindende Befruchtung der Hündin mit anschließender Gravidität. Somit finden in jedem ablaufenden Zyklus charakteristische Auf- und Umbauprozesse statt.

NELSON und KELLY (1973) beschreiben die durch den Zyklus bedingten histologischen Veränderungen der Mamma.

- Im Proöstrus proliferiert unter dem steigenden Östrogeneinfluss das Drüsenepithel, um vergrößerte und dilatierte Gangsysteme auszubilden. Das Stroma hingegen zeigt geringe Proliferation.

- Während des Östrus ist eine leichte bis moderate Proliferation des Gangsystems und des Stromas sichtbar. Eine Differenzierung der Gangstrukturen beginnt, welche nun von einem ein- bis zweischichtigen Epithel ausgekleidet sind. Das Stroma zeigt einen erhöhten Zellgehalt und ein Ödem des Bindegewebes.

- In der sich nun anschließenden Phase des Metöstrus erlangt die Milchdrüse unter Progesteroneinfluss ihre weitgehendste Entwicklung während des Brunstzyklus. So wird im frühen Metöstrus eine leichte Proliferation der Alveolen sichtbar.

- Im mittleren Metöstrus (30. - 60. Tag nach dem Östrus) sind die Alveolen rund, gut differenziert und zeigen eosinophile Sekretion. Das Gangsystem ist gut differenziert und das Stroma erscheint als reifes Bindegewebe.

- Das Bild des späten Metöstrus (60. - 90. Tag nach dem Östrus) zeigt ein Abklingen der Alveolarproliferation und ist durch eine starke Sekretion und Involution der Alveolen beherrscht. Diese Sekretion ist in den von der Involution ergriffenen Alveolen sowie in dukталen Strukturen sichtbar. Das Stroma ist weniger prominent, und das Epithel zeigt verschiedene Stadien der Atrophie.

- Im anschließenden frühen Anöstrus (90. - 120. Tag nach dem Östrus) ist nur noch eine leichte Sekretion in dilatierten und der Involution unterworfenen Strukturen zu erkennen, die Alveolen verlieren an Prominenz, und die Atrophie ihres Epithels schreitet fort.

- Während des späten Anöstrus (120. - 190. Tag nach dem Östrus) ist die Regression so weit fortgeschritten, dass von den Drüsenstrukturen nur noch rudimentäre Reste bestehen. Das Bindegewebe gewinnt an Volumen und eine Vermehrung des subkutanen Fettgewebes findet statt.

Nach MOULTON (1990) zeigt das Bild der ruhenden Milchdrüse wenig lobuläre Entwicklung, lediglich Alveolarknospen und Gänge sind vorhanden, Alveolen fehlen. BOMHARD und KAPPES (1976) beobachteten, dass die Regression bei jungen Hündinnen wesentlich ausgeprägter ist als bei alten Tieren. WALTER (2003) ist der Meinung, dass der ursprüngliche Zustand trotz Regression nie wieder erreicht wird.

Eine volle Ausdifferenzierung bis zur Aufnahme der Sekretion erfährt die Milchdrüse erst während der ersten Gravidität (SMOLLICH und MICHEL 1992). Nach der ersten Trächtigkeit ist nach MOULTON (1990) eine vollständige Involution der Alveolen nicht möglich. Jedoch sind verschiedene Autoren MCDONALD (1969), SINOWATZ und WROBEL et al. (1980), STRANGE et al. (1995) der Ansicht, dass die postlaktale Involution eine vollständige Umgestaltung des alveolären epithelialen Kompartiments zum jungfräulichen Zustand zur Folge hat. Bei Hündinnen hohen Alters beobachtet MOULTON (1990) bei der Involution der Milchdrüse, dass diese nur einige vereinzelte Gänge, aber keine Alveolen hinterlässt. Weiterhin vermutet MOULTON (1990), dass das Epithel in diesem Stadium der Sitz neoplastischer Veränderungen sein kann. Das Bindegewebe zeigt sich als zellarm.

Nach ARNOLD (2003) verlängert sich bei älteren Hündinnen die Anöstrusphase, und die Läufigkeit tritt nur noch einmal jährlich auf. Zu einem definitiven Ende des Sexualzyklusses kommt es nicht.

## **2.5. Canine Mammatumoren**

Beim Speziesvergleich ist festzustellen, dass Mammatumoren beim Hund und auch bei der Katze häufig vorkommen, bei anderen Haussäugetieren jedoch kaum (DAHME und WEISS 1999). Nach ALBERT et al. (1994) und COTCHIN (1972) sind maligne Neoplasien der Mamma mit die häufigsten Todesursachen beim Hund.

### **2.5.1. Epidemiologie**

#### **2.5.1.1. Prävalenz - Dignität**

In ihrer Vorkommenshäufigkeit von Neoplasien folgen die caninen Mammatumoren, bezogen auf beiderlei Geschlecht, den an erster Stelle stehenden Hauttumoren an zweiter Stelle (THEILEN und MADEWELL 1997; MOULTON 1990).



Bei der Hündin jedoch stellen Mammatumoren die häufigste Neoplasie dar (FERGUSON 1985; NERURKAR et al. 1989; MOULTON 1990; RUTTEMAN 2000; RUTTEMAN, WITHROW und MACEWEN 2001; MORRISON 2002). Die Inzidenzrate beträgt 3,5% aller Hündinnen (WEY et al. 1999).

WALTER (1998) und SORENMO (2003) schätzen, dass ungefähr 50% aller bei der Hündin vorkommenden Neoplasien Mammatumoren sind. Die exakte Vorkommenshäufigkeit und das Verhältnis benigner zu maligner Tumoren ist nach MISDORP (2002) schwierig zu bestimmen, da kleine gutartig erscheinende Tumoren entweder von Tierärzten nicht beachtet oder nicht chirurgisch entfernt werden. Seiner Meinung nach sind ca. 30% der chirurgisch entfernten Tumoren maligne. Laut RUTTEMAN (2000) liegt der Anteil der Tiere mit bösartigen Tumoren bei 20 - 40% aller Tumorträger. DAHME und WEISS (1999) schätzen ca. 40 - 50% der Mammatumoren als bösartig ein. MORRISON (2002) stellt ebenfalls einen malignen Anteil von 50% fest. Ein noch höherer Prozentsatz maligner Tumoren, bis über 60%, wird in pathologischen Erhebungen gefunden, ist jedoch möglicherweise durch ein gehäuftes Einsenden klinisch maligne erscheinender Tumore beeinflusst (BRODEY et al. 1983; GOTTWALD 1998).

HELLMÉN et al. (2000) sehen 50% der Mammatumoren des Hundes als benigne an, wobei komplexe Adenome und Mischtumoren am häufigsten unter ihnen vertreten und reine benigne mesenchymale Tumoren selten sind. Karzinome präsentieren ihrer Meinung nach, sich auf BOSTOCK 1975; MISDORP 1971 beziehend, 40-45% der malignen Tumoren, während "echte" maligne Mischtumoren, wie Karzinosarkome selten vertreten sind und Sarkome 5-10% der malignen Tumoren ausmachen.

### **2.5.1.2. Alter**

Es sind bevorzugt ältere Tiere von Mammatumoren betroffen (DAHME und WEISS 1999). So finden sich Mammatumoren selten vor dem 2. Lebensjahr. In der Altersgruppe von 6-7 Jahren zeigt sich nur eine beschränkte Steigerung in der Inzidenz (MOULTON 1990). Diese nimmt ab dem siebten Lebensjahr deutlich zu und zeigt ihren Höhepunkt mit 10 - 14 Jahren (RUTTEMAN 2000). Danach scheint die Inzidenz wieder zu sinken (GOTTWALD 1998; PRIESTER 1979; SCHNEIDER 1970). Rüden, welche an Mammatumoren recht selten erkranken, sind nach MOULTON (1990) in der Regel noch ein Jahr älter. DAHME und WEISS (1999) sehen das Maximum der Tumorphäufigkeit zwischen dem 9. und 11. Lebensjahr. Nach GUTBERLET et al. (1998) treten Mammatumoren am häufigsten in einem Alter zwischen 7 und 13 Jahren und selten unter 5 Jahren auf.

MOULTON (1990) gibt an, dass benigne Mischtumoren 1 - 2 Jahre früher als Karzinome auftreten. WEHREND et al. (2003) sind der Meinung, dass bisher mit noch keiner Studie ein Zusammenhang zwischen dem Alter zum Zeitpunkt des Auftretens und einem bestimmten Tumortyp gezeigt werden konnte. Auch PRIESTER (1979) sieht keinen klaren Unterschied in der Verteilung der unterschiedlichen Tumortypen in Relation zum Alter des Tieres bei der Erstdiagnose. Lediglich KURZMAN und GILBERTSON (1986) stellen fest, dass vor dem 5. Lebensjahr auftretende Mammatumoren zwar selten, jedoch meist gutartig sind.

### 2.5.1.3. Geschlecht

Mammatumoren treten fast ausschließlich bei Hündinnen auf und repräsentieren bei ihnen die häufigste Neoplasie (FERGUSON 1985; NERURKAR et al. 1989; MOULTON 1990; RUTTEMAN 2000; RUTTEMAN, WITHROW und MACEWEN 2001; MORRISON 2002). Rüden sind relativ selten betroffen und stellen nach BRODEY et al. (1993) und GOTTWALD (1998) maximal 1 % der Tumorträger dar. MOULTON (1990) führt an, dass viele beim Rüden gefundene Mammatumoren mit hormonalen Abnormitäten einhergehen, wie zum Beispiel Östrogen produzierende Sertolizelltumoren. Diese Meinung teilt MISDORP (2002). Auch GUTBERLET et al. (1998) beobachten, dass die seltenen Mammatumoren beim Rüden hauptsächlich im Zusammenhang mit östrogenproduzierenden Hodentumoren und einem damit verbundenen Feminisierungssyndrom bestehen. Dem hingegen ist RUTTEMAN (2000), sich auf HAMILTON (1974) beziehend, der Meinung, dass es keine überzeugenden Beweise für einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Mammatumoren beim Rüden und dem Vorhandensein östrogenproduzierender Hodentumoren gibt.

### 2.5.1.4. Rassedisposition

Die Prävalenz der Entwicklung von Mammatumoren bei verschiedenen Hunderassen sowie Mischlingen wurde in vielen Studien untersucht. Jedoch bleibt zu bedenken, dass eine Rassedisposition aufgrund der regionalen Bevorzugung bestimmter Rassen nur schwer zu ermitteln ist (GUTBERLET et al. 1998). Einer Zahl spezifischer Hunderassen wird ein hohes Risiko, an Mammatumoren zu erkranken, zugesprochen. DAHME und WEISS (1958) sehen Terrier als überdurchschnittlich häufig betroffene Rassegruppe. Dem hingegen sehen ESKENS (1983), GOTTWALD (1998) und PRIESTER (1979, 1980) die Spanielrassen als häufig erkrankte Rasse an. Dackel und Pudel waren in einigen (ESKENS 1983), aber nicht in anderen Studien (DORN 1968; FIEDLER 1975; PRIESTER 1979, 1980) überproportional vertreten.

Nach Moulton (1990) besteht eine hohe Erkrankungsfrequenz zum einen bei den „sporting Breeds“ (Pointer, Retriever, Englischer Setter und Spaniel) und zum anderen bei Pudeln, Boston Terriern und Dackeln. Teils übereinstimmend sehen THEILEN und MADEWELL (1987) folgende Rassen mit hohem Erkrankungsrisiko an: 1. „Sporting Breeds“: Pointer, Englische Setter, Deutsch Kurzhaar, Brittany Spaniel, Englische Springer Spaniel und Labrador Retriever; 2. „Nonsporting Breeds“: Pyrenees, Samoyeden, Airedale Terrier, Miniatur/Toy Pudel und Keeshound.

Für die Risikounterschiede der verschiedenen Rassen an Mammatumoren zu erkranken, könnte zum einen eine genetisch determinierte variable Empfindlichkeit verantwortlich sein, zum anderen könnten sie jedoch auch zum Teil auf einem Unterschied in der relativen Inzidenz sonstiger tödlicher Erkrankungen in jüngerem Alter beruhen, da Mammatumoren häufig erst im fortgeschrittenen Alter auftreten (RUTTEMAN 2000).

Ein geringes Risiko der Entwicklung von Tumoren im Mammaparenchym beobachtet PRIESTER (1979) bei Mischlingsrassen und stellt des Weiteren fest, dass Collies ein geringes

Erkrankungsrisiko für benigne Tumoren aufweisen. FREYE et al. (1967) sieht ebenfalls ein geringes Risiko für Collies und HOWARD und NIELSON (1965) beobachten dies für den Boxer. Bei den Untersuchungen von BUSCH (1993) stehen die Mischlinge allerdings an erster Stelle.

### **2.5.1.5. Ätiologie**

Der Grund für spontane Mammatumoren beim Hund ist unbekannt (DAHME und WEISS 1999), aber verschiedene Studien haben Hinweise für Faktoren gegeben, die ursächlich sein könnten (THEILEN und MADEWELL 1987). Nach GUTBERLET et al. (1998) liegt ätiologisch ein multifaktorielles Geschehen vor.

#### **Endokrine Faktoren:**

Von den endokrinen Faktoren haben vor allem der Zeitpunkt der Kastration und die Gabe von Gestagenen zur Läufigkeitsunterdrückung einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Mammatumoren.

#### Zeitpunkt der Kastration

Erfolgt die Kastration der Hündin vor der ersten Läufigkeit wird das Mammatumorrisiko fast komplett eliminiert (RUTTEMAN 2000). Bei Kastrationen im Alter unter zweieinhalb Jahren ist das Risiko für die Entwicklung von malignen Tumoren vierfach kleiner als bei unkastrierten Hündinnen (SCHNEIDER et al. 1969). Bei später durchgeführten Kastrationen scheint dieser hemmende Einfluss zu verschwinden (MISDORP 1988; SCHNEIDER et al. 1969). Das Risiko für benigne Tumoren ist ebenfalls bei kastrierten Hündinnen niedriger (PRIESTER 1979). Im Gegensatz zu den malignen Tumoren ist jedoch der hemmende Einfluss der Kastration auch nach einem Lebensalter von zweieinhalb Jahren noch gegeben (MISDORP 1988, 1991).

#### Läufigkeitsverhütung

Bei Verabreichung von Geschlechtshormonen zeigte sich sowohl bei hoher Dosierung (experimentelle Studien) als auch bei niedrigen Dosierungen, wie sie in der Praxis zur Läufigkeitsverhütung angewendet werden, ein vermehrtes Auftreten von Mammatumoren (RUTTEMAN 2000). Das Risiko maligner Tumoren steigt besonders bei der Applikation von Östrogen-Gestagen-Kombinationen in hohen Dosierungen (CASEY et al. 1979; MISDORP 1991; RUTTEMAN 1992). Nach den Untersuchungen von MISDORP (1988) erhöhen hormonelle Läufigkeitsverhütungen die Gefahr für benigne Tumoren um ungefähr 40%, haben aber, verglichen mit dem Risiko intakter, unbehandelter Hündinnen, keinen Einfluss auf die Häufigkeit maligner Tumoren. Dies steht im Gegensatz zur regelmäßigen Progestagenverabreichungen bei Katzen, für die ein signifikant erhöhtes Risiko für benigne und maligne Mammatumoren damit assoziiert ist (MISDORP 1991).

### Trächtigkeit, endokrine Imbalancen, pathologische Veränderungen

Im Gegensatz zum Menschen, wo frühe Geburten die Mammatumorgefahr verringern, gibt es keinen Hinweis für einen ähnlichen Effekt bei der Hündin (BRODEY et al. 1966; HAMILTON 1974; SCHNEIDER et al. 1969; TAYLOR et al. 1976).

Der Einfluss von stark gesteigerter Lactatio falsa und der Entstehung von Mammatumoren wird kontrovers diskutiert. Nach HAMILTON (1974), BRODEY et al. (1966), FIDLER und BRODEY (1967) und SCHNEIDER et al. (1969) scheint das Auftreten von einer klinisch manifesten Lactatio falsa keinen Einfluss zu haben. Anderer Meinung sind DE VITTA (1939), ELSE und HANNANT (1979), MULLIGAN (1963) und ÜBERREITER (1960), welche eine Verbindung zwischen der Pseudogravidität und hyperplastischen Umfangsvermehrungen oder Neoplasien in der Milchdrüse fanden.

Die Studien von BRODEY et al. (1966) und SCHNEIDER et al. (1969) zeigten, dass das Risiko der Mammatumorentwicklung weder durch einen irregulären Brunstzyklus, noch durch ovarielle Zysten, persistierende Corpora lutea oder endometriale Hyperplasien signifikant erhöht wird.

### Endogene und exogene Hormone

Eierstockhormone und Peptidhormone beeinflussen ihre Zielorgane direkt mittels Bindung an spezifische Rezeptoren (RUTTEMAN 2000). Rezeptoren für Östradiol, Progesteron und Prolaktin sind im normalen Milchdrüsengewebe der Hündin vorhanden und lassen sich auch bei der Mehrzahl benigner Tumore nachweisen (BRODEY et al. 1966; RUTTEMAN 1986, 1988, 1993). Demgegenüber besitzen maligne Mammatumoren nur in etwa der Hälfte der Fälle Rezeptoren für diese Hormone, und verglichen mit normalem Gewebe oder benignen Tumoren, auch nur in bedeutend niedrigeren Konzentrationen (RUTTEMANN 2000). Metastasen wiesen in einem Drittel der untersuchten Tumoren Prolaktinrezeptoren, jedoch nur selten Steroidrezeptoren auf (RUTTEMAN 1988, 1989), daher wird angenommen, dass bei fortgeschrittener Erkrankung die Expression der Gene, die für Steroidrezeptoren codieren, verloren geht (MISDORP 2002). Auch RUTTEMAN (2000) findet diese Befunde mit der Theorie, dass Aberrationen von normalen Kontrollmechanismen mit der Malignität des Tumors zunehmen, als übereinstimmend.

Der stimulierende Einfluss von Eierstockshormonen und ihrer synthetischen Derivaten scheint größtenteils in frühen Entwicklungsphasen von Mammatumoren zu bestehen. Es kommt zu einer Erhöhung der Teilungsaktivität und damit zu einer Zunahme der Anzahl empfindlicher Zellen. Jedoch scheint der Einfluss auf maligne Zellen schon vor Erreichen des mittleren Lebensabschnitts der Hündin zu verschwinden und ist in Metastasen zumeist abwesend (RUTTEMAN 1990), so dass eine Kastration zum Zeitpunkt der Tumorentfernung auf das Metastasenwachstum keinen Einfluss hat (YAMAGAMI et al. 1996).

Der genaue Mechanismus, mit dem Hormone in der Einleitung der Entstehung von caninen Mammatumoren agieren könnten, ist noch nicht vollständig verstanden.

