

### 3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. Patientengut

Zur Zusammenstellung der Fälle, welche mammäre basaloide Veränderungen zeigen, diente das Archiv des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin, in welchem alle, in den letzten Jahrzehnten eingesandten Tumoren in Form von Paraffinblöckchen archiviert sind. Zudem werden Fälle aus der aktuellen Routinediagnostik miteinbezogen. Einsender sind neben der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin auch praktizierende Tierärzte der Stadt Berlin und weiterer Bundesländer. Die Proben stammen aus den Jahren 1994-2004.

Zunächst wurden Gewebeproben von 220 eingesandten Fällen in der HE- Färbung beurteilt. Anschließend wurden von diesen 50 Gewebeproben ausgewählt und den immunhistochemischen Färbungen mittels 5 verschiedenen Antikörpern sowie der PAS-Färbung unterzogen. In der vorliegenden Studie werden 22 Gewebeproben von diesen untersuchten Gewebeeränderungen repräsentativ in 154 Färbungen dargestellt.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen an den nach WEISS und FRESE (1974) klassifizierten Basalzelltumoren wird ebenfalls auf das Archiv des Instituts für Veterinär-Pathologie zugegriffen. Die Gewebeproben entstammen den Jahren 1995 und 1996.

Für die Testung des humanen Antikörpers p63 wurden zusätzlich 10 Proben aus Mammaleisten und der Haut verschiedener Hündinnen in der Sektionshalle der Veterinär-Pathologie der FU-Berlin entnommen. Die humanen Proben zur Kontrolle der Immunreaktivität des Antikörpers p63 wurden von der Humanpathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, zur Verfügung gestellt.

##### 3.1.1.1. Übersicht der E- und S- Fälle

Auflistung der E-Fälle, welche basaloide Proliferationen und Neoplasien in der Mamma aufweisen

	<b>E- Nr.</b>	<b>Rasse</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter (Jahre)</b>
<b>1994</b>	605-94	Dackel	w	10
	2428-94	Westhighland-Terrier	o.A.	o.A.
<b>1995</b>	726-95	DSH	w	9
	1521-95	Tibet-Terrier	w	4
<b>1996</b>	1979-96	Beagle	w	6
	2809-96	Deutsch-Langhaar	w	11
	2853- 96	Beagle	w	8

- Fortsetzung - Auflistung der E-Fälle, welche basaloide Proliferationen und Neoplasien in der Mamma aufweisen

<b>1997</b>	540- 97	Rauhaardackel	w	14
	913- 97	Mischling	w	8,5
<b>2001</b>	684- 01	Beagle-Mischling	w	11
<b>2002</b>	1451- 02	Cairn Terrier	w	12
	1902- 02	Golden Retriever-Mix	w	7
	2951- 02	Cocker-Mix	w	10
<b>2003</b>	177- 03	Dobermann	w	8
	533- 03	Dackel-Mix	w	10
	561- 03	Dobermann	w	11
	1698- 03	Fox terrier-Mix	w	10
	2754- 03	Boxer	w	6
	2761- 03	Deutscher Schäferhund	w	12
<b>2004</b>	2735- 04	Terrier-Mischling	w	9

Auflistung der E- Fälle für die p63-Testung an caninen nach WEISS und FRESE (1974) klassifizierten Basalzelltumoren

	<b>E- Nr.</b>	<b>Rasse</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Lokalisation</b>
<b>1995</b>	438- 95	DSH	w	4	Unterkiefer
	1294- 95	o.A.	w	3	Lefze
	1688- 95	Mix	w	11	Hals
	2015- 95	DSH-Mix	m	7	Kopf
	2404- 95	Hovawart-Mix	m	8	Kopf
	2600- 95	Mix	m	o.A.	Rumpf
	3017- 95	Pudel-Mix	m	o.A.	o.A.
<b>1996</b>	2336-96	Bobtail	m	o.A.	Schwanz
	2514- 96	Westhighland-Terrier	m	8	Hintergliedmaße