Steroidhormone sind dafür bekannt, Proliferationen und Differenzierungen im Mammaparenchym zu fördern (WALTER 2003). Durch die Bindung dieser Hormone an spezifische nukleäre Rezeptoren wird die Expression spezifischer Gene reguliert. Beim Hund

stellt eines dieser Zielgene das Wachstumshormon (GH) - Gen dar (SELMAN et al. 1994; GARDEREN et al. 1997; LEEUWEN et al. 2000). Mammäres Wachstumshormon (Growth hormon = GH) agiert lokal und führt zu einer Proliferation und Differenzierung der caninen Milchdrüse in der Lutealphase des Brunstzyklus und während des Reifungsprozesses der Milchdrüse in der Trächtigkeit. MOLL et al. (1996) und Garderen et al. (1997) vermuten ebenfalls, dass autokrine und oder parakrine Effekte des Wachstumshormons eine Rolle in der Entwicklung von caninen Mammatumoren spielen. In den 70er Jahren wurde es offensichtlich, dass auch exogene Progestagengaben einen hohen GH-Plasmaspiegel (EL ETREBY und FATH EL BAB 1977) hervorrufen können, welche in einzelnen Fällen zur Akromegalie (EIGENMANN 1983) oder zur Insulinresistenz (MISDORP 2002) führen.

Exogene Progestagengaben besitzen eine fördernde Wirkung in der Entstehung von Mammatumoren (CAPEL-EDWARDS et al. 1973; COLEMAN et al. 1976; FOWLER et al. 1977; GRÄF und EL ETREBY 1978, 1979; CONCANNON et al.1980). Die Induktion von Mammatumoren beim Hund durch exogene Progestagengabe wird als spezies-spezifischer Effekt betrachtet, da sie im Zusammenhang mit dem stimulatorischen Effekt des caninen Wachstumshormons steht. Eine Wachstumshormon-Expression wurde nach MISDORP (2002) ebenfalls in caninen Mammatumoren beobachtet.

Auch RUTTEMAN (2000) vermutet, dass bei Tieren, die dem Einfluss von Gestagenen ausgesetzt sind, ein Zusammenhang zwischen dem höherem Risiko für Mammatumoren und der Freisetzung geringer, aber kontinuierlich erhöhter Wachstumshormonkonzentrationen im frühen Lebensalter besteht. MISDORP (2002) hingegen spekuliert, dass das Wachstumshormon die Proliferation mammärer Stammzellen in den " end buds" stimulieren könnte, als ersten Schritt im Prozess der Karzinogenese von Mammatumoren.

## **Genetische Faktoren**

Nach GREENE (1997) sind ca. 7 % der Mammakarzinome beim Menschen hereditär, und in den meisten Familien mit diesen hereditären Karzinomen liegt eine Keimzellmutation eines Tumorsuppressorgens (BR-CA1 oder BR-CA2) vor. Auch andere genetische Defekte somatischer Zellen wurden bei malignen Mammatumoren von Hunden sowie Menschen gefunden (RUTTEMAN 2000). Beispiele sind die Mutation des Tumorsuppressorgens p53, ein Gen, das normalerweise die genomische Integrität überwacht, und eine Erhöhung der Expression des Onkogens c-erbB-2 (AHERN et al. 1996; CHU et al. 1998). Eine verstärkte Expression ("Überexpression") dieses Onkogens c-erbB-2 wurde in den Untersuchungen von AHERN et al. (1996) an malignen caninen Mammatumoren gefunden, wobei dies nicht mit vaskulärer Invasion oder regionalen Metastasen verbunden war. Verschiedene Typen genetischer Veränderungen wurden nach MISDORP (2002) in humanen Mammatumoren gefunden, wie onkogene Amplifikation, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, Punktmutationen und Translokationen. Einige Onkogene codieren für Wachstumsfaktoren und Wachstumshormonrezeptoren, was dadurch das Zellwachstum fördert und durch

Amplifikation oder verstärkte Expression zu einem unkontrollierten Wachstum führen kann. Einige Gene sind bekannt, die eine Erhöhung der zellulären Transformation (TGF-alpha) oder eine Erhöhung des Wachstums durch verstärkte Expression (c-erbB2) oder Mutation (p53) bewirken (MISDORP 2002).

Mit Hilfe der Flusszytometrie kann ein Verlust oder eine Zunahme des DNS-Gehaltes (Aneuploidie) im Zellkern neoplastischer Zellen nachgewiesen werden. Eine DNS-Aneuploidie konnte bei 50 - 60 % der malignen Mammatumoren des Hundes nachgewiesen werden und ist häufiger bei Tumoren mit hohem Malignitätsgrad, hoher Teilungsaktivität oder Fernmetastasen (RUTTEMAN 2000). Auch HELLMÈN et al. (1993) stellten in ihrer Studie fest, dass DNA-Aneuploidie mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. In einer Minderheit (15-20%) von histologisch benignen Mammatumoren ist das Vorhandensein von DNS-aneuploiden Zellen festzustellen, was vielleicht die maligne Transformation benigner Tumoren erklären könnte ( HELLMÈN et al. 1988; RUTTEMAN et al. 1988)

### **Diätetische Faktoren**

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass Nahrungsfaktoren bei Nagetieren und Menschen eine wichtige Rolle in der Ätiologie von Mammatumoren spielen (RUTTEMAN 2000). Ein hoher Fettverbrauch bzw. Adipositas erhöhen das Risiko der Tumorentwicklung in der Mamma (RUTTEMAN, WITHROW und MACEWEN 2001). ALENZA et al. (1998) wiesen in ihrer Studie die signifikante Verbindung zwischen Adipositas und einer deutlich erhöhten Prävalenz von Mammatumoren und Dysplasien nach. Es zeigte sich eine höhere Vorkommenshäufigkeit von Neoplasien in der Mamma bei Hunden, die in ihrem ersten Lebensjahr sowie ein Jahr vor Stellung der Diagnose der Mammatumorerkrankung übergewichtig waren. Des Weiteren stellten sie interessanterweise fest, dass selbstgekochtes Futter im Vergleich zu kommerziellen Futtern die Prävalenz von Mammatumoren ebenfalls erhöhte. Als weitere Risikofaktoren befanden sie einen hohen Anteil von Rind- oder Schweinefleisch in den Futterrationen bzw. einen zu niedrigen Anteil an Geflügelfleisch.

### **Virale Faktoren**

Obwohl in einigen Karzinomen Retrovirus-assoziierte A-Partikel festgestellt werden konnten (HELLMEN 1992), ist RUTTEMAN (2000) der Ansicht, dass Viren bei der Entstehung von Mammatumoren des Hundes keine Rolle spielen.

### **2.5.2. Klinisches Bild**

Mammatumoren treten als solitäre oder, wie in mehr als der Hälfte der Fälle, als multiple Tumoren auf (RUTTEMAN, WITHROW und MACEWEN 2001; TAYLOR et al.1976; FOWLER et al.1974). Beim Hund spielt die primäre Multiplizität der Mammatumoren, insbesondere der epithelialen Tumoren eine große Rolle (GUTBERLET et al. 1998). MOULTON et al. (1970), CAMERON UND FAUKLIN (1971), sowie MITCHEL (1974)

beschreiben ein multiples Auftreten bei nahezu 50% der Tiere. Ebenfalls sehen THEILEN und MADEWELL (1987) ein erhöhtes Vorkommen von multiple auftretender Tumoren und erklären diese durch die primäre Multiplizität dieser Tumoren, d.h. die simultane Entwicklung verschiedener Primärtumoren in unterschiedlichen Bereichen des Mammaparenchyms, wobei diese Neoplasien nach Autorenmeinung unterschiedlichen histologischen Typs sein können. Weiterhin verweisen sie auf die Möglichkeit, dass das klinische Bild multipler Tumoren auch durch direkte Expansion maligner Tumoren, sowie durch sich entwickelnde Metastasen entstehen kann. RUDOLPH (1999) weist darauf hin, dass, wenn primäre Multiplizität in einer Mammaleiste gegeben ist, diese auch in der anderen gegeben ist. GILLES (2000) fand in ihren Untersuchungen sogar eine primäre Multiplizität in 81,74% ihrer Fälle und begründete dies durch die angewandte Operationstechnik, bei welcher ausschließlich Mammateilleisten, bzw. komplette Mammaleisten histopathologisch untersucht wurden und somit auch palpatorisch noch nicht feststellbare Veränderungen diagnostiziert werden konnten. Nach GUTBERLET et al. (1998) zeigen bis zu 80% der erkrankten Hündinnen innerhalb einer Gesäugeleiste multiples Tumorwachstum und bis zu 72% haben in beiden Gesäugeleisten Tumoren. Dabei können Tumoren unterschiedlicher Dignität in der gleichen oder in beiden Leisten nebeneinander lokalisiert sein.

In der Erfahrung von RUTTEMAN (2000) entwickeln Hündinnen, die im frühen Lebensalter kastriert wurden und dennoch Tumoren ausbilden, häufiger solitäre Tumoren, die dann auch öfter bösartig sind. Der Autor räumt jedoch ein, dass statistische Beweise für diese Beobachtung noch nicht vorliegen.

Die Tumorlokalisation betrachtend, sind bevorzugt die kaudalen Mammakomplexe betroffen (DAHME und WEISS 1999; RUTTEMAN 2000). Auch ELSE und HANNANT (1979), KROOK (1954), MULLIGAN (1975) sowie TAYLOR (1976) stellen fest, dass die Tumorfrequenz sich von den axillären bis zu den inguinalen Mammakomplexen erhöht und sind der Meinung, dass der vierte und fünfte Mammakomplex in 65% der Fälle betroffen sind. Einen höheren Prozentsatz führen RUTTEMAN, WITHROW und MACEWEN (2001) an, wobei bis 70% der Fälle Tumoren in den vierten und fünften Mammakomplexen zeigen. Eine Erklärung findet sich in der größeren Gewebemasse der kaudalen Komplexe (RUTTEMAN 2000; RUTTEMAN, WITHROW und MACEWEN 2001). GUTBERLET et al. (1998) sind der Meinung, dass über 80% aller Mammatumoren in beiden abdominalen und inguinalen Komplexen auftreten und über 60% im kaudalen abdominalen und inguinalen Komplex. Die Autoren sehen eine mögliche Erklärung für die bevorzugte Lokalisation in den kaudalen Komplexen darin, dass diese während des Zyklus größeren morphologischen Umbauprozessen unterworfen sind.

Differentialdiagnostisch sind nach RUTTEMAN (2000) folgende Erkrankungen auszuschließen:

- Mastitis: meist bei laktierenden Hündinnen und mit zytologischer und bakteriologischer Untersuchung von Feinnadelbiopsien zu überprüfen;

- Hernia abdominalis oder inguinalis: mittels klinischer Untersuchungen oder Ultraschalluntersuchung zu differenzieren;
- Hauttumoren (z.B. Mastzelltumor oder Melanom), die meist zytologisch mittels Feinnadelbiopsie zu erkennen sind;
- Lymphadenopathien (reaktiv, neoplastisch)

THEILEN und MADEWELL (1987) weisen noch auf differentialdiagnostisch abzugrenzende, oft während des Östrus auftretende hyperplastische Veränderungen hin.

### 2.5.3. Diagnostik und Prognose

Die Diagnostik besteht aus einer eingehenden Adspektion und Palpation des Drüsengewebes und der regionären Lymphknoten sowie der Suche nach Metastasen (GUTBERLET et al. 1998).

- **Auf folgende Kriterien sollte der oder die Tumoren untersucht werden:**
  1. Anzahl (besteht primäre Multiplizität?)
  2. Größe
  3. Form
  4. Konsistenz
  5. Abgrenzbarkeit
  6. Verschieblichkeit gegenüber der Haut und der Fascia trunci profunda
  7. Veränderungen der Haut wie Rötung, Blaufärbung oder Ulzeration oder Schmerzhaftigkeit

In allen Fällen, in denen die Neoplasie größer als 0,5 cm ist, empfiehlt RUTTEMANN (2000) eine weitere Diagnostik durchzuführen und weist darauf hin, dass selbst Tumoren, die über längere Zeit unverändert erscheinen, plötzlich aggressives Verhalten entwickeln können und so die vorher gute Prognose verschlechtern können.

Die Größe des Tumors allein stellt kein Charakteristikum für einen bestimmten Neoplasietyp dar, aber in vielen Studien konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Größe die postoperative Überlebenszeit abnimmt (WEHREND et al. 2003).

Feinnadelaspiration oder Biopsien des Tumors zur Diagnostik sind nach der Meinung von GUTBERLET et al. (1998) nur in Einzelfällen angebracht.

Sind Entzündungszeichen vorhanden, ist die Blutgerinnung zu überprüfen, da eine disseminierte intravasale Gerinnung vorliegen kann (GUTBERLET et al. 1998). Stockhaus et al. (2003) untersuchten die Korrelation zwischen hämostatischen Veränderungen und dem Stadium der Tumorerkrankung bei an Mammakarzinome erkrankten Hündinnen. Zwei Drittel der untersuchten Hündinnen zeigten unterschiedliche Abnormitäten in der Hämostase.

Das infiltrative Wachstum von - vielfach anaplastischen - Karzinomen kann zu einer starken ödematösen Entzündung sowie auch oft zu starker Bindegewebsproliferation führen, was



klinisch als "Mastitis carcinomatosa" oder "inflammatorisches Karzinom" bezeichnet wird. Die Erscheinung geht mit typischen Entzündungszeichen wie Wärme, Erythem (apfelsinenfarbige Haut) und Schmerzhaftigkeit einher. THEILEN und MADEWELL (1987) berichten von häufig beobachteten Ulzerationen der Haut. Ursächlich sind für diesen Prozess Tumorzellen verantwortlich, die sich in Hautlymphgefäßen absiedeln und dort zu Satellitenmetastasen in der Haut führen, welche ihrerseits eine fokale Entzündung vortäuschen und Ulzerationen verursachen können. Meist sind 2 bis 3 nebeneinander liegende Mammakomplexe, aber auch die ganze oder sogar beide Milchleisten beteiligt. Nach der Erfahrung von RUTTEMAN (2000) entsteht diese Tumorform in der Lutealphase oder innerhalb der ersten drei Monate nach Verabreichung von Gestagenen. Zur Unterscheidung einer bakteriellen Mastitis ist eine Feinnadelbiopsie zum zytologischen Nachweis anaplastischer Karzinomzellen erforderlich, in Zweifelsfällen muss eine Biopsie mit einer histologischen Untersuchung durchgeführt werden. Die Prognose für eine Mastitis carcinomatosa ist ausgesprochen schlecht, bei praktisch allen Tieren mit dieser aggressiven Tumorform sind Fernmetastasen vorhanden (SUSANECK et al. 1983), auch wenn das rasche infiltrative Wachstum keine Gelegenheit gibt, röntgenologisch sichtbare (makro-)noduläre Metastasen in den Lungen zu bilden.

- **Untersuchung der regionären Lymphknoten**

Wenn eine Operation des Primärtumors möglich erscheint, werden die tributären Lymphknoten auf Hinweise der regionalen Metastasierung untersucht.

Die regionären Lymphknoten, d.h. die Lymphonodi axillares und inguinales superficiales sind auf Größe und Konsistenz zu untersuchen (GUTBERLET et al. 1998). Metastasen können allerdings auch ohne makroskopische Veränderungen des Lymphknotens bestehen. Ist eine Verhärtung oder Vergrößerung der tributären Lymphknoten feststellbar, ist eine Feinnadelbiopsie durchzuführen, wobei es im inguinalen Bereich vermieden werden sollte, durch das Mammaparenchym zu biopsieren (RUTTEMAN 2000).

- **Untersuchung auf Fernmetastasen**

Sind lokale oder regionale Tumoren resezierbar, sollte das Vorhandensein von Fernmetastasen abgeklärt werden.

Eine Metastasierung kann nach RUDOPHL (1999) lymphogen, hämatogen und auch canaliculär erfolgen. Regionäre und Fernmetastasen entstehen bei den epithelialen Tumoren sowohl lymphogen als auch hämatogen, wobei bevorzugte Lokalisationen der Metastasen nach GUTBERLET et al. (1998) die regionären Lymphknoten (57,8-65,5% der metastasierten Tumoren) und die Lunge (63-88,9% in metastasierten Tumoren) sind. Des weiteren führen die eben genannten Autoren an, dass bei Einbeziehung weiterer Organe (entferntere Lymphknoten, Nieren, Leber, Milz, Knochen) in das Metastasierungs-geschehen, die Lunge oder regionäre Lymphknoten meist mit betroffen sind, wobei nicht alle Tiere mit Lungenmetastasen auch Lymphknotenmetastasen aufweisen und umgekehrt.

Die Sarkome, welche im Gegensatz zu den häufig vorkommenden Geschwülsten des Drüsenepithels selten sind, metastasieren bevorzugt hämatogen, wobei die Lunge das erste Manifestationsorgan darstellt (GUTBERLET et al. 1998).

Die Untersuchungen auf Fernmetastasen umfassen die Beurteilung der den regionären Lymphozentren nachgeschalteten Lymphknoten (kranial: Lymphonodi praescapulares. Lymphonodi sternales; kaudal: Lymphonodi inguinales superficiales, profundes/iliaci medialis ("Darmbein-Lymphknoten"), Lymphonodi lumbales aortici), der bevorzugt betroffenen Lunge, der Abdominalorgane und Knochen.

Metastasen der Lunge und der Sternallymphknoten sollten mit Hilfe von Röntgenbildern des Thorax in rechts- und linksanliegender latero-lateraler sowie ventro-dorsaler Ebene ausgeschlossen werden (GUTBERLET et al. 1998). Die Forderung einer rechts und links anliegenden Röntgenaufnahme ergibt sich daraus, dass die unten liegende Lungenhälfte aufgrund der schlechteren Belüftung auch in der Inspiration eine undeutlichere Kontrastierung zeigt (WEHREND et al. 2003). Lungenmetastasen sind erst ab einem Durchmesser von 1 cm sichtbar, und stellen sich röntgenologisch als weichteildichte, meist runde Verschattungen (makronoduläre Verschattung) dar. Daneben kann es durch diffus in das Interstitium infiltrierende Metastasen zur micronodulären Verschattung kommen, welche mitunter nur schwer von anderen pathologischen Veränderungen zu unterscheiden ist. WEHREND et al. (2003) sind der Meinung, dass Lungenmetastasen ab einem Durchmesser von 0,5 cm bereits sichtbar sind und weist darauf hin, dass die zunehmende Lungendichte beim älteren Hund die Auswertung der Aufnahme erschweren kann. Tiere mit Lungenmetastasen zeigen nach HAMPE und HART (1979) oft, aber nicht immer, eine Dyspnoe als Symptom der Metastasierung. Die Sternallymphknoten sind ebenfalls der Ultraschalluntersuchung zugänglich.

Metastasen der Abdominalorgane und der abdominalen Lymphknoten lassen sich durch eine Röntgenaufnahme des Abdomens aufspüren, wobei die Lymphonodi illiaci mediales auch rektal der Untersuchung zugänglich sind (GUTBERLET et al. 1998). Kommt es bei Mammatumoren zu einer Ödembildung in den Hintergliedmaßen, deutet dies oft auf eine Metastasierung in die Lymphonodi inguinales profundes oder illiaci mediales hin (RUTTMAN 2000). Schmerzhaftes Lahmheit, Schwellung der distalen Gliedmaßen und periostale Knochenneubildungen kennzeichnen eine hypertrophe Osteoarthropathie (Morbus Marie Bamberger), die sich bei Tieren mit Lungenmetastasen vereinzelt entwickeln kann.

Das dargestellte diagnostische Vorgehen in der Praxis dient der Beurteilung des Stadiums der Tumorerkrankung, um einschätzen zu können, welche chirurgischen Maßnahmen eingeleitet werden sollten, bzw. ob sich eine Therapie noch als sinnvoll erweist. Eine klinische Stadieneinteilung nach dem TNM-System existiert für den Hund und kann nach GUTBERLET et al. (1998) als Orientierung bei der ersten klinischen Prognoseeinschätzung dienen. In Abhängigkeit der Befunde am Primärtumor (T), der Beteiligung der regionären

Lymphknoten (N) und dem Vorliegen von Fernmetastasen (M) folgt eine Klassifizierung des individuellen Falles.

Modifizierte klinische Stadieneinteilung (TNM-Klassifikation) maligner Mammatumoren des Hundes (RUTTEMAN 2000)

<b>T</b>	<b>Tumorgröße (cm)</b>		
<b>T0</b>	Kein Tumor		
<b>T1</b>	< 3		
<b>T2</b>	3-5		
<b>T3</b>	>5		
<b>T4</b>	Mastitis carcinomatosa		
<b>Fixierung</b>			
<b>a</b>	keine		
<b>b</b>	Fixierung an der Haut		
<b>c</b>	Fixierung an Muskel oder Faszie		
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>		
<b>M-0</b>	keine Fernmetastasen		
<b>M-1</b>	Fernmetastasen		
<b>Stadieneinteilung</b>			
<b>I</b>	T1 (a-c)	N0	MO
<b>II</b>	T0-T2 (a-c)	N1	MO
<b>III</b>	T3 (a-c)	alle N	MO
	alle T	N1b,2b	MO
<b>IV</b>	alle T	alle N	M1
	T4	alle N	alle M

Die histopathologische Untersuchung der entnommenen Tumoren, Mammaleisten oder Biopsien stellt die verlässlichste diagnostische Methode dar (MISDORP et al. 1999). Durch die Ermittlung des Tumortyps sind bereits einige prognostische Kriterien absehbar. Die Prognoseabschätzung wird zusätzlich verbessert, da in der histopathologischen Untersuchung weitere Komponenten beurteilt werden können, wie das Zellbild, Nekrosen, Blutungen, Angiosis oder Lymphangiosis carcinomatosa, Infiltration der Kapsel und der Umgebung und Sicherheitsabstand (GUTBERLET et al. 1998). Der Einsatz immunhistochemischer Methoden erfolgt zur Identifizierung des histogenetischen Tumortypes und spielt bei der Suche nach Krebszellen eine große Rolle. So wiesen BUSCH und RUDOLPH (1995) durch immunhistochemische Färbungen in 88,4% der von ihnen untersuchten Lymphknoten

okkulte Tumorzellembolie und/oder Mikrometastasen nach, die im HE-gefärbten Schnitt nicht sicher zu erkennen waren. Die Immunhistologie in Form einer Doppelfärbung zur Darstellung von Krebszelleinbrüchen in Blut- und Lymphgefäße nutzten GUTBERLET und RUDOLPH (1994). Da Gefäßeinbrüche der erste Schritt der Tumoren zur Ausbreitung im Körper sind, die dann zu Metastasen führen können, gibt die Beurteilung dieser Einbrüche einen Anhaltspunkt für die Malignität der Tumoren. Als einziges sicheres Kriterium können sie jedoch nicht genommen werden, da nicht jeder Einbruch zu Metastasen führt (GUTBERLET und RUDOLPH 1996).

Folgende Merkmale sehen GUTBERLET et al. (1998) als ungünstige Prognosekriterien für die Mammatumoren der Hündin an:

- Metastasierung
- Angiosis carcinomatosa
- schnelles Wachstum
- Infiltration
- Differenzierungsabnahme der Zellen
- Ulzeration
- Nekrose
- primäre Multiplizität des Geschwulstwachstums
- große Neoplasien
- geringer Sicherheitsabstand bei der operativen Entfernung

Andererseits sehen sie die Beteiligung des Myoepithels, in Form einer Hyperplasie, als sich günstig auf die Diagnose auswirkend an.

#### **2.5.4. Klassifikation der caninen Mammatumoren**

Beim Hund treten eine Vielzahl verschiedener Typen von Mammatumoren mit unterschiedlichsten biologischen Verhalten auf (MISDORP et al. 1999). Eine histopathologische Untersuchung der entnommenen Tumoren ist die zuverlässigste Methode für die Diagnostik. Die zytologische Untersuchung von Feinnadelbiopsien besitzt keine ausreichende Sensitivität zur Unterscheidung zwischen benignen und primär malignen Mammatumoren (ALLEN et al. 1986).

Die histopathologische Untersuchung ermöglicht so zum einen eine Klassifizierung der Tumoren und zum anderen können folgend aufgeführte prognostisch relevante Kriterien (GUTBERLET und RUDOLPH 1996) beurteilt werden:

1. Beziehung des Tumorgewebes zu seiner Nachbarschaft:
  - liegt ein expansives oder infiltratives Wachstum vor  
(besteht eine Infiltration des umgebenden Gewebes oder der Haut)
  - sind Einbrüche in Lymph- oder Blutgefäße zu beobachten

## 2. Histomorphologische Kriterien des Tumors:

- Pleomorphismus
- Differenzierungsgrad der Zellen
- Mitoserate
- pathologische Mitosen
- Nekrosen, Zysten, Ulzerationen, sekundäre Entzündungen,
- Infiltration von Lymphozyten oder Plasmazellen

## 3. Erfolgte eine vollständige Exzision der tumorösen Läsion

Eine Einteilung der tumorösen Veränderungen der Mamma erfolgt aufgrund histologischer Kriterien. Sie basiert auf den histologischen Merkmalen der neoplastischen Zellen und ihrer Differenzierung (RUTTEMAN 2000). Unterschiede in ihrer Dignität werden durch zelluläre Atypien und die Art des Wachstums (expansiv oder infiltrativ / invasiv) des Tumors bestimmt (HAMPE und MISDORP 1974; MOULTON 1990). Absolutes Malignitätsmerkmal ist eine festgestellte Metastasierung (RUDOLPH 1999; CULLEN et al. 2002).

Drei primäre Methoden werden zur Klassifizierung der Mammatumoren gebraucht, die sich an (1) histogenetischen, (2) histologisch descriptiven und (3) prognostischen Kriterien orientieren.

Eine Einteilung der Mammatumoren in Anlehnung an die Histogenese der neoplastischen Zellen in 1. epitheliale Tumoren, 2. mesenchymale Tumoren und 3. Mischtumoren nehmen DAHME und WEISS (1999) vor, wobei sie ihrem Einteilungsschema als 4. Kategorie die Dysplasien und als 5. die sekundären Tumoren hinzufügen.

Die zuletzt von MISDORP (1999) vorgeschlagene Modifizierung der *histologischen WHO-Klassifizierung*, welche auf histogenetischen Faktoren und einer deskriptiven Morphologie basiert, berücksichtigt klinische Verlaufsstudien und versucht, insbesondere für maligne Tumoren, dem Verhältnis zwischen Histologie und Prognose mehr Gewicht zu geben (RUTTEMAN 2000). Es werden wie folgend aufgeführt 3 Kategorien von Tumoren unterschieden: 1. Maligne Tumoren, 2. Benigne Tumoren und 3. Nichtklassifizierte Tumoren und in einer 4. Kategorie die mammären Hyper- bzw. Dysplasien aufgeführt. Der Grad der Malignität nimmt bei den unter Punkt 1.1-1.3 aufgeführten Tumoren mit steigender Zahl zu, so dass prognostische Aspekte bei Kenntnis dieser Klassifizierung sofort der Diagnose entnehmbar sind.

## Histologische Klassifikation der Mammatumoren des Hundes

nach W.MISDORP, R.W. ELSE, E.HELLMEN und T.P.LIMPSCOMB (1999)

### 1. Maligne Tumoren

- 1.1. *nicht infiltrierendes (in situ) Karzinom*
- 1.2. *komplexes Karzinom*
- 1.3. *einfaches Karzinom*
  - 1.3.1. tubuläres/ papilläres Karzinom
  - 1.3.2. solides Karzinom
  - 1.3.3. anaplastisches Karzinom
- 1.4. *spezielle Karzinomtypen*
  - 1.4.1. Spindelzellkarzinom
  - 1.4.2. Karzinom mit Plattenepithelmetaplasie
  - 1.4.3. muzinöses Karzinom
  - 1.4.4. fett-formierendes Karzinom
- 1.5. *Sarkome*
  - 1.5.1. Fibrosarkom
  - 1.5.2. Osteosarkom
  - 1.5.3. andere Sarkome
- 1.6. *Karzinom / Sarkom*
- 1.7. *Karzinom / Sarkom entstanden in einem benignen Tumor*

### 2. Benigne Tumoren

- 2.1. *Adenom*
  - 2.1.1. einfaches Adenom
  - 2.1.2. komplexes Adenom
  - 2.1.3. **basaloides Adenom**
- 2.2. *Fibroadenome*
  - 2.2.1. zellarmes Fibroadenom
  - 2.2.2. zellreiches Fibroadenom
- 2.3. *benigner Misch tumor*
- 2.4. *duktales Papillom*

### 3. Nichtklassifizierte Tumoren

### 4. Mammäre Hyper- und Dysplasien

- 4.1. *duktales Hyperplasien*

- 4.2. *lobuläre Hyperplasien*
  - 4.2.1. epitheliale Hyperplasie
  - 4.2.2. Adenosis
- 4.3. *duktale Ektasie*
- 4.4. *fokale Fibrose (Fibrosklerose)*
- 4.5. *Gynaekomastie*

In der Mamma des Hundes finden sich hauptsächlich primäre Geschwülste, insbesondere Geschwülste des Drüsengewebes, während mesenchymale Tumoren oder Mischtumoren selten sind (GUTBERLET et al. 1998). Die Bezeichnung *Mischtumor* bezeichnet das Vorkommen neoplastisch entarteter Zellen aus zwei Keimblättern. Nach DAHME und WEISS (1999) sind benigne Mischtumoren wesentlich häufiger als maligne (Karzinosarkome). MISDORP et al. (1999) beschreiben das Vorkommen des Karzinosarkoms beim Hund als ungewöhnlich; RUTTEMAN (2000) sieht es als selten an. WITHROW und MACEWEN (2001) halten den Ursprung der neoplastischen Zellen der benignen Mischtumoren aus pluripotenten Stammzellen für möglich.

Epitheliale Tumoren haben den weitaus größten Anteil an den Mammatumoren des Hundes (RUTTEMANN 2000). Adenokarzinome sind die häufigsten bösartigen Mammatumoren (DAHME und WEISS 1999). Besteht die Neoplasie ausschließlich aus sekretorischen, luminalen Epithelverbänden ohne myoepithelialen Anteil, spricht man, je nach Dignität, von einem Adenom oder Karzinom vom *einfachen Typ*. Bei den Karzinomen unterscheidet man tubuläre bzw. papilläre Wuchsformen (tubulopapilläres Karzinom) und solides Wachstum (solides Karzinom). Des Weiteren werden undifferenzierte Karzinome mit pleomorphen Zellen als anaplastische Karzinome bezeichnet. Bei neoplastischer Proliferation sowohl des Drüsen- als auch Myoepithels werden diese Tumoren als Adenom oder Karzinom vom *komplexen Typ* bezeichnet. Grundsätzlich kann man sagen, dass komplexe epitheliale Mammatumoren weniger häufig malignes Verhalten zeigen als die einfachen (DAHME und WEISS 1999). Komplexe Karzinome sind beim Hund relativ häufig, während sie bei der Katze und beim Menschen sehr selten sind (RUTTEMAN 2000). Rein myoepitheliale Tumoren (Myoepitheliom, Myoepithelkarzinom) sind selten (GUTBERLET et al. 1998).

## **2.6. Maligne Tumoren der caninen Mamma**

### **2.6.1. Nicht infiltrierendes (in situ) Karzinom**

Ein Karzinoma in situ (lat. in natürlicher Lage, Stellung) ist ein präinvasives Karzinom, welches die Basalmembran noch nicht durchbrochen hat, also eine intraepitheliale Neubildung mit zellulären Atypien, und bei welchem im Einzelfall nicht vorauszusagen ist, wann es in ein invasives Karzinom übergeht (PSYREMBEL). MISDORP (2002) bezeichnet es als die häufigste prämaligne Veränderung, bei welcher eine Voraussage, welcher

Prozentsatz zu invasiven Karzinomen progressiert, als in situ verbleibt, oder wieder verschwindet, nicht möglich ist.

Karzinoma in situ Stadien in der Milchdrüse des Hundes treten oft multizentrisch auf und erreichen keine großen Ausmaße (MISDORP 2002). Nicht infiltrierende Karzinome vom einfachen Typ kommen beim Hund häufig vor, während von nicht invasiven Karzinomen vom komplexen Typ noch nicht berichtet wurde. Eine Abgrenzung von der atypischen und sogar auch von der typischen Epitheliosis sowie von canaliculär metastasierenden Karzinomen kann schwierig sein (MISDORP et al. 1999).

### **2.6.2. Komplexes Karzinom**

Dieser Tumortyp kommt beim Hund im Gegensatz zur Katze relativ oft vor. Sehr häufig ist ein expansives, lobuliertes Wachstum zu beobachten, wobei Lymphgefäßeinbrüche bei 10%, also nicht sehr häufig, zu beobachten sind (MISDORP et al.1999). Die neoplastischen epithelialen Zellen formieren entweder tubulopapilläre oder solide Strukturen, während die neoplastischen spindelförmigen Myoepithelzellen meist sternenförmig bzw. retikulär angeordnet sind. Squamöse Metaplasien können auftreten. Gelegentlich können interzelluläre mukoide Substanzen beobachtet werden, die von jungem Knorpelgewebe, welches man in Karzinosarkomen findet, abgegrenzt werden müssen. MISDORP (2002) weist darauf hin, dass eine Differenzierung zwischen hochdifferenzierten, komplexen Karzinomen und komplexen Adenomen mitunter schwierig sein kann. Die fehlende Ausbildung einer Kapsel, infiltratives Wachstum, hohe Zelldichte, Nekrosen und ein hoher mitotischer Index sind bezeichnend für Malignität. Die mittlere Überlebenszeit beträgt 10 Monate (MISDORP 2002).

### **2.6.3. Einfaches Karzinom**

Dieses Karzinom besteht aus neoplastischen Zellen eines Zelltyps, die entweder Epithel oder Myoepithelzellen ähneln. Nach GUTBERLET et al. (1998) sind Myoepithelkarzinome selten. Der Anteil des Stromas kann erheblich variieren. Peritumorale lymphozytäre Infiltrate sind häufig, teils mit und teils ohne Nekrosen. Einfache Karzinome sind die häufigsten malignen Tumoren sowohl beim Hund als auch bei der Katze. Sie zeigen eine starke Tendenz zum infiltrativen Wachstum ins umgebende Gewebe sowie in Blut und Lymphgefäße (50%); eine lymphatische und hämatogene Metastasierung ist häufig. Die mittlere Überlebenszeit beträgt 10-12 Monate (MISDORP et al. 1973).

Einfache Karzinome können entsprechend ihres Differenzierungsgrades und ihres biologischen Verhaltens in drei Gruppen mit steigender Malignität ein- gestuft werden: tubulopapilläre, solide und anaplastische Karzinome.



### **2.6.3.1. Tubulopapilläres Karzinom**

Diese Karzinome sind durch die Ausbildung tubulärer oder papillärer Strukturen charakterisiert. Der tubuläre Typ kann mit einer markanten Proliferation des Bindegewebes einhergehen, während die stromale Komponente der papillären Karzinome meist wenig ausgeprägt ist. Papilläre Karzinome kommen beim Hund und bei der Katze häufig vor. Eine spezielle Variante ist der papillär-zystische Typ, der meist eine gute Demarkation zeigt und schwierig von benignen Veränderungen zu unterscheiden sein kann (MISDORP 2002). Unerwartete Metastasierung von hochdifferenzierten papillär-zystischen Karzinomen in die regionären Lymphknoten wurde beobachtet (MISDORP et al. 1972).

### **2.6.3.2. Solides Karzinom**

Dieser Tumortyp ist durch die Ausbildung solider Strukturen charakterisiert. Die neoplastischen Zellen bilden solide Nester, Gruppen oder auch Schnüre; luminale Strukturen sind nicht ausgebildet, die stromale Komponente ist gering bis moderat ausgebildet (MISDORP et al. 1999). Solide Karzinome kommen beim Hund häufig vor (DAHME und WEISS 1999).

### **2.6.3.3. Anaplastisches Karzinom**

Anaplastische Karzinome sind hoch infiltrative Karzinome (DAHME und WEISS 1999), die sich durch stark pleomorphe epitheliale Zellen auszeichnen und dadurch in keine der aufgestellten Kategorien der Karzinome einzureihen sind (HAMPE und MISDORP 1974). Im oft reichlich ausgebildeten, reaktiven Stroma sowie auch im Tumorgewebe ist eine Infiltration von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten zu beobachten. Eine Abgrenzung von extrem anaplastischen Karzinomen von anaplastischen Sarkomen kann Schwierigkeiten bereiten (MISDORP et al. 1999), ist aber mittels Immunhistochemie möglich, mit Hilfe welcher auch entzündliche Gewebeveränderungen mit hoch reaktiven Makrophagen von anaplastischen Karzinomen abgegrenzt werden können.

Anaplastische Karzinome kommen beim Hund oft vor und sind, aufgrund ihrer starken Tendenz zu metastasieren und rezidivieren, sehr gefürchtet.

### **2.6.4. Spezielle Karzinomtypen**

Zu dieser Kategorie zählt das selten vorkommende Spindelzellkarzinom, das ebenfalls selten vorkommende fett-formierende Karzinom, das muzinöse Karzinom, welches vom einfachen oder komplexen Typ sein kann, sowie das relativ seltene Plattenepithelkarzinom.

#### **2.6.4.1. Spindelzellkarzinom**

Dieses Karzinom, welches aus spindelförmigen Zellen, die in epithelialen Mustern angeordnet sind, besteht, ist beim Hund relativ selten (MISDORP et al. 1972). Einige sind solide und andere enthalten auch tubuläre Strukturen. Die Abgrenzung zu Fibrosarkomen kann durch immunhistochemische Methoden erleichtert werden. Nach MISDORP (2002) scheint es wahrscheinlich, dass einige Spindelzellkarzinome von Myoepithelzellen ihren Ursprung nehmen.