### **3.1.2. Testgewebe**

Als Testgewebe für die immunhistochemischen Vorversuche für den Mikrofilamentmarker HHF35 wurde caniner Dünndarm verwendet, für den Zellkernmarker p63 canine Haut und canines pathologisch unverändertes Mammagewebe sowie humanes Prostatagewebe genutzt. Die jeweils erstgenannten Gewebearten fanden im Anschluss als Positiv- und Negativkontrollen Verwendung. Als zusätzliche interne Kontrollen dienten bei HHF35 die glatten Muskelzellen der im Gewebe enthaltenen Blutgefäße und bei dem Antikörper p63

Myoepithelzellen im nicht neoplastisch entarteten Mamagewebe, sowie die Basalzellen der Haut, wenn diese bei der eingeschnittenen Tumorprobe mit erhalten war. Für den Intermediärfilamentmarker CK 14 wurden ebenfalls canine Basalzelltumoren als Positiv- und Negativkontrolle benutzt. Für die Antikörper AE1 und LP34 lief canine Haut als Kontrolle mit und als interne Kontrollen diente ebenfalls in der Gewebeprobe enthaltene Haut.

### 3.1.3. Reagenzien, Geräte und Materialien

#### 3.1.3.1. Antikörper

In den verschiedenen immunhistochemischen Untersuchungen kommen folgende Antikörper zum Einsatz.

##### 3.1.3.1.1. Zytokeratinantikörper

AK	Clon	Zellspezifität	Methode	Verdünnung	Hersteller (Bestellnr.)
LP34	LP34	- Zytokeratine 5, 6 - in Gefrierschnitten auch Zytokeratin 18	BSA	1:140	DAKO (M 0717)
AE1	AE1	- die sauren Zytokeratine 10, 14, 15,16, 19	BSA	1:50	Zymed, SF (18-0153)
CK14	LL002	- Zytokeratin 14	BSA	1:8	Biogenex (146M)

##### Literatur:

**LP34:** LANE et al. (1985); PERKINS et al. (1992); THOONEN (1990)

**AE1:** COOPER und SUN (1985) ; GRIFFEY et al. (1993); SORENSON et al. (1987) ; SANDUNSKY (1991); BUSCH und RUDOLPH (1995); WALTER (1998)

**CK14:** IVANYI et al. (1992); KRÜGER et al. (1999) ; THOONEN (1990); VOS et al. (1993a, c) ; WALTER (1995); GRIFFEY et al. (1993); DE LOS MONTEROS (2002); DE LAS MULAS et al. (2002)

##### 3.1.3.1.2. Mikrofilamentmarker

AK	Clon	Zellspezifität	Methode	Verdünnung	Hersteller (Bestellnr.)
Anti-Muskel-Aktin	HHF35	- $\alpha$ und $\gamma$ - Aktin Iso- typen aus Skelett-, Herz- und glatten Muskelzellen	BSA	1:50	DAKO (M0635)

##### Literatur:

**HHF35:** GOTTLIEB et al. (1990); TSUKADA et al. (1987)

### 3.1.3.1.3. Zellkernmarker

AK	Clon	Zellspezifität	Methode	Verdünnung	Hersteller (Bestellnr.)
p 63	Clone 4A4	u.a. Basalzellen der Epidermis und Myoepithelien in der Mamma	BSA	1:25	DAKO Cyto- mation (Code- Nr.M7247)

#### Literatur:

**P63:** GAMA et al. (2003); REIS-FILHO und SCHMITT (2002); BARBARESCHI et al. (2001); MILLS et al. (1999); YANG et al. (1999)

### 3.1.3.2. Technische Geräte und Reagenzien

Die zur Anfertigung der histologischen Schnitte dienenden und die für die unterschiedlichen Färbungen benötigten Geräte und Reagenzien sind in den beiden folgenden Tabellen aufgeführt.

#### Übersicht der Reagenzien

Substanz	Hersteller	(Bestellnummer)
Aqua dest.	Im Institut hergestellt	-
Aqua bidest.	Im Institut hergestellt	-
Zitronensäure	Merck	2440500
Chloralhydrat	Merck	3597425
EDTA	Merck	8421
Eosin	Merck	1345
Ethanol	BfB	Eg Nr. 200-578-6
Hämatoxylin	Merck	115938
HCL	Merck	UN 1789
Hyper-Mount (chemisches