#### **2.6.4.2. Squamöses Karzinom (Plattenepithelkarzinom)**

Squamöse Karzinome (Plattenepithelkarzinome) sind relativ selten und kommen nur beim Hund vor (DAHME und WEISS 1999). Die meisten von ihnen zeigen ein stark infiltratives Wachstum, und Einbrüche in Lymphgefäße sind häufig zu beobachten.

Das Karzinom setzt sich hauptsächlich aus Zellen zusammen, die die Charakteristika malignem entartetem Plattenepithel zeigen (HAMPE und MISDORP 1974). Der Tumor besteht aus soliden Arealen oder Gruppen von neoplastischen Zellen mit Bezirken, die verhornende Strukturen aufweisen. In der Peripherie haben die neoplastischen Zellen oft eine basaloide Erscheinung, im Zentrum sind Keratinlamellen, zwischen denen nekrotische Tumorzellen zu sehen sind, zu beobachten. HAMPE und MISDORP (1974) beschreiben das Keratin als nicht in Lamellen vorkommend und weisen auf eine mögliche Verwechslung dieser Strukturen mit nekrotischen Bezirken hin. Eine Variante dieses Tumortypes stellt das *adenosquamöse Karzinom* dar, das sich zusätzlich noch glandulär differenzierte Strukturen aufweist (MISDORP 2002).

HAMPE und MISDORP (1974) berichten, dass die von ihnen untersuchten Tumoren alle dem einfachen Typ zuzuordnen sind, halten jedoch das Vorkommen von komplexen Typen für möglich.

Plattenepithelkarzinome, die ihren Ursprung im Mammaparenchym oder Zitzenkanal haben, müssen einerseits von Plattenepithelkarzinomen der Haut und ihrer Anhangsorganen unterschieden werden und andererseits von einer Metaplasie des Gangepithels der größeren Gänge infolge von entzündlichen Veränderungen abgegrenzt werden (MISDORP et al. 1999). Die Karzinomzellen zeigen oft Atypien und eine Invasion ins umliegende Gewebe.

In der gültigen WHO-Klassifikation noch nicht beschrieben reiht MISDORP (2002) eine weitere Variante in diese Kategorie der squamösen Karzinome ein: ein selten vorkommendes Karzinom, welches in weiten Teilen einem basaloiden Adenom ähnelt, jedoch invasive und metastasierende Eigenschaften aufweist.

#### **2.6.5. Sarkome**

Mammäre Sarkome repräsentieren annähernd 10-15% der Neoplasien in der Mamma des Hundes, von denen Fibrosarkome und Osteosarkome die häufigsten caninen Sarkome darstellen und Chondro- und Liposarkome sehr selten sind (MISDORP 2002). Dem hingegen

sehen DAHME und WEISS (1999) die Osteochondrosarkome als die häufigsten an, gefolgt von den Osteosarkomen und befinden die Fibrosarkome als selten vorkommend.

### **2.6.6. Karzinosarkom**

Karzinosarkome stellen echte Mischtumoren dar und sind nur in seltenen Fällen zu beobachten (RUTTEMAN 2000). Viele dieser Neoplasien sind gut umschrieben und gehen ähnlich wie die komplexen Karzinome mit relativ langen Überlebenszeiten einher: mittlere Überlebenszeit 18 Monate (MISDORP et al. 1973). Die Metastasen dieser Tumoren sind entweder vom gemischten, sarkomatösen oder karzinomatösen Typ (MISDORP et al. 1999).

### **2.6.7. Karzinom oder Sarkom im benignen Tumor**

Diese Tumoren sind gelegentlich beim Hund zu beobachten. Es handelt sich um Neoplasien, die Foci von maligne erscheinenden Zellen oder unterschiedliche Knötchen solcher Zellen in komplexen Adenomen oder in gutartigen Mischtumoren zeigen (MISDORP et al. 1999). Beispiel ist das sich in einem gutartigen Mischtumor entwickelnde Osteosarkom. Oftmals ist es schwierig zu beurteilen, ob sich die maligne Komponente aus der benignen entwickelt hat oder eine Invasion der bösartigen Geschwulst stattgefunden hat.

## **2.7. Adenome der caninen Mamma**

Drei verschiedene Adenomtypen werden zurzeit in der WHO-Klassifikation (MISDORP et al. 1999) unterschieden, das einfache, das komplexe und das basaloide Adenom.

### **2.7.1. Einfaches Adenom**

Das einfache Adenom ist ein gutartiger Tumor gut differenzierter luminaler Epithelzellen oder Myoepithelzellen vom einfachen tubulären Typ, von denen einige auch Sekretion zeigen. Einfache Adenome sind nach HAMPE und MISDORP (1974) sehr, nach MOULTON et al. (1990) extrem selten. MOULTON (1990) beschreibt das Vorkommen reiner Adenome ebenfalls als weniger häufig, als das hyperplastischer Knoten oder gemischter Tumoren. Auf seine Untersuchungen (MOULTON et al. 1986) verweisend, in denen jegliche Abstufungen zwischen lobulären Adenomen und lobulären Karzinomen beschrieben sind, stellt MOULTON (1990) fest, dass Adenome ein präkanzeröses Stadium darstellen könnten. Während eine Tumorzellinfiltration ins umgebende Stroma die Differenzierung zwischen Karzinom und Adenom eindeutig macht, ist die Abgrenzung des Adenoms zur lobulären Hyperplasie nach MOULTON (1990) oft schwierig. Des Weiteren beschreibt er, dass die Hyperplasie (unilobulär oder multilobulär) meist mehrere Milchdrüsenläppchen betrifft und eine abgegrenzte Masse in der Milchdrüse formt. Die lobuläre Hyperplasie ist der physiologischen Hyperplasie während der Trächtigkeit und Laktation ähnlich. Es sind Lämpchen mit uniformer alveolärer Zellproliferation zu beobachten, Alveolarzellen, in denen

Vesikeln zu sehen sind, Alveolarlumina, die mit azidophilem vakuolisierten sekretorischen Material gefüllt sind, sowie Läppchen in ruhendem Zustand (MOULTON 1990). WALTER et al. (1997) sehen eine Abgrenzung von Hyperplasien zu Neoplasien zum einen durch das Fehlen einer Kapsel bei Hyperplasien bestimmt, zum anderen spielen ihrer Meinung nach die Größe und Differenzierungsgrad der Zellen sowie das Wachstum gegenüber der Umgebung eine Rolle.

### **2.7.2. Komplexes Adenom**

Im Gegensatz dazu kommt das komplexe Adenom beim Hund sehr häufig vor (DAHME und WEISS 1999). Dieser gutartige Tumor besteht nach MISDORP et al. (1999) aus luminalen Epithelzellen und Zellen, die Myoepithelzellen gleichen. Des Weiteren weisen die eben genannten Autoren einerseits auf eine eventuelle Überlappung mit Fibroadenomen, gutartigen Mischtumoren und lobulärer Hyperplasie, sowie andererseits auf die Schwierigkeit, komplexe Adenome von gut differenzierten komplexen Karzinomen zu differenzieren, hin. Kapselbildung, die Abwesenheit von Nekrosen und Atypien sowie eine geringe mitotische Aktivität unterstützen die Diagnose komplexes Adenom.

### **2.7.3. Basaloide Adenome**

In der zur Zeit allgemein genutzten aktuellen WHO-Klassifikation der Mammatumoren sind basaloide Adenome unter dem Vermerk, dass weiterführende Untersuchungen für eine richtige bzw. genauere Klassifizierung dieser Tumoren noch erforderlich sind, wie folgend definiert und beschrieben aufgeführt. Es handelt sich laut MISDORP et al. (1999) um einen gutartigen Tumor der aus uniformen Strängen und Gruppen monomorpher basaloider epithelialer Zellen besteht. Die peripheren Zellen sind palisadenartig gegen eine dünne Basalmembran orientiert. Die zentralen Zellen können keratotische oder glanduläre Differenzierung zeigen.

Des Weiteren wird in der WHO-Klassifikation aufgeführt, dass die beobachteten basaloiden Adenome meist klein und umschrieben sind und nicht metastasieren. MISDORP et al. (1999) erwähnen jedoch, dass in seltenen Fällen eine Metastasierung beobachtet wurde, und diese Tumoren jetzt als Karzinome mit squamöser Differenzierung eingeordnet werden (MISDORP 2002)

Dieser als basaloides Adenom beschriebene Tumortyp wurde erstmalig im Jahr 1977 in einer Versuchstiergruppe von Beaglen, die mit kontrazeptiven Steroiden 5 - 7 Jahre lang behandelt wurden, beobachtet (KWAPIEN et al. 1977). Er stellte 10 % der sich unter dieser Studie entwickelnden Tumoren dar und wurde bei 29 der insgesamt 85 Hündinnen 82-mal diagnostiziert. Die basaloiden Adenome entwickelten sich nur bei Hündinnen, die entweder Progesteron alleine oder in Kombination mit Östrogenen erhalten hatten. Bei alleiniger Östrogengabe wurde diese Tumorart nicht beobachtet. Eine Metastasierung oder Infiltration konnte über einen Zeitraum von 45 Monaten nicht festgestellt werden.

Von 2 weiteren Fällen berichtet ESPLIN im Jahr 1984. Beide Hündinnen zeigten im inguinalen Komplex basaloide Adenome. Eine Metastasierung konnte über eine Zeit von 8 Monaten bei keinem der beiden Tiere festgestellt werden.

Folgend untersuchten DE LAS MULAS et al. im Jahr 2002 spontane basaloide Adenome der Mamma bei 4 Hündinnen. In einer Zeit von 3 - 24 Monaten konnte er weder Rezidive noch eine Metastasierung feststellen.

Im Jahr 2003 bezogen GAMA et al. (2003) einen Fall eines basaloiden Adenoms in ihre immun-histochemischen Untersuchungen den Antikörper p63 betreffend mit ein.

### **Klinisches Bild**

In der Studie von KWAPIEN et al. (1977) zeigten lediglich 2 der 29 betroffenen Hündinnen solitäre basaloide Adenome, während die übrigen eine unterschiedliche Anzahl multipler basaloider Adenome aufwiesen. Als jeweils am häufigsten von dieser tumorösen Veränderung betroffene Mammakomplexe gaben KWAPIEN et al. (1977) mit 91 % die posterioren 3 Mammakomplexe, unter dem der Vermerk mit der nach caudal zunehmenden Inzidenz, an. Des Weiteren stellten sie bezüglich des Wachstumsverhaltens fest, dass nach einer initialen Wachstumsphase die basaloiden Tumoren, nach palpatorischer Beurteilung, statisches Wachstum aufwiesen.

Die beiden von ESPLIN (1984) beschriebenen Fälle wiesen solitäre Tumoren in den inguinalen Mammakomplexen auf. Die Besitzer der Pudelhündin hatten den Tumor bereits vor 8 Monaten festgestellt.

In den Untersuchungen von DE LAS MULAS (2002) zeigen drei der vier Fälle ein multiples Vorkommen dieser Tumore. Angaben zu den betroffenen Mammakomplexen tätigt er in der Form, dass er die Anzahl der jeweils betroffenen Mammakomplexe aufführt. So war in drei der Fälle nur ein Mammakomplex betroffen, während in einem Fall der zweite, dritte und vierte Komplex neoplastische Veränderungen aufwies.

### **Makroskopisches Bild**

KWAPIEN et al. (1977) beschreiben die von ihnen beobachteten basaloiden Adenome als kleine, diskrete Tumoren, welche im allgemeinen einen Durchmesser kleiner 1 cm aufwiesen. Sie sind gut umschrieben, von fester Konsistenz und beim Anschnitt zeigt sich die Anschnittsfläche von gräulich-weißer Farbe. Mit beiden Beschreibungen stimmt DE LAS MULAS (2002) in seinen Beobachtungen, drei seiner Fälle betrachtend, überein. Nur ein Fall, jener, der multiple Adenome an mehreren Komplexen zeigt, weist eine Neoplasie (sich über den 2. und 3. Mammakomplexe streckend) im Durchmesser 8 cm auf, sowie eine weitere von 5,5 cm im Durchmesser (vierten Mammakomplex), welche sogar Ulzerationen der Haut aufweist.

Den Ausführungen von ESPLIN (1984) ist nur die Größe für den Tumor der Husky Hündin von 2,5 x 2,0 cm zu entnehmen sowie die Tatsache, dass eben genannter Tumor zystische Veränderungen aufwies.

## **Histologisches Bild in der HE-Färbung**

Die basaloiden Adenome zeigen sich als gut umschriebene, von ihrem umgebenden Gewebe gut abgesetzte, Tumoren (KWAPIEN et al. 1977; ESPLIN 1984; DE LAS MULAS et al. 2002). Während DE LAS MULAS (2002) und ESPLIN (1984) eine gut ausgebildete Kapsel bei allen ihren Fällen beobachten, ist diese bei den Untersuchungen von KWAPIEN et al. (1977) nur in einem Viertel der Fälle feststellbar. In den Tumoren ziehendes fibröses Gewebe, welches diesem ein septiertes Aussehen verleiht, wird von KWAPIEN et al. (1977) beschrieben. Übereinstimmend stellen DE LAS MULAS et al. (2002) und KWAPIEN et al. (1977) fest, dass die basaloiden Tumoren wenig, aber ein charakteristisches Stroma besitzen, welches oft leere Spalten aufweist und so den Eindruck eines mikrozystischen Geschehens und falscher Lumina vermittelt.

Die den Tumor bildenden Zellen sind in Form von Strängen, Gruppen oder Nestern angeordnet (KWAPIEN et al. 1977; ESPLIN 1984; DE LAS MULAS et al. 2002). ESPLIN (1984) bezeichnet die Struktur auch als perlenkettenartige, an Basalzelltumoren erinnernde Stränge. Periphere Zellen sind als zu den inneren Zellen perpendicular stehend und palisadenartig gegen eine dünne Basalmembran orientiert angeordnet beschrieben. Keratotische Herde mit spiralförmig geschichteten Keratinlamellen beobachten ESPLIN (1984) und DE LAS MULAS et al. (2002) in allen ihren Fällen und KWAPIEN et al. (1977) in 88% ihrer Fälle. Einige wenige Tumoren, welche zum größten Teil aus Keratin bestehen und nur eine schmale Schicht basaloider Zellen in ihrer Peripherie zeigen, sehen KWAPIEN et al. (1977) in ihren Untersuchungen.

ESPLIN (1984) beschreibt die neoplastischen Zellen als runde, basaloide Epithelzellen. Während DE LAS MULAS et al. (2002) in ihrer morphologischen Beschreibung runde bis ovoide euchromatische Nuklei, die keine Mitosen aufweisen und von wenig Zytoplasma umgeben sind, beobachten, sehen KWAPIEN et al. (1977) die isomorphen Tumorzellen, welche in der Peripherie palisadenartig angeordnet sind, als kuboid an und beobachten, dass die zentralen, ziellos angeordneten Zellen in ihrer Form größer als die erstgenannten sind. Auch KWAPIEN et al. (1977) sehen Parallelen in der Ähnlichkeit der Struktur der basaloiden Adenome zum einen zu den Basalzelltumoren der Haut und den Tumoren der Hautanhangsorgane, insbesondere dem Zylindroma und Syringadenoma, und zum anderen zum Basalzelladenoma der Speicheldrüsen des Menschen.

## **Immunhistologische Befunde**

Immunhistochemische Färbungen an basaloiden Adenomen wurden nur von DE LAS MULAS et al. (2002) an 4 Fällen und von GAMA et al. (2003) an einem einzigen Fall durchgeführt.

DE LAS MULAS et al. (2002) schreiben den neoplastischen Zellen der basaloiden Adenome einen Basalzellimmunophenotyp (CK 5 und 14: positive Reaktion) zu, der weder glanduläre

(CK 8, 18, 19: negativ) noch eine myoepitheliale (Calponin: negativ) Differenzierung aufweist.

GAMA et al. (2003) bezogen in ihre immunhistochemischen Untersuchungen mit dem Antikörper p63 einen Fall eines basaloiden Adenoms mit ein. Sie beobachteten eine starke positive Reaktion der peripheren basalen Zellen, während die zentralen Zellen eine negative Reaktion aufwiesen.

### **Elektronenmikroskopisches Bild**

Das elektronenmikroskopische Bild wurde von KWAPIEN et al. (1977) anhand von 5 deparaffinierten formalinfixierten basaloiden Adenomen untersucht und wie folgend dargestellt beschrieben:

Die individuellen basaloiden Zellen sind in engen Strängen und Nestern angeordnet und bestehen aus 2-8 Zellschichten, wobei die periphere Schicht gegen eine dünne Basalmembran orientiert ist. Das Stroma zeigt sich als zellarm und enthält überall einzelne Kollagenfibrillen. Große isolierte Fibroblasten zeigen prominente zytoplasmatische Prozesse.

Die basalen epithelialen Zellen sind rund bis kuboidal und oft senkrecht zur Basalmembran ausgerichtet. Die Nuklei sind rund, ovoid oder länglich, zeigen ein gleichmäßig verteiltes Chromatin und besitzen ein bis zwei Nukleoli. Die Kernmembranen haben oft zahlreiche Falten und gelegentlich werden einzelne, große nukleäre Einbuchtungen beobachtet. Das Zytoplasma zeigt eine moderate Anzahl ovaler oder länglicher Mitochondrien, rauhes endoplasmatisches Reticulum ist nur spärlich vorhanden, freie Ribosome sind leicht verstreut im Zytoplasma. Die Zellen enthalten reichlich Tonofibrillen, die sich meistens in der perinukleären Region oder entlang der Zellmembran konzentrieren. Gelegentlich ist zu sehen, dass Tonofibrillen an Desmosomen und damit an der Zellmembran verankert sind. Eine Vielzahl an Desmosomen sind zwischen angrenzenden Zellen ausgebildet. Aus den zahlreichen Falten der Zellmembran zwischen angrenzenden Desmosomen resultiert eine irreguläre Interdigitation zwischen den Zellen.

Zellen, welche sich mehr im Zentrum der Stränge befinden, zeigen sich in ihrer Gestalt als länglicher und mehr von polygonaler Form. In diesen Zellen sind gelegentlich komplexe Aggregationen von Tonofibrillen zu beobachten und dichte Akkumulationen von Keratohyalin. Gelegentlich sind keratinisierte Zellen mit dichten Zytoplasmamembranen und degenerierender Matrix zu sehen. Der Keratinisierungsprozess stellte sich als abrupt dar, transitionale Schichten wie beim Keratinisierungsprozess der Epidermis sind nicht zu beobachten. Einige Zellen zeigen Mikrovilli an ihren Oberflächen und formen flache oder komprimierte, drüsenähnliche Lumina. Andere Zellen zeigen prominente intrazytoplasmatische Lumina, die mit irregulären Mikrovilli ausgekleidet sind und ein verdichtetes periluminales Zytoplasma aufweisen. Diese Zellen besitzen Tonofibrillen und Keratohyalin in ihren Zytoplasma, eine Tatsache, die auf eine glanduläre und keratotische Differenzierung hinweist. Typisches sekretorisches Epithel oder Myoepithel ist nicht zu beobachten.

## **Zusammenfassende Beurteilung der basaloiden Adenome**

KWAPIEN et al. (1977) und DE LAS MULAS (2002) sehen den Ursprung dieser basaloiden Adenome im Mammagewebe und sehen keinen Hinweis auf eine Verbindung zur darüber liegenden Haut oder ihren Anhangsorganen. Es scheint, dass die Tumoren von den Milchdrüsenläppchen oder dem terminalen Ductus, der in das Milchdrüsenläppchen eintritt, ausgehen (KWAPIEN et al. 1977; DE LAS MULAS et al. 2002). Aufgrund ihrer Beobachtungen in zweien ihrer Fälle, die in der Nähe der basaloiden Adenome azinäre und duktale proliferative Veränderungen aufwiesen, postulierten DE LAS MULAS et al. (2002) ein multizentrisches simultanes Geschehen.

Die Morphologie basaloider Adenome betrachtend, erinnern sie an Basalzellentumoren der Haut, an Tumoren der Hautanhangsorgane, insbesondere das Zylindrom und Spiradenom und an das basaloide Adenom der Speicheldrüsen des Menschen (KWAPIEN et al. 1977; DE LAS MULAS et al. 2002).

Das lichtmikroskopische sowie das elektronenmikroskopische Bild der neoplastischen basaloiden Zellen weist die charakteristischen Merkmale der Basalzellen der Epidermis und der Zellen der eben genannten Tumoren auf (KWAPIEN et al. 1977). Das immunhistochemische Profil wird von DE LAS MULAS et al. (2002) dem Basalzellphänotyp zugeordnet. Auch sie sehen Parallelen zu den Basalzellen der Haut und führen, ihre These unterstützend, die in den basaloiden Adenomen beobachteten Keratinisierungsprozesse an.

Zusammenfassend stellen KWAPIEN et al. (1977) fest, dass es sich bei den basaloiden Adenomen um benigne Tumoren des Mammaparenchyms handelt, deren Entstehungsweise möglicherweise durch exogene Progestagengaben induziert ist.

DE LAS MULAS et al. (2002) betonen den basalzellartigen Immunophänotyp der neoplastischen Zellen der basaloiden Adenome.

Aus den Beobachtungen, dass in einem der Fälle basaloide Adenome in der Umgebung eines soliden Karzinoms beobachtet werden konnten, folgern sie, dass hier eine maligne Transformation stattgefunden hat, die jedoch nicht beweisbar ist. Ihre Ergebnisse, dass weder Östrogen alpha- , noch Progesteronrezeptoren an den Zellkernen der neoplastischen Zellen der basaloiden Adenome nachweisbar waren, diese Rezeptoren jedoch an den Nuklei von azinären und dukталen Epithelien nachzuweisen waren, erklären sie wie folgt: Progestagene wirken auf die mit Hormonrezeptoren ausgestatteten differenzierten Zellen und induzieren eine Wachstumshormonproduktion und -ausschüttung, die ihrerseits undifferenzierte Stammzellen zur Proliferation anregt und somit proliferative Gewebeveränderungen hervorrufen kann.

## **2.8. Duktale und lobuläre Hyperplasien**

Die meisten epithelialen Hyperplasien in den terminalen Ductus manifestieren sich als hyperplastische Veränderungen der extralobulären Gänge (duktales Hyperplasien) und/oder



intralobulärer Gänge (lobuläre Hyperplasie). In einigen Fällen kann eine Differenzierung zwischen diesen schwierig oder sogar auch unmöglich sein (MISDORP et al.1999).

Eine weitere lobuläre Veränderung stellt die Adenosis dar, die durch ein Spektrum von proliferativen und regressiven Veränderungen charakterisiert ist mit Beteiligung der Epithel-, Myoepithel- und Bindegewebszellen.

### **2.8.1. Duktale Hyperplasien**

Es liegt eine nicht neoplastische Veränderung vor, die durch eine intraduktale Proliferation epithelialer Zellen charakterisiert ist und in einigen Fällen zu partiellen oder auch totalen Obliteration des Ganges führen kann (MISDORP 2002). Die Hyperplasie kann diffus oder auch multifokal sein und nach ihrer Wuchsform als *Papillomatosis* oder *Epitheliosis* bezeichnet werden. Eine kleine Größe, eine Uniformität der Zellen und Zellkerne, die Abwesenheit von Mitosen sowie eine sichtbar myoepitheliale Schicht sprechen für die Benignität dieser Veränderung und führen zu der Bezeichnung *reguläre duktale Hyperplasie*. Wenn eine Atypie der hyperplastischen Zellen feststellbar ist, wird der Terminus *atypische duktale Hyperplasie* benutzt. Die Differenzierung von intraduktalen Karzinomen basiert auf dem Grad der zellulären und nukleären Atypie, kann aber nach MISDORP et al. (1999) mitunter schwierig sein.

Duktale Hyperplasien mit moderater und markanter Atypie wurden von GILBERTSON et al. (1983) als präkanzerös und mit einer größeren Gefahr, sich zu einem invasiven Karzinom zu entwickeln, eingeschätzt als duktale Hyperplasien mit normotypischen Zellen.

### **2.8.2. Lobuläre Hyperplasien**

Bei den lobulären Hyperplasien sind zwei Typen zu unterscheiden. Die epitheliale Hyperplasie und die Adenosis.

#### **2.8.2.1. Epitheliale Hyperplasie**

Die epitheliale Hyperplasie ist durch eine nicht neoplastische Proliferation epithelialer Zellen in intralobulären Gängen gekennzeichnet. Ähnlich der Hyperplasien in den extralobulären Gängen, können auch hier die Formen einer Papillomatosis oder Epitheliosis unterschieden werden.

#### **2.8.2.2. Adenosis**

Die nicht neoplastische Proliferation von kleinen Gängen, welche zu einer erhöhten Anzahl führt, wird als Adenosis bezeichnet (MISDORP 2002). Die Adenosis besteht aus den folgend aufgeführten Komponenten, in unterschiedlichen Anteilen: gang- und sekretorisches Epithel, Myoepithel und Bindegewebe. Bei prominenter Bindegewebsproliferation wird die Veränderung als sklerosierende Adenosis bezeichnet. Das Wachstum in lobulären Strukturen

kann intramural (intraduktal), exophytisch ins Lumen oder periduktal sein. Die periduktale Wuchsform kann besonders bei gleichzeitiger Fibrose ein infiltrierendes Karzinom simulieren (MISDORP et al. 1999).

Die Adenosis ist beim Hund oft als unilobuläre Hyperplasie präsent oder in Verbindung mit einer multilobulären Hyperplasie oder einer adenomatösen Hyperplasie, einer intermediären Phase zwischen der lobulären Hyperplasie und einem Adenom oder einem gutartigen Misch tumor (MISDORP 2002). Im Stroma können Entzündungszellen prominent sein.

Die Beibehaltung lobulärer Strukturen, fehlende Infiltration und eine intakte myoepitheliale Schicht sprechen für einen gutartigen Prozess.

Die Adenosis ist beim Hund weitaus weniger häufig als beim Menschen.

## **2.9. Histologische Grundlagen für die Immunhistochemie der Antikörper LP34, AE1, CK 14 und HHF35**

Die zytoplasmatische Grundsubstanz jeder eukaryotischen Zelle wird von einem feinen Gerüst, dem Zytoskelett durchzogen, das mit der äußeren Zellmembran und den Zytomembranen der Zellorganellen verbunden ist (STÜNZI und WEISS 1990). Es besteht aus einem hochgradig strukturierten, dreidimensionalen Proteinnetzwerk, das elektronenmikroskopisch filamentöse und tubuläre Strukturen erkennen lässt. Das Zytoskelett besorgt zum einen die räumliche Organisation der Zelle, die Stabilität, andererseits die Bewegungsvorgänge wie intrazellulären Transport, die Ausschleusung von Sekretvesikeln, die Bewegung der Zelloberfläche und gegebenenfalls die Kontraktion oder die Motilität der ganzen Zelle, sowie Funktionen in der Zellteilung (MOORE 1989; STÜNZI und WEISS 1990).

Das Zytoskelett besteht in der Regel aus vier morphologisch und funktionell unterschiedlichen Fasersystemen, sowie interzellulären Zellverbindungen (Desmosome, Hemidesmosome, Zonula adhaerens), Spectrinen und Kernlaminbestandteilen (SCHLIWA 1986, WEBER und GEISLER 1985, WEBER und OSBORN 1986).

Nach BADEN et al. (1973), SCHLIWA (1986), LUBY-PHELPS (1994) sind 4 Fasersysteme entsprechend ihre Größe und Struktur zu unterscheiden:

1. Mikrofilamente
2. Intermediärfilamente
3. Myosinfilamente
4. Mikrotubuli

Nahezu alle Zellen enthalten Elemente dieser Zytoskelettkomponenten, allerdings in unterschiedlichen Mengen und Zusammensetzungen (WALTER 1998). Die Anwendung immunhistochemischer Methoden erlaubt, die einzelnen Bestandteile zu unterscheiden und ihr unterschiedliches Vorkommen in verschiedenen Geweben zu beschreiben (BUCHER und WARTENBERG 1997)

### 2.9.1. Intermediärfilamente

Intermediärfilamente liegen in ihrer Größe, mit einem Durchmesser von 7-11nm, zwischen (intermediär) den Mikrotubuli und den Mikrofilamenten. Mitte der sechziger Jahre wurden sie zum ersten Mal elektronenmikroskopisch dargestellt und entsprechend ihrer Größe als 10nm (100Å) Filamente angesprochen (Biberfeld et al. 1965; ISHIKAWA et al. 1968). Sie bilden den un- bzw. schwerlöslichen Anteil eukaryonter Zellen, der bis zu 50% der Einzelzelle ausmachen kann (Walter 1998). Intermediärfilamente sind aus fibrillären Proteinmolekülen aufgebaut, wobei die eigentliche Funktion der Intermediärfilamente immer noch unklar ist (Walter 1998); neben Stabilisierungsaufgaben nehmen sie wahrscheinlich auch Regulations- und Signalübertragungsaufgaben wahr (AEBI et al. 1988; BAUER und TRAUB 1995; TRAUB und SHOEMAN 1994).

Die Intermediärfilamente weisen aufgrund ihres Polypeptidcharakters eine hohe Zellspezifität auf (VOS et al. 1989a). Eine gleiche zentrale Aminosäuresequenz ist allen Intermediärfilamenten zu Eigen, die peripheren Domänen zeigen hingegen größere strukturelle Unterschiede (STEINERT et al. 1985; KRÜGER 1996).

Die Intermediärfilamente lassen sich gelelektrophoretisch in 5 Subtypen unterteilen, deren Vorkommen jeweils zellspezifisch ist (OSBORN und WEBER 1982; DUCATELLE 1985; VOS et al. 1989b; HAMADA et al. 1990)

#### Subtypen der Intermediärfilamente nach STEINERT et al. (1985)

<i><b>Gruppe</b></i>	<i><b>Vorkommen</b></i>	<i><b>Molekulargewicht</b></i>
Desmin	Muskel	52 kD
Vimentin	Mesenchymale Zellen	53 kD
Neurofilamente	Neuronale Zellen	65 kD, 105 kD, 135 kD
Gliafilamente	Astroglia	50 kD
<b>Zytokeratine</b>	<b>Epitheliale Zellen</b>	<b>40-70 kD</b>

kD: Kilodalton

Während Zelltransformationen und Tumorentwicklungen bleibt diese Zellspezifität der Intermediärfilamente allgemein konserviert (FRANKE et al. 1978a, b, 1979a; SUN und GREEN 1978a; SUN et al. 1979; BANNASCH et al. 1980; BATTIFLORA et al. 1980; SCHLEGEL et al. 1980a; ALTMANNBERGER et al. 1981; GABBIANI et al. 1981; DENK et al. 1982). Die Klassifikation von Tumoren durch ihre spezifischen Intermediärfilamente ist in der klinischen Histodiagnose sehr wichtig geworden (MOLL et al. 1982). Immunmorphologische Methodik dient dem Nachweis dieser Intermediärfilamente und somit der histogenetischen Zuordnung der neoplastisch entarteten Zellen. Von großem Nutzen ist dies bei Tumoren mit niedrigem Differenzierungsgrad und bei Metastasen.

### 2.9.1.1. Zytokeratine

Da es sich beim Mammagewebe um Zellen epithelialen Ursprungs handelt, werden nun die Zytokeratine eingehender besprochen.

Die Expression der Zytokeratine ist einerseits mit dem Zelltyp, andererseits mit dem Differenzierungsgrad des jeweiligen Epithels korreliert (WALTER 1998).

Zytokeratine werden ausschließlich in epithelialen Zellen exprimiert, nichtepitheliale Gewebe enthalten keine Zytokeratinfilamente (MUIJEN et al. 1983, VOS et al. 1989a; IVANYI et al. 1993). Sie treten in den epithelialen Zellen meistens paarweise auf und lassen sich entsprechend ihren Ladungsverhältnissen (EICHNER et al. 1984, SCHILLER et al. 1982), ihrer mRNA-Hybridisierung (FUCHS und GREEN 1981), ihrer Aminosäuresequenz (STEINERT et al. 1983) und ihrer Immunreaktion (HEID et al. 1988 a, b) in 2 Unterfamilien einordnen. Es sind 20 verschiedene Zytokeratinpolypeptide bekannt, die in Paaren auftreten und mit einer strikten Spezifität zu einem Gewebe exprimiert werden (MOLL 1982, 1993).

Die Zytokeratine werden nach dem Verzeichnis von MOLL et al. (1982) von 1 - 20 beziffert.

<b>Subfamilie Typ I</b> (sauer)	<b>Subfamilie Typ II</b> (neutral - basisch)
Enthält die Zytokeratine 9 - 20 - Molekulargewicht: zwischen 40 - 64 kD - isoelektrische Punkte zwischen pH: 4,8 - 6,1	Enthält die Zytokeratine 1 - 8 - Molekulargewicht: zwischen 54 - 70 kD - isoelektrische Punkte zwischen pH: 5,8 - 8,0

kD: Kilodalton

Jedes Gewebe exprimiert sein eigenes Zytokeratinmuster, welches durch unterschiedliche Aminosäuresequenzen, verschiedene isoelektrische Punkte und Molekulargewichte charakterisiert ist (MOLL et al. 1982). Die Zytokeratine werden in vivo in gewebetypischen sauer/basisch Kombinationen exprimiert (FUCHS 1988; MOLL et al. 1982b; QUINLAN et al. 1985; SUN et al. 1984)

Da das Zytokeratinmuster auch in neoplastisch verändertem Gewebe und entdifferenzierten Zellen nahezu vollständig erhalten bleibt (MOLL et al. 1982; IVANYI et al. 1993), ist es möglich, dieses in Metastasen, Mikrometastasen oder Tumorzellemboli nachzuweisen und so die Herkunft der Sekundärtumoren zu bestimmen.

Des Weiteren gelten Zytokeratine als Marker für verschiedene epitheliale Differenzierungsgrade (OSBORNE und WEBER 1982; FRITSCHKE et al. 1991; IVANYI et al. 1993), d.h. dass die verschiedenen Zelltypen während der basalen Differenzierung unterschiedliche Zytokeratinmuster aufweisen (KRÜGER 1996).

### 2.9.1.2. Zytokeratine beim Hund

Die Zytokeratinmuster der epithelialen Zellen sind beim Hund noch nicht so umfassend untersucht wie beim Menschen. Durch Untersuchungen mit humanen zytokeratinspezifischen Antikörpern ergab sich, dass diese Antikörper auch mit den epidermalen Zellen des Hundes reagieren (MAGNOL et al. 1985; SUTER et al. 1987). Die Zytokeratine beider Spezies werden also durch die gleichen Antikörper erkannt (Kreuzreaktivität), was die Gleichartigkeit der Epitope beweist.

VOS et al. (1989 a, b) stellten zunächst fest, dass die Polypeptide der Intermediärfilamente verschiedener Tierarten eine hohe Homogenität aufweisen. Durch Untersuchungen von RABANAL et al. (1989) wurde die Existenz vergleichbarer Zytokeratinzusammensetzungen in humanen und caninen epithelialen Zellen bestätigt und auch eine Ähnlichkeit im Verteilungsmuster festgestellt. FRANKE et al. (1979b) fanden in Zellkulturen unterschiedlicher Spezies (Mensch, Meerkatze, Rind, Hund, Kaninchen, Hamster, Ratte, Maus) eine weitgehend übereinstimmende Expressierung von Zytokeratinen und Vimentin.

### 2.9.2. Mikrofilamente

Mikrofilamente sind im Durchmesser ca. 6 nm groß und weisen ein Molekulargewicht von etwa 42 000 D auf. Das Hauptstrukturelement der Mikrofilamente ist das fibrilläre **Aktin** (F-Aktin), das in *sieben Isoformen* exprimiert wird, die in Röntgenbeugungsbildern den Aufbau einer aus Monomeren bestehenden Helix zeigen (AMOS 1985; ISHIKAWA et al. 1969; SCHLIWA 1986). Ein F-Aktinfilament besteht aus Monomeren globulärer Gestalt (G-Aktin), die aus zwei Proteindomänen aufgebaut sind und hantelförmige Gestalt besitzen. In Gegenwart von ATP polymerisieren diese Monomere zu fibrillärem F-Aktin. Die spezifische Aneinanderlagerung der hantelförmigen Aktin-Monomere ergibt im elektronenmikroskopischen Bild eine spiralförmige Faserstruktur.

Aktin ist ein hoch konserviertes, ubiquitäres zytoskellerales Protein von Muskel- und Nicht-Muskelzellen. Neben der Bedeutung der Aktinfilamente bei der Muskelbewegung kann Aktin auch in Nicht-Muskelzellen Bewegungsvorgänge bewirken (KARSLON et al. 1994). Im Zytoplasma sind eine Vielzahl von aktinbindenden Proteinen beschrieben worden, welche für die Vernetzung von Aktinfasern, für deren Membranverankerung und für spezielle Funktionen einzelner Zellen benötigt werden (KARLSON et al. 1994). So sind Monomere und Polymere des Aktins in viele Zellfunktionen involviert: Bewegung, Zytokinese, Sekretion, Signalübertragung und vieles mehr (CARLIER und PANTALONI 1994; STOSSEL 1993).

## 2.10. Molekularbiologische Grundlagen für die Immunhistochemie des Antikörpers Anti-Human p63-Protein

Das monoclonale Mouse Anti-Human p63 Protein markiert im Zellkern bestimmter Zellen das p63 Protein. Dieses p63 Protein ist ein Mitglied der p63 Familie, die ebenfalls p73 enthält. Es ist als p53 homologon charakterisiert und wird einheitlich von basalen/somatischen Zellen, von Schichtplattenepithelien, Myoepithelien der Milchdrüse und Speicheldrüsen sowie im proliferativen Kompartement der Magenmucosa exprimiert (REIS-FILHO und SCHMITT 2002). YANG et al. (1998) sehen die prädominante Lokalisation des p63 Proteins in der Basalschicht von Schichtplatten- und Übergangsepithelien. Diese Basalzellen fungieren als Progenitoren der Suprabasalzellen, die in den regenerativen Epithelien Differenzierung und Apoptose durchlaufen (JETTEN et al. 1997). Nach REIS-FILHO und SCHMITT (2002) ist p63 auf dem langen Arm von Chromosom 3 (3q27) lokalisiert. Mindestens sechs verschiedene Transskriptionen leiten sich aus alternativen mRNA-Splicing ab und codieren Proteine mit zwei unterschiedlichen N-Termini (TA und delta N) sowie drei unterschiedlichen C-Termini (alpha, beta, gamma). Die Proteinisotypen TA p63 alpha, TA p63 beta und TA p63 gamma enthalten die N-terminale Transaktivierungs (TA)-Domäne, wogegen diese Domäne bei den 3 anderen Isotypen fehlt.

p53 ist ein bedeutsamer Transkriptionsfaktor, der regulatorische Funktionen für den Zellzyklus und die Apoptose, insbesondere bei der Reaktion auf Stimuli aus der Umwelt, wie zum Beispiel DNA - Beschädigungen und Hypoxie, besitzt (LIVING-STONE et al. 1992; LOWE et al. 1993). Mäuse mit einem p53 Mangel weisen keine Defizite auf, so dass MILLS et al. (1999) vermuten, dass p53 verwandte Proteine, wie p63 und p73, die Funktionen in der Regulation des Zellzyklus übernehmen und damit den Defekt kompensieren.

MILLS et al. (1999) untersuchten Mäuse mit einem p63-Mangel und stellten fest, dass diese zwar lebend, aber mit erheblichen Defekten geboren werden. Hintergliedmaßen sind nicht ausgebildet, und die Vordergliedmaßen sind verkürzt, d.h. Phalangen und Carpalknochen fehlen. Veränderungen an Ulna und Radius sind ebenfalls zu beobachten. Die Haut der Tiere entwickelt sich nach einem frühem Entwicklungsstadium nicht mehr: eine Stratifizierung sowie jegliche Anzeichen von Differenzierung fehlen. Strukturen, die in ihrer Entwicklung von epidermalen-mesenchymalen Interaktionen abhängig sind, wie Haarfollikel, Zähne und die Milchdrüse, fehlen vollständig (MILLS et al. 1999). Daraus ist ersichtlich, dass das Protein p63 eine essentielle Rolle für verschiedene ektodermale Differenzierungen spielt. Die Schlüsselrolle von p63 in der Embryogenese wird ebenfalls von YANG und MCKEON (2000) dokumentiert. REIS-FILHO und SCHMITT (2002) postulieren die signifikante Rolle des p63 Proteins in der normalen Entwicklung der Milchdrüse und auch die in der Aufrechterhaltung einer epithelialen Stammzellpopulation.

Ein ähnliches Krankheitsbild wird bei Menschen mit dem EEC-Syndrom beobachtet, einer autosomalen Krankheit, die durch Ektrodaktylie, ektodermale Dysplasie und Gesichtsspalten charakterisiert ist. Hierbei wurde festgestellt, dass nicht miteinander verwandte Patienten dominante, heterozygote p63-Mutationen aufweisen (CELLI et al. 1999).

## 2.11. Zytokeratinmuster der Mamma

In der Mamma werden die Zytokeratine 5, 7, 8, 14, (15), 17, (18), 19 exprimiert: Luminal wird CK 8/18, basal CK 5/14 und CK 5/17 gebildet (ALTMANNBERGER et al. 1985a, 1986; DEBUS et al. 1984; MOLL et al. 1993; REMAEKERS et al. 1983b)

WALTER (1995) untersuchte 10 Proben caninen pathologisch unveränderten Gewebes mittels Immunhistochemie und Western Blot zur Darstellung des Zytokeratinmusters in diesem Gewebe. Seine Ergebnisse sind in folgender Tabelle aufgeführt:

### Untersuchungsergebnisse von WALTER (1995)

Normales Mammagewebe	AE1	AE3	8/18	7	8	10	13	14	17	18	19	20
<b>Alveolarepithel</b>	10/0	1/9	10/0	10/0	2/8	0/10	1/9	0/10	0/10	7/3	5/5	0/10
<b>Myoepithel</b>	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	8/2	0/10	0/10	0/10	0/10
<b>Ductepithel</b>	10/0	0/10	10/0	10/0	0/10	5/5	1/9	0/10	0/10	8/2	6/4	0/10
Western Blot	++	+	++	+	-	+	+	+	-	+	+	-

- keine Reaktion; + klare Reaktivität; ++ starke Reaktivität /AE1 (CK10, 14, 16, 19) / AE3 (CK 1, 5, 8)

Die Antikörper AE1 (CK 10, 14, 16, 19), CAM 5.2 (CK 8/18), Ks 7.18 und LDS-68 (beide CK 7) stellten in allen untersuchten Fällen das alveoläre und duktales Epithel dar. Die Antikörper Ks 18.04 oder Cy - 90 (beide CK 18) färbten ebenfalls das alveoläre Epithel immer, das duktales nur in der Hälfte der Fälle. Der Antikörper CKB1, welcher gegen das Zytokeratin 14 gerichtet ist, markierte zuverlässig das Myoepithel.

### Zytokeratinmuster der Mamma, nach WALTER (1995)

• <b>Luminale alveoläre Zellen</b>	AE1, CK 7, CK8/18, CK 18
• <b>Luminale duktales Zellen</b>	AE1, CK 7, CK 8/18, CK 19
• <b>Basale myoepitheliale Zellen</b>	CK 14

Ein ähnliches Zytokeratinmuster stellten VOS et al. (1993c) fest, als sie physiologisches Mammagewebe von 5 Hündinnen untersuchten: Während das Epithel der Alveolen und Gänge eine Reaktivität für CK 7, 8, 18 und 19 zeigte, reagierten die myoepithelialen / basalen Zellen mit dem gegen CK 14 und CK 14/17 gerichteten Antikörper. Des Weiteren setzten VOS et al. (1993c) noch einen Antikörper ein, der gegen die CK 5/8 gerichtet ist. Epithelzellen und myoepitheliale/basale Zellen zeigten eine starke Reaktivität.

Der Nachweis des Zytokeratins 14 in basalen/myoepithelialen Zellen sowie des Zytokeratins 18 in luminalen, alveolären und duktales Epithelzellen wurde ebenfalls von GRIFFEY et al. (1993) erbracht.

Für die Zytokeratine 8/18 und 19 stellten DESTEXHE et al. (1993) eine positive Reaktivität des alveolären und duktales Epithels fest, sowie eine moderate Anfärbbarkeit des Myoepithels durch den Antikörper, der gegen das Zytokeratin 19 gerichtet ist.

**Zusammenfassende Darstellung der nach VOS et al. (1993c), GRIFFEY et al. 1993 und DESTEXHE et al. (1993) ermittelten Zytokeratinmuster der Mamma**

<b><u>Zytokeratinmuster der Mamma</u></b>			
	<b>nach VOS et al. (1993c)</b>	<b>nach GRIFFEY et al. (1993)</b>	<b>nach DESTEXHE et al. (1993)</b>
• <b>Alveoläres und duktales Epithel</b>	CK 5/8, 7, 8, 18, 19	CK 18	CK 8/18, 19
• <b>Myoepitheliale / basale Zellen</b>	CK 5/8, 14, 14+17	CK 14	CK 19

## **2.12. Die Myoepithelzelle der Mamma und ihre Nachweismöglichkeiten**

Die Schwierigkeit in der Beurteilung des Myoepithels besteht in der Vielgestaltigkeit der Zellen, der teilweise schweren Abgrenzbarkeit der Myoepithelzellen von Fibroblasten und Fibrozyten, sowie in der Fähigkeit des Myoepithels, auch metaplastisch Knorpel oder Knochen zu bilden (GUTBERLET et al. 1998).

Das Bestreben, myoepitheliale Zellen in der Mamma sicher zu identifizieren und nachweisen zu können, entspringt in der Veterinärmedizin und Humanmedizin teils gleichen, aber auch unterschiedlichen Interessen.

In der Humanmedizin dient die Identifizierung einer intakten, d.h. kontinuierlichen Myoepithelzellschicht als Kennzeichen nichtinvasiver mammärer Veränderungen, zu denen benigne Tumoren und duktales Carcinoma in situ (DIC) gehören (Yaziji et al. 2000). Der Verlust der Myoepithelzellschicht ist repräsentativ für invasive Carcinome (IC). Die Ansicht, dass die myoepitheliale Schicht in benignen proliferativen mammären Veränderungen und im Carcinoma in situ, mit der möglichen Ausnahme der mikroglandulären Adenosis intakt erhalten bleibt, ist weit verbreitet (AHMED 1974; BUSSOLATI 1980, 1981; GOULD et al. 1980; GUSTERSON et al. 1982) und die Feststellung dieser myoepithelialen Schicht ist somit essentiell für Therapie und Prognosestellung.

Dieses Kriterium ist ebenfalls in der Veterinärmedizin von Relevanz, so beobachteten VOS et al. (1993b) ebenfalls, dass maligne Mammatumoren durch die Abwesenheit einer myoepithelialen Schicht gekennzeichnet sind.

Zudem ist veterinärmedizinisch die Erforschung der Rolle der Myoepithelzellen in der Genese von komplexen Tumoren und Mischtumoren (MISDORP et al. 1999) von großem



Interesse, insbesondere die Herkunft des Kochen- und Knorpelgewebes in Mammatumoren, welches von MONLUX et al. (1977) als Metaplasie des Epithels, von VOS et al. (1993) als Metaplasie des Bindegewebes und von DESTEXHE et al. (1993), PULLEY (1973) und TATEYAMA und COTCHIN (1977) als Metaplasie des Myoepithels angesehen wird. Beim Hund sind ca. 50 % der Mammatumoren benigne, wobei die benignen Mischtumoren neben den komplexen Adenomen am häufigsten unter ihnen vertreten und daher von großem Interesse sind (HELLMÈN 2000). Zu erwähnen ist, dass MISDORP im Jahr 2002 neben der Möglichkeit des myoepithelialen Ursprungs dieser benignen Mischtumoren auch eine Histogenese aus multipotenten Stammzellen für möglich hält.

Histogenetische Klassifizierungen der Mammatumoren erfordern genaue Kenntnis über die Herkunft der neoplastischen Zellen. So räumen auch MISDORP et al. (1999) ein, dass weitere Untersuchungen, das häufige Vorkommen myoepithelähnlicher Zellen in Karzinomen betreffend, berechtigt sind, lehnten jedoch die von DESTEXHE et al. (1993) geforderte Bildung einer größeren Kategorie pleomorpher Karzinome im Klassifizierungsschema ab.

### **2.12.1. Die Myoepithelzelle**

Myoepithelzellen sind vorwiegend in Endstücken exokriner Drüsen ektodermaler Herkunft (Milchdrüse, Schweißdrüse, Speicheldrüsen, Tränendrüse) zwischen Drüsenepithel und Basalmembran eingeschaltete kontraktile Zellen. Sie leiten sich wie das Drüsenepithel vom Ektoderm her und gleichen in Bezug auf ihre inneren Organisation und Funktion glatten Muskelzellen (WIESNER und RIBBECK 2000), d.h. ihr Zytoplasma enthält wie dasjenige glatter Muskelzellen Aktin- und Myosinfilamente (MOSIMANN und KOHLER 1990). Erwähnend, dass eigentlich wenig über den Ursprung dieser Zellen bekannt ist, betrachtet PULLEY (1973) das Myoepithel aufgrund der Abstammung der Milchdrüse von der Epidermis und der Lokalisation des Myoepithels auf der epithelialen Seite der Basalmembran ebenfalls als ektodermalen Ursprungs. Elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen sowie die PAS-Färbung stellen ihre Lage als sich direkt an der Zellbasis der Drüsenepithelien befindende, vom Stroma durch die Basalmembran abgegrenzte Schicht, gut dar. Myoepitheliale Zellen zeigen Züge beider Differenzierungen, epithelialer und derer glatter Muskelzellen (YAZIJI et al. 2000). So zeigen sie in ultrastrukturellen Untersuchungen Desmosomen und Tonofilamente als Beweis ihrer epithelialen Differenzierung. Ebenfalls enthalten sie Mikrofilamente mit einem Durchmesser von 50-70 Å und dense bodies als Beweis der Expression ihrer glatten Muskelzellgene. Zusätzlich ist mRNA-Expression von Kollagen Typ IV, Heparinsulfat, Proteoglykanen und Fibronectin bekannt (NEHRLICH et al. 1998). Sie exprimieren außerdem Lamininrezeptoren (VIACAVA et al. 1997) und größere Mengen Proteinaseinhibitoren (STERNLICHT et al. 1997).

Eine Proliferation der Myoepithelzellen wird während der Schwangerschaft und Laktation durch Oxytocin induziert (SAPINO et al. 1993). Die Zellen nehmen an Größe zu und kontrahieren sich als Antwort auf Oxytocin, welches sie spezifisch binden (SOLOFF et al. 1993; ZAVIZION et al. 1992). Myoepithelien zeigen nach YAZIJI et al. (2000) nur in frühen

Stadien der Schwangerschaft aktive Zellteilungen, ganz im Gegensatz zu den Epithelzellen, die sich kontinuierlich in der Schwangerschaft und Laktation teilen. JOSHI et al. (1986) sind der Meinung, dass die Zellproliferationsrate zur Geburt hin zurückgeht, wenn die Zellen reich an zytoplasmatischen Filamenten sind, die für die kontraktile Funktion notwendig sind.

Myoepithelzellen kontrahieren sich unter dem Einfluss des Hypophysenhinterlappen-Hormons Oxytocin und tragen damit entscheidend zur Milchejektion bei (MOSIMANN und KOHLER 1990).

Lichtmikroskopisch ist es in der HE-Färbung nicht immer möglich, Myoepithelzellen zu identifizieren (PULLEY 1973). In seinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen stellte PULLEY (1973) fest, dass das Hauptcharakteristikum zur Identifizierung der Myoepithelzelle die Vielzahl ihrer im Durchmesser 60-80 Å großen Filamente im Zytoplasma ist. Andere Organellen sind selten und meist auf die perinukleäre Region beschränkt. Des Weiteren bestätigte er, dass die myoepithelialen Zellen immer zwischen Basalmembran und Drüsenepithel liegen und wies um die Alveolen und kleinen Gänge eine diskontinuierliche und um die Gänge eine kontinuierliche Schicht myoepithelialer Zellen nach.

### 2.12.2. Myoepitheliale Marker in der Immunhistochemie

Zum Nachweis myoepithelialer Zellen sind unterschiedliche Marker entwickelt worden, die sich signifikant in den von ihnen nachzuweisenden Zielproteinen und in ihrer Sensitivität und Spezifität unterscheiden. Die folgende Tabelle gibt einen kurzen darstellenden Überblick einiger Marker:

Verschiedene Antikörper zur Identifizierung myoepithelialer Zellen

	<b>Antikörper</b>	<b>Nachzuweisendes Antigen</b>	<b>Spezifität</b>
<b>1.</b>	<b>S - 100 - Protein</b> (Calcium-bindendes, saures Protein)	- unbekannt (YAZIJI et al. 2000) - es wird in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert, incl. Myoepithel, Fett-, Knorpel, Langerhanszellen, Astro- und Melanozyten - Funktion ist bis heute nicht vollständig geklärt (YAZIJI et al. 2000)	- als myoepithelialer Marker nicht verwendbar - Epithelzellen reagieren neben dem Myoepithel ebenfalls positiv (GILLET et al. 1990; MÖLLER und HELLMÉN 1994)
<b>2.</b>	<b>Smooth muscle Actin (SMA)</b>	- (Aktin)-Mikrofilamente - Myoepithelzellen, Myofibroblasten - glatte Muskelzellen	- eine Unterscheidung zwischen Myoepithel und Drüsenepithel ist möglich, da nur die erstgenannten Zellen positiv reagieren - Myofibroblasten reagieren aber ebenfalls positiv

Fortsetzung: Verschiedene Antikörper zur Identifizierung myoepithelialer Zellen

	<b>Antikörper</b>	<b>Nachzuweisendes Antigen</b>	<b>Spezifität</b>
<b>3.</b>	<b>Muscle actin (HHF 35)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- (Aktin)-Mikrofilamente</li> <li>- Myoepithelzellen, Myofibroblasten</li> <li>- glatte Muskelzellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- eine Unterscheidung zwischen Myoepithel und Drüsenepithel ist möglich, da nur die erstgenannten Zellen positiv reagieren</li> <li>- Myofibroblasten reagieren aber ebenfalls positiv</li> </ul>
<b>4.</b>	<b>Calponin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 34-kd Peptide</li> <li>- moduliert die Aktomyosin ATPase-Aktivität</li> <li>- Myoepithelzellen, Myofibroblasten</li> <li>- glatte Muskelzellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- eine Unterscheidung zwischen Myoepithel und Drüsenepithel ist möglich, da nur die erstgenannten Zellen positiv reagieren</li> <li>- Myofibroblasten reagieren aber ebenfalls positiv</li> </ul>
<b>5.</b>	<b>Zytokeratin 14</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zytokeratin 14, Bestandteil des Zytoskelettes von Myoepithel- und Basalzellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- spezifisch für basale/myoepitheliale Zellen in normalem oder in benigne verändertem Mammagewebe (DE LOS MONTEROS 2002; GRIFFEY et al. 1993; VOS et al. 1993a,c) nach GRIFFEY et al. (1993) ist der Antikörper gegen CK 14 auch in malignen neoplastischen Veränderungen der Mamma spezifisch</li> <li>- VOS et al. (1993b) beobachteten in ihren Untersuchungen CK14 positiv und SMA-negativ reagierende neoplastische Zellen in Adenokarzinomen</li> <li>- YAZIJI et al. (2000) führen verschiedene Studien an, nach denen nicht Myoepithelzellen, sondern auch Epithelzellen und so genannte intermediäre Zellen positiv reagieren</li> </ul>
<b>6.</b>	<b>p63</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nukleäres Protein p63</li> <li>- Basalzellen der Haut, Prostata, Zervix, Blase, Lunge und des Magens</li> <li>- Myoepithelien in Mamma und Speicheldrüsen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- exzellent in seiner Spezifität für Basal- und Myoepithelzellen (BARBARESCHI et al. 2001; REIS-FILHO und SCHMITT 2002; GAMA et al. 2003)</li> </ul>

Zu Beginn der Immunhistochemie-Ära war das S-100-Protein der meist genutzte Marker. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Nachweis des S-100-Proteins nicht spezifisch für myoepitheliale Zellen ist, da auch sekretorische Zellen und neoplastische Zellen eine positive Reaktion zeigen (YAZIJI et al. 2000; JOSHI et al. 1996; GILLET et al. 1990; MÖLLER und HELLMÈN 1994).

Später wurden in verschiedenen Studien spezifische Zytokeratinprofile der basalen bzw. myoepithelialen Zellen und Drüsenepithelien gesucht, um beide Zellarten dadurch voneinander unterscheiden zu können. Zu der Hypothese, dass Myoepithel exklusiv die "high molecular weight"-Zytokeratine, insbesondere CK 5, 14 und 17 exprimiert, sind die Meinungen aufgrund verschiedener Untersuchungen unterschiedlich. DE LOS MONTEROS et al. (2002) und GRIFFEY et al. (1993) sehen CK 14 als verlässlichen Marker an. In Bezug auf pathologisch unverändertes Mammagewebe sowie benigne tumoröse mammäre Veränderungen teilen VOS et al. (1993a, c) diese Ansicht, jedoch beschreiben sie in ihren Untersuchungen an fünf Adenokarzinomen auch positiv reagierende neoplastische Zellen (VOS et al. 1993b).

YAZIJIY et al. (2002) befinden CK 5 und 6 als spezifische Myoepithelmarker, erwähnen aber auch die geringe Sensitivität dieser Marker, der sie die oft negativen Färbeergebnisse zuschreiben.

Da Myoepithelzellen einen gewissen Grad der Differenzierung glatter Muskelzellen zeigen, wurden unterschiedliche Marker mit Angriffspunkt an den Proteinen des kontraktiven Apparates der Myoepithelzelle entwickelt. Sie zeigen eine hohe Sensitivität, färben aber auch Myofibroblasten, was bei gewissen Fragestellungen bei der Diagnosefindung hinderlich ist und ihren Einsatz limitiert. Somit nehmen die Aktinfilament- und Calponinmarker in Bezug auf eine absolute Spezifität untergeordnete Stellung ein.

Der Nachweis von Aktin im Zytoplasma (bei Kombination zweier Myoepithelmarker) kann der Interpretation des Differenzierungsgrades der neoplastisch entarteten Myoepithelien dienen. Somit geht ein Verlust der Differenzierung durch neoplastische Transformation mit einem geringeren Anteil, bzw. mit der Abwesenheit von Aktinfilamenten im Zytoplasma einher. So stellten auch VOS et al. (1993b) in ihren Untersuchungen weniger SMA-positive Myoepithelzellen als CK 14- und CK 14/17-positive Myoepithelzellen fest. Allerdings kann nach GUGLIOTTA (1988) eine neoplastische Transformation auch zu einem Anstieg zytoplasmatischen Aktins in epithelialen Zellen führen.

Das Anti-Human p63 Protein ist zur Zeit der innovativste Marker. Mit hoher Sensitivität stellt er Myoepithelien in Mamma und Speicheldrüsen sowie Basalzellen der Haut, Prostata, Zervix, Blase, Lunge und des Magens dar.

BARBARESCHI et al. (2001) stellten in ihren Untersuchungen an normalem sowie maligne und benigne verändertem humanen Mammagewebe eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 95% für p63 fest. Des Weiteren sind sie der Meinung, dass p63 in der Identifizierung von myoepithelialen Zellen einen Durchbruch darstellt, da es konstant im Myoepithel exprimiert wird und keine Immunreaktivität mit stromalen Myofibroblasten zeigt, welche bei den zuvor besprochenen Markern, die gegen die Elemente des kontraktiven Apparates des Myoepithels gerichtet sind, zu Problemen führt. Zudem ist p63 ein nukleärer Marker und REIS-FILHO und SCHMITT (2002) führen die leichtere Interpretation eines nukleären Färbemusters im Vergleich zu einem zytoplasmatischen an. Des weiteren befinden letztgenannte Autoren p63 als verlässlichen Marker, zum einen in Fällen von neoplastischen mammären Veränderungen, in denen für die Diagnostik die Identifizierung einer

myoepithelialen Schicht entscheidend ist, sowie in Tumoren des Myoepithels (Spindelzellmyoepitheliome, Adenomyoepitheliome, etc.).

REIS-FILHO und SCHMITT (2002) setzten p63 ebenfalls bei speicheldrüsenähnlichen Tumoren der Mamma (einem tubulären Adenomyoepitheliom, einem adenoiden, zystischen Karzinom, einem komplexen Karzinom und einem malignen Adenomyoepitheliom mit osteoblastischer Produktion) ein, welche vermutlich eine myoepitheliale Histogenese/Differenzierung besitzen, und stellten eine starke Immunreaktivität der neoplastischen Zellen dar.

BARBARESCHI et al. (2001) sind nach ihren Untersuchungen ebenfalls der Meinung, dass die p63-Expression in der Mamma auf die normalen und neoplastisch transformierten myoepithelialen Zellen (Neoplasien wie zum Beispiel Myoepitheliome und adenoid-zystische Karzinome) beschränkt ist. Ihre Studien beweisen, dass in normalen und pathologisch veränderten mammären, humanen Geweben die Isoform delta N p63 exprimiert wird. Außerdem weisen sie auf die Tatsache hin, dass die p63-Immunreaktivität im adulten Epithel auf die Progenitorzellen beschränkt ist und somit spekuliert werden kann, dass dies vielleicht ein Hinweis auf die schwer erfassbaren Progenitorzellen der Mamma ist. Zudem demonstrierten diese Autoren eine kleine Teilmenge von Zellen, welche p63-positiv, aber SMA-negativ waren.

### **2.13. Stamm- bzw. Vorläuferzellen des Mammaparenchyms**

Die Frage nach der Existenz von Stamm- oder so genannten Vorläuferzellen im adulten mammären Gewebe ist in der Forschung seit langem präsent.

Neben dem Interesse, Kenntnis über die Reservezellen der Mamma zu erlangen, stellt sich die Frage, ob und in welchem Maße diese Zellen in der Tumorgenese der verschiedenen mammären Neoplasien eine Rolle spielen und wenn ja, was dies für die Prävention und die Therapie bedeuten könnte.

Unterschiedliche Ergebnisse verschiedenster immunhistologischer Untersuchungen der letzten Jahrzehnte warfen die Vermutung von Stamm- bzw. Vorläuferzellen der Mamma immer wieder auf. So vermuteten zum Beispiel HELLMÉN und LINDGREN (1989) aufgrund ihrer Untersuchung der Intermediärfilamentexpression in der caninen Mamma und ihren Tumoren einen Stammzellursprung caniner Mammatumoren. MISDORP et al. (1999) befanden es für wahrscheinlich, dass viele mammäre Dysplasien und tumoröse Veränderungen von Stammzellen ausgehen, welche in den "terminal-duct-lobular-units" lokalisiert sind. SMITH et al. (1984) und SONNENBERG et al. (1986) zogen in Betracht, dass Vorläuferzellen der Mamma im myoepithelialen Kompartiment lokalisiert sind. Bereits 1970 vermutete HAMPERL ein Stammzellpotential der myoepithelialen Zellen.

Auch VOS et al. (1993b) stellten die Vermutung auf, dass in der Mamma zwei verschiedene Zelltypen im basalen Kompartiment lokalisiert sein könnten, da in ihren Untersuchungen an benignen caninen Mammatumoren bei einigen Tumoren weniger Zellen vom Antikörper

SMA gefärbt wurden als von den Antikörpern, die gegen die basalen Zytokeratine CK 14 und CK 14/17 gerichtet sind.

In ihren Untersuchungen zur Testung des p63 Markers im humanen normalen und neoplastisch veränderten Mammagewebe stellten BARBARESCHI et al. (2002) einen kleinen Anteil (niedriger 1%) basaler Zellen fest, die das p63-Protein exprimierten, aber negative Reaktionen auf die zytoplasmatischen Myoepithelzellmarker zeigten und so ihrer Meinung nach somatische Stammzellen der Mamma sein könnten.

1992 präsentierte HELLMÉN ihre Studie von in vitro Untersuchungen 4 caniner Mammakarzinome und einem caninen atypischen Misch tumor von welchen sie Zelllinien etablierte.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der kultivierten Zellen zeigten epitheliale Zellen, aber zum größten Teil intermediäre Zellen, welche zwischen dem epithelialen und myoepithelialen Typ einzuordnen sind. Sie ist der Meinung, dass mehrere bis jetzt undefinierte Zelltypen in der Milchdrüse und ihren Tumoren vorkommen, welche aus Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien oder verschiedenen Phänotypen bestehen.

Intermediäre Zelltypen wurden ebenfalls bei in vitro kultivierten humanen Mammageweben beschrieben und wurden als "epidermoid" mit reichlichen Tonofilamenten beschrieben (EASTY et al. 1980; STRUM und HILLMAN 1981). Die heterogene Expression von Intermediärfilamenten und Zytokeratinen der kultivierten Zellen könnte nach HELLMÉN (1992) als verschiedene Stadien der Entwicklung mammärer Stammzellen interpretiert werden. Ein anderes Kriterium für die Präsenz von Stammzellen ist die Fähigkeit, gangähnliche Strukturen auszubilden, wenn eine Anzucht auf Kollagengel erfolgt (FOSTER et al. 1983; ORMEROD und RUDLAND 1982). Der von HELLMÉN (1992) untersuchte Misch tumor zeigte ebenfalls diese Eigenschaft. Aus ihren Ergebnissen folgerte sie, dass Stammzellen in der Milchdrüse des Hundes vorhanden sein könnten, die sich in epitheliale oder myoepitheliale Zellen oder während der Tumorgenese in verschiedene Phänotypen entwickeln können.

Acht Jahre später untersuchten HELLMÉN et al. (2000) die Charakteristika der von ihnen aus zwei caninen mammären Spindelzelltumoren und zwei caninen mammären Osteosarkomen etablierten Zelllinien und folgerten, dass ihre Ergebnisse darauf hindeuten, dass die von ihnen untersuchten Tumoren ihren Ursprung von pluripotenten Stammzellen nehmen.

Die Existenz von adulten Stamm- oder Vorläuferzellen in der Mamma wird zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung bereits durch experimentelle Daten klar bestätigt (BOECKER und BURGER 2003). Jetzige Bemühungen drehen sich darum, die Charakteristika dieser Zellen genauer zu differenzieren.

WELM et al. identifizierten im Jahr 2003 eine mammäre epitheliale Zellpopulation mit verschiedenen Stammzell- bzw. Vorläuferzellqualitäten. WHITEHEAD et al. (1983a, b), BENETT et al. (1978) und RUDLAND (1987) beschrieben Stammzellen des Menschen und der Ratte in ihren Studien. Eine Subpopulation mit Stammzellcharakter identifizierten HOLLAND et al. (2003) in bovinem mammären Gewebe.

Bereits im Jahr 2001 wendeten STINGL et al. in ihren Untersuchungen Flusszytometrie und "in-vitro-colony-assay" Verfahren mit dem Ziel an, die primitiven epithelialen Progenitorzellpopulationen, welche in adulten Mammagewebe des Menschen präsent sind, zu charakterisieren. Sie identifizierten drei verschiedene HBEC (human breast epithelial cell) - Vorläuferzellen:

1. luminal beschränkte
2. myoepithelial beschränkte
3. bipotente Vorläuferzellen

Zum Typ 1 und Typ 3 stellten sie Folgendes fest:

Die Typ 1-Vorläuferzelle (*luminal*) exprimiert EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), alpha6 integrin, MUC1-Glykoprotein und bildet Zellkolonien, die ausschließlich aus Zellen bestehen, die positiv zu den CK 8/18- und CK19-Markern und EpCAM und MUC1 reagieren. Die Typ 3-Vorläuferzelle (*bipotent*) entwickelt Kolonien, die in ihrem Zentrum Zellen zeigen, die Zytokeratine des luminalen Epithels exprimieren und in der Peripherie, d.h. perizentral CK 14-positive myoepithelähnliche Zellen aufweisen. Die große Produktion an alpha6 Integrin und die schwache Expression von MUC1 lassen in vivo eine basale Lokalisation dieser Zellen im Mammaparenchym vermuten.

Abschließend folgerten Stingl et al. (2001) dass die dargestellten Resultate ein hierarchisches "branching-Model" der HBEC-Vorläuferdifferenzierung von einer primitiven nicht festgelegten Zelle zu luminal beschränkten oder myoepithelial beschränkten Vorläuferzelle untermauern. Auch SMITH (2002) vermutet, dass zwischen den Stammzellen und ihren differenzierten Nachkommen eine intermediäre Population von festgelegten Vorläuferzellen mit einem beschränkten Differenzierungspotential und einer limitierten Kapazität zur Selbsterneuerung besteht.

Im Jahr 2005 stellten STINGL et al. bei ihren Untersuchungen der "terminal ductal lobular units" (TDLU) die erforderliche Methodik der Technik vor, um Kolonien zu entwickeln und zu charakterisieren, die in vitro von mammären Vorläuferzellen zu erhalten sind.

## **2.14. Basalzelltumoren, Basalzellkarzinome, basosquamöse Karzinome und Trichoblastome des Hundes**

Mit dem Erscheinen der überarbeiteten WHO-Klassifikation der epithelialen und melanotischen Tumoren der Haut von GOLDSCHMIDT et al. im Jahre 1998 wurden die bis dahin als Basalzelltumoren befundenen Neoplasien als Trichoblastome reklassifiziert und der Basalzelltumor, das Basalzellkarzinom und das basosquamöses Karzinom von diesen abgegrenzt.

Bis zu diesem Zeitpunkt divergierten in der Literatur die Meinungen über die Dignität des Basalzellentumors und folglich auch die Nomenklatur und die Klassifizierung dieser Neoplasien.

Übereinstimmend wurden als den Basalzellentumor kennzeichnend uniforme, kubisch rundliche Zellen mit großen ovoiden, tief basophilen Zellkernen und nur wenig Zytoplasma beschrieben (NIELSON und COLE 1960; SEDLMEIER et al. 1967; SCHÄFER 1967; CONROY 1983; SANDERSLEBEN 1985; PULLEY und STANNARD 1990), die den Basalzellen der Epidermis ähneln (THEILEN und MADEWELL 1987; GOLDSCHMIDT und SHOFER 1992), jedoch im Gegensatz zu diesen keine Interzellularbrücken (SCHÄFER 1967; PULLEY und STANNARD 1990) haben. Eine palisadenartige Anordnung der Geschwulstzellen in der Tumorperipherie wurde oft beobachtet (SCHÄFER 1967; SEDLMEIER et al. 1967; WEISS und FRESE 1974; WEISS et al. 1977; SANDERSLEBEN 1985; PULLEY und STANNARD 1990). Das primitivere Wesen der basaloiden Tumorzelle im Vergleich zu den multipotenten epidermalen Basalzellen betonten PULLEY und STANNARD (1990). WEISS und FRESE (1974) definierten die Basalzellentumoren als Neoplasien aus basalzellähnlichen Zellen und unterschieden solide, girlanden- oder bandartige, medusoide, adenoide, zystische und basosquamöse Subtypen, die mit Ausnahme des basosquamösen Typs keine weiteren Zelldifferenzierungen aufweisen ( PULLEY und STANNARD 1990) und auch in Kombination vorkommen können (WEISS und FRESE 1974; WEISS et al. 1977; SANDERSLEBEN 1989; PULLEY und STANNARD 1990).

Die letztgenannten Autoren zählten ebenfalls nur undifferenzierte Neoplasien zu dieser Tumorgruppe, beschrieben aber auch fließende Übergänge zwischen Basalzelltumoren und den aus Basalzellen differenzierten Tumoren, wie Talgdrüsen- und Haarfollikeltumoren. Zeigen die basaloiden Zellen eine Differenzierung in Richtung Hautanhangsgebilde, wird der Tumor je nach Differenzierungstyp als Haarfollikel-, Schweißdrüsen- oder Talgdrüsentumor klassifiziert (NIELSON 1960; GOLDSCHMIDT und SHOFER 1992).

DAHME und WEISS (1999) unterschieden des Weiteren noch einen Granularzelltyp und wiesen auf die lokalinvasiven basosquamösen Formen hin, die vor allem im Bereich des Übergangs zur Mundschleimhaut vorkommen, und führten sie als eigenständigen Tumortyp, das basosquamöse Karzinom, um sie von den Basalzelltumoren und Trichoblastomen abzugrenzen.

Das biologische Verhalten der Basalzelltumoren wurde von einigen Autoren als rein gutartig (WEISS und FRESE 1974; GEISEL 1987; SANDERSLEBEN 1989; BIGLER 2001; SCOTT et al. 1995), oder als „fast immer“ benigne eingestuft (THEILEN und MADEWELL 1987; SUSANECK und WITHROW 1989; VAIL und WITHROW 2001; KESSLER 1999). Eine Metastasierung soll gelegentlich (NIELSON und COLE 1960; SEDLMEIER und WEISS 1963; SANDERSLEBEN 1967; WEISS und FRESE 1974; WEISS et al. 1977; FRESE et al. 1982; CONROY 1983; PULLEY und STANNARD 1990) oder gar nicht vorkommen (SANDERSLEBEN 1967; CONROY 1983; BOSTOCK 1986).



Aufgrund ihres lokal infiltrativen Wachstums und der Tatsache, dass beobachtete Metastasierungen zum damaligen Zeitpunkt histogenetisch nicht belegt waren, befand RUDOLPH (1999) Basalzellentumoren als semimaligne, d.h. bedingt bösartig und befürwortete stark die Bezeichnung Basalzelltumor, welche die Dignität im Gegensatz zu dem viel genutzten Begriff des Basalioms noch offen lässt.

Verschiedenste Meinungen zur Entstehung von Basalzellentumoren wurden in der Literatur bereits geäußert. So beschreiben THOMAS und FOX (2002) seine Entwicklung von pluripotenten basalen epithelialen Zellen. KRAL und SCHWARTZMAN (1964), CONROY (1983) und SCOTT et al. (1995) konstatieren, dass die Proliferation der basaloiden Zellen entweder von der Epidermis oder von hautassoziierten Strukturen ausgeht. Auch THEILEN und MADEWELL (1987) sind der Ansicht, dass ein Basalzelltumor von undifferenzierten Basalreservezellen der Epidermis, der Haarfollikel, Schweißdrüsen oder Talgdrüsen seinen Ursprung hat. NIELSON und COLE (1960) sowie STRAFUß (1974) sehen den Ursprung der Neoplasie in der Basalzellschicht der Epidermis, dem Stratum germinativum. Zusätzlich kann nach der Meinung dieser Autoren die abnorme Wucherung auch von embryonalen Zellen der Dermis ausgehen, den so genannten „latenten embryonalen Epithelkeimen“, sowie den Haarfollikeln. Dieser Überzeugung sind auch PULLEY und STANNARD (1990) sowie THEILEN und MADEWELL (1987)). Demnach ahmen die Tumorzellen des Basalzellentumors pluripotente Stammzellen nach, die sich während der Entwicklung zur Epidermis und ihren Adnexen differenzieren (GOLDSCHMIDT und SHOFER 1992). Basaloide Zellen zeigen somit eine Analogie zu der undifferenzierten epithelialen Stammzelle (SCHOEPE 2001).

#### **2.14.1 Auszug der WHO-Klassifikation der epithelialen und melanotischen Tumoren der Haut (GOLDSCHMIDT et al. 1998)**

##### **1. Epitheliale Tumoren ohne squamöse oder adnexe Differenzierung**

- 1.1. *Basalzelltumor (Basalzellepithelioma)*
- 1.2. *Basalzellkarzinom*
  - 1.2.1. *Infiltratives*
  - 1.2.2. *Clear-cell-Typ*

##### **2. Tumoren der Epidermis**

- 2.1. Benigne Tumoren
  - 2.1.1. Papilloma
  - 2.1.2. Invertiertes Papillom

- 2.2. Maligne Tumoren
  - 2.2.1. Aktinische Keratose (solare Keratose)
  - 2.2.2. Multizentrisches squamöses Karzinoma in situ  
(Bowen-like-disease)
  - 2.2.3. Plattenepithelkarzinom
  - 2.2.4. *Basosquamöses Karzinom*

### 3. Tumoren mit adnexalen Differenzierungen

- 3.1. Follikuläre Tumoren
  - 3.1.1. Infundibuläres keratinisierendes Akanthom  
(intrakutanes verhornendes Epitheliom)
  - 3.1.2. Tricholemmoma
    - 3.1.2.1. Inferiores
    - 3.1.2.2. Isthmisches
  - 3.1.3. *Trichoblastome*
    - 3.1.3.1. *Bandartiger Typ*
    - 3.1.3.2. *Trabekulärer Typ*
    - 3.1.3.3. *Granularzelltyp Typ*
    - 3.1.3.4. *Spindelzell-Typ*

#### **2.14.2. Erläuterungen zur Klassifikation**

Die Autoren (GOLDSCHMIDT et al. 1998) verweisen in ihrer Klassifikation auf die noch bestehende kontroverse Betrachtungsweise der Einordnung der basaloiden Neoplasien mit minimalen Differenzierungen zu adnexen Strukturen in die erste Kategorie ihrer Klassifikation, analog der humanen WHO-Klassifikation der Hauttumoren anstelle ihrer Führung als Trichoblastome. Jedoch vertitt nur ein Autor der sechs Verfasser der veterinärmedizinischen Klassifikation diese Meinung.

##### **2.14.2.1. Epitheliale Tumoren ohne squamöse oder adenexe Differenzierung**

Die in erster Kategorie geführten epithelialen Tumoren zeichnen sich durch das Fehlen squamöser oder adenexaler Differenzierungen aus. Der nicht metastasierende Basalzelltumor und das Basalzellkarzinom sind beim Hund ungewöhnlich im Gegensatz zur Katze, bei der diese Neoplasien häufig zu finden sind. Die Tumorzellen beider Neoplasien ähneln den normalen Basalzellen der Epidermis.

### **2.14.2.1.1. Basalzelltumor**

Die Bezeichnung Basalzelltumor wird in der WHO-Klassifikation für dermale Tumoren genutzt, deren Tumorzellen den basalen Zellen der Epidermis ähneln, in ihrer Struktur „Inseln“ von Tumorzellen in moderatem fibrösem Stroma zeigen und eine Assoziation mit der darüberliegenden Epidermis aufweisen können. Ein langsames Wachstum aufweisend, metastasieren Basalzelltumoren nicht. Auch THOMAS und FOX (2002) beschreiben Basalzelltumoren, ihr biologisches Verhalten betrachtend, als benigne.

Die Therapie der Wahl ist die chirurgische Entfernung, wobei bei inkompletter Exzision mit Rezidiven zu rechnen ist.

### **2.14.2.1.2. Basalzellkarzinom**

Das Basalzellkarzinom stellt einen geringgradig malignen Tumor dar, der palpatorisch eine feste Konsistenz, aber oft epidermale Ulzeration und eine extensive Infiltration der Haut zeigt. Zwei Varianten, der infiltrative und der „clear-cell“ Typ sind zu unterscheiden. Beim *infiltrativen Typ* ist oft sein Ursprung von den Basalzellen der Epidermis zu beobachten, von welchem er Haut und Subkutis in Form von Strängen oder Bänder, aber auch Tumorzellinseln infiltriert. Es sind kleine, basophile Tumorzellen mit hyperchromatischen Nuklei, die wenig Pleomorphien, aber oft Mitosen aufweisen. Oft ist eine deutliche Fibroblastenproliferation als Antwort auf das infiltrative Wachstum zu beobachten.

Der ebenfalls infiltrativ wachsende „*Clear-cell*“-Typ zeigt im Gegensatz meist keine Assoziation mit der Epidermis. Seine neoplastischen Zellen sind größer und zeichnen sich durch ein fein granuliertes Zytoplasma aus. Die Zellkerne sind von ovoider Form, zeigen keine auffälligen Nukleoli, und die Anzahl der Mitosen ist variabel. Dieser Tumortyp zeigt lokal invasives Wachstum, und Metastasen wurden bei der Katze in wenigen Fällen nachgewiesen (GOLDSCHMIDT 2002). Die Abgrenzung vom Basalzelltumor ist nach GOLDSCHMIDT (2002) durch die invasive Natur dieses Karzinoms und die oft damit verbundene dermale Fibroplasie gegeben. Eine chirurgische Exzision ist auch hier die Therapie der Wahl.

## **2.14.2.2. Tumoren der Epidermis**

In der zweiten Kategorie der WHO-Klassifikation werden epitheliale Tumoren der Epidermis beschrieben, zu denen unter den malignen auch das basosquamöse Karzinom aufgeführt wird.

### **2.14.2.2.1. Basosquamöses Karzinom**

Es ist eine Neoplasie geringer Malignität, die hauptsächlich aus basaloiden Zellen mit Herden squamöser Differenzierungen besteht (GOLDSCHMIDT et al. 1998). Der Tumor ist ungewöhnlich und wird im Vergleich zur Katze beim Hund öfter diagnostiziert. Eine Metastasierung wurde nach GOLDSCHMIDT (2002) bis heute noch nicht beobachtet.

### **2.14.2.3. Trichoblastome**

Die früher als Basalzelltumoren klassifizierten Neoplasien werden in der zurzeit gültigen WHO-Klassifikation als Trichoblastome eingeordnet und in verschiedene Subtypen unterteilt, welche trotz ihrer Variabilität in ihrer histopathologischen Erscheinung alle als benigne einzuschätzen sind. Trichoblastome zeigen Differenzierungen zu Haarkeimen des sich entwickelnden Haarfollikels oder haben dort ihren Ursprung (GOLDSCHMIDT 2002). Beim Hund kommen diese Neoplasien häufig vor, oft in einem Alter zwischen 4 und 9 Jahren und zeigen meistens ein langsames Wachstum (GOLDSCHMIDT 2002; VAIL und WITHROW 2001; THOMAS und FOX 2002). Bevorzugt im Bereich des Kopfes und des Halses auftretend (NIELSON und COLE 1960; WEISS et al. 1977; NIELSON 1983; GEISEL 1987; SCOTT et al. 1995; GOLDSCHMIDT und SHOFER 1998; GOLDSCHMIDT 2002), zeigen die Geschwülste oft eine haarlose Oberfläche, auch oft sekundäre ulzerative Veränderungen (SANDERSLEBEN 1967; PULLEY und STANNARD 1990) und erscheinen durch eine Pseudokapsel aus komprimierten Kollagen gut abgegrenzt (SANDERSLEBEN 1967; WEISS und THEIFKE 1999; GOLDSCHMIDT 2002) und verschieblich (WEISS und FREESE 1974; THOMAS und FOX 1998; GOLDSCHMIDT und SHOFER 1998). Ihre Größe variiert zwischen 0,5 und 18 cm im Durchmesser (GOLDSCHMIDT 2002).

Die Therapie der Wahl ist die chirurgische Exzision, nach welcher nur bei unvollständiger Entfernung des neoplastischen Gewebes Rezidive auftreten. Trichoblastome sind benigne Tumoren, die nicht metastasieren.

#### **2.14.2.3.1. Bandartiger Typ**

Bandartige Strukturen durch eine ein- bis dreireihige Schichtung palisadenartig angeordneter Zellen, die normo- oder hyperchromatische prominente Nuklei und wenig Zytoplasma zeigen, kennzeichnen diese Variante. Dieser Subtyp kommt beim Hund am häufigsten vor. Die Mitoserate ist variabel, einige können jedoch eine markant hohe haben. Während das angrenzende Stroma teils muzinös oder kollagenös ist, variiert die Menge des Stromas zwischen den bandartigen Formationen.

Eine Variation durch eine spezifische Anordnung der bandartigen Formationen ist beim Hund ebenfalls häufig zu beobachten, das so genannte medusoide Muster: von einem Zentrum aggregierter Zellen, die eine große Menge eosinophiles Zytoplasma aufweisen, ragen die bandartigen Strukturen sternenförmig wie Tentakel heraus und erinnern so an den Kopf der Medusa aus der griechischen Mythologie. In dieser Neoplasie sind gelegentlich Herde inkompletter Trichogenese zu beobachten.

#### **2.14.2.3.2. Trabekulärer Typ**

Diese Variante ist bei der Katze oft zu beobachten. Multiple Läppchen neoplastischer Zellen sind von einem zarten interlobulären Stroma voneinander getrennt. Die peripheren Zellen

zeigen eine deutliche palisadenartige Anordnung, während die zentralen Zellen ovoide bis längliche Zellkerne und mehr eosinophiles Zytoplasma besitzen.

#### **2.14.2.3.3. Granularzelltyp**

Diese Variante ist durch Zellen gekennzeichnet, die ein reichliches, fein granuliertes eosinophiles Zytoplasma mit exzentrisch lokalisierten kleinen, hyperchromatischen Nuklei aufweisen. Ein unterschiedlicher Gehalt an kollagenem Stroma ist zu beobachten.

#### **2.14.2.3.4. Spindelzelltyp**

Multilobulär mit wenig interlobulären Stroma zeigt dieser Subtyp teils eine Assoziation mit der darüberliegenden Epidermis. Die Morphologie des Tumors variiert in Abhängigkeit der Schnittachse der Tumorzellen: im Längsschnitt getroffene Zellen zeigen sich spindelförmig, während transversal geschnittene Zellen ovoid erscheinen. Die spindelförmigen Zellen zeigen teils verwobene Muster. Melanin ist in den neoplastischen Zellen oder in Melanophagen zu beobachten.

### **2.15. Antigenmaskierung infolge der Gewebeprobeifixierung und ihrer Paraffineinbettung**

Gewebeprobeen werden zur mikroskopischen Untersuchung ihrer Struktur meist in neutral gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Fixierung im Formalin sollte mindestens 24 Stunden betragen, aber die Zeitdauer von 48 Stunden nicht überschreiten.

Durch die Fixierung in Formalin kann es zur Reduktion der Antigenität kommen. Zum einen treten intermolekulare methylenartige Quervernetzungen zwischen Polypeptidketten auf (SHI et al. 1991), die die Tertiärstruktur der Proteine verändern (WALTER 1999), des weiteren können auch andere molekulare Strukturen an das Epitop binden (SHI et al., 1991). Das Formalin reagiert primär mit basischen Aminosäuren unter Ausbildung der „Methylenbrücken“ (FARMILO und STEAD 1983). Bestimmte Antigene werden somit nach der Formalinbehandlung von einigen Antikörpern nicht mehr erkannt. Dieser Vorgang ist jedoch teilweise reversibel, da viele Antigene durch die Methylenbrücken nicht zerstört, sondern lediglich für den Antikörper „maskiert“ werden (SHI et al. 1991). Die Möglichkeit, dass Zellproteine in ihrem formalin-fixierten Zustand mit Calciumionen Komplexe bilden, die zu einem wechselnden Grad der Antigenmaskierung führen, stellte MORGAN et al. (1994) fest.

Zudem ist anzumerken, dass sich im Zuge der Paraffineinbettung die dreidimensionale Struktur der Proteine in unterschiedlichem Maße verändert (Konformationsänderung).

## 2.16. Antigendemaskierung durch Vorbehandlung

Es gibt einige Antikörper, die problemlos mit ihren Antigenen (spezifischer: mit ihren Epitopen) reagieren, da diese resistent gegenüber der Formalinfixierung und Paraffineinbettung sind. Diese bezeichnet man daher auch als „paraffingängige“ Antikörper. Andere Antikörper hingegen sind gegen Epitope gerichtet, die nach Durchführung der routinemäßigen Fixierung und Einbettung ihre immunologische Reaktivität durch Maskierung verloren haben.

Die unterschiedlichen Arten der Vorbehandlung formalinfixierter Schnitte zielen darauf, maskierte Epitope für die Antikörper wieder zugänglich zu machen und somit die Immunreaktivität wiederherzustellen.

Unterschiedliche Methoden der Vorbehandlung stehen mittlerweile zur Verfügung. Die Art der Vorbehandlung richtet sich nach dem zu untersuchenden Antigen und dem eingesetzten Antikörper. Empfehlungen, die Vorbehandlung betreffend, sind vielen Antikörpern im Beipackzettel beigelegt, diese müssen jedoch in Vorversuchen ausgetestet, nach Bedarf modifiziert oder gegebenenfalls durch andere ersetzt werden.

Die Verfahren der Antigendemaskierung sollen die Quervernetzungen zwischen Polypeptidketten aufbrechen, bei einigen auch die Calciumionen mittels Citrat zwecks Auflösung der Komplexe entfernen und allgemein die Konformation des Epitops wiederherstellen. Durch die Demaskierung sind die Bindungsstellen für die Antikörper wieder hergestellt.

Folgende Methoden stehen zur Verfügung:

1. Proteolytische Andauung  
- mittels Trypsin, Pronase, Proteinase k oder Pepsin
2. Hitzebehandlung
  - 2.1. im Mikrowellengerät
  - 2.2. im Schnellkochtopf
  - 2.3. im Autoklav
  - 2.4. im Wasserbad
3. Kombinationen der proteolytischen und hitzeinduzierten Andauung

Nach FARMILO und STEAD (1983) liefert die Kryostatpräparation wesentlich besser erhaltene Antigene als die Paraffinschnitte. Morphologische Details werden jedoch beim Gefrierschnitt eher zerstört als durch eine Bearbeitung paraffineingebetteter Proben. Da in der vorliegenden Studie auf Archivmaterial sowie Material aus der Routinediagnostik zugegriffen wurde, stand die Kryostatpräparation nicht zur Verfügung.

## 2.17. Immunhistochemische Färbemethoden

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht darauf, mit Hilfe von Antikörpern gewebliche oder zelluläre Antigene morphologisch zuordnungsbar und im histologischen Präparat visualisierbar zu machen. Zur Lokalisierung von Antigenen stehen eine Vielzahl immunhistochemischer Färbemethoden zur Verfügung. Allen Verfahren liegt das Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung und das anschließende Sichtbarmachen des gebundenen Antikörpers durch ein Enzym-Chromogen-System zugrunde.

Die Verfahren im Überblick:

### 1. Direkte Methode

(wird nach BOENISCH (1983) heute kaum mehr angewandt)

### 2. Indirekte Methoden

2.1. PAP (Peroxidase-anti-Peroxidase)

2.2. APAAP (Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase)

2.3. ABC (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex)

**2.4. B-SA (Biotin-Streptavidin amplifizierte) Nachweissystem**

Die Färbemethoden unterscheiden sich alle in ihrer Spezifität und Empfindlichkeit. Die Methode ist umso sensitiver und spezifischer, je stärker die Affinität zwischen den Antikörpern und den Enzymkomplexen ist und je mehr Bindungsstellen dem Enzymkomplex zur Verfügung stehen. Die neueste Methode auf dem Sektor der Immunhistochemie ist das Biotin-Streptavidin amplifizierte System. Es erreicht nach BOENISCH (1997) die maximalste Sensitivität.

Im B-SA-System besteht zwischen dem Biotin und Streptavidin eine Bindungsaffinität von  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ , dies stellt nach CHARLET und WOLF (1964) die stärkste aller bekannten nichtkovalenten Bindungen dar. In der B-SA Methode ist im Vergleich zur ABC-Methode das Avidin durch Streptavidin ersetzt worden, da letztgenanntes einige Vorteile gegenüber Avidin aufweist:

1. Streptavidin besitzt keine Carboanhydrate, die unspezifisch an Lectin-ähnliche Substanzen binden können, welche im normalen Gewebe vorkommen (NARITOUKU und TAYLOR 1982).
2. Sein isoelektrischer Punkt liegt um den Neutralpunkt, wodurch keine unspezifischen Bindungseffekte auftreten (WALTER et al. 1989).

Eine weitere Problematik stellt die durch die Biotinylierung veränderte Rezeptorqualität des Linkantikörpers dar. Bei der B-SA-Technik ist es jedoch gelungen, den Linkantikörper derart

zu modifizieren, dass die Bindung von mehreren Biotinmolekülen ohne ungünstige Beeinflussung seiner Bindungsaffinität möglich wird.

Zusätzlich ist das Verfahren zur Konjugation von Markierungsenzym mit Streptavidin vom Hersteller optimiert worden, um ein maximales Labelling von Streptavidinmolekülen mit mehreren Enzymmolekülen zu ermöglichen. Die kombinierte Wirkung dieser Verbesserungen bedeutet einen erheblichen Anstieg der Signalwirkung im Vergleich zu jedem anderen indirekten Standardverfahren (PAP, PAAP oder ABC), durch das die Antigen-Antikörper-Bindung erzeugt werden.

Die B-SA-Methodik wird in den hier vorliegenden Untersuchungen angewandt und daher in ihrem Prinzip kurz erläutert. Dies erfolgt an Hand der für die Antikörper LP34, AE1, CK 14 und HHF35 verwendeten Reagenzien.

1. Reaktion des **Primärantikörpers** mit dem Gewebe- oder Zellantigen.
2. Der **biotinylierte Zweit-**, bzw. **Brücken-** oder **Linkantikörper** bindet an das Fc-Fragment des Primärantikörpers.
3. Das **enzymmarkierte Streptavidin** wird infolge hinzugefügt. Das Streptavidin bindet an die Biotinmoleküle des Brückenantikörpers. Es ist mit dem *Markierungsenzym*, der *alkalischen Phosphatase* konjugiert.
4. Das **Substrat** *Naphtol-AS-B-I-phosphat* wird vom gebunden Markierungsenzym der alkalischen Phosphatase gebunden. Ein Phosphatrest wird abgespalten, die Phenolkomponente bleibt am Enzym gebunden.
5. Das **Chromogen** *Neufuchsin* kuppelt an die gebundene Phenolkomponente unter Bildung eines unlöslichen Azofarbstoffs von roter Farbe, der nun das durch den Primärantikörper gebundene Gewebeantigen markiert.

Zur Blockierung endogener alkalischer Phosphatase wird Levamisol der Entwicklungslösung hinzugefügt (CORDELL et al. 1984; FRITZ et al. 1985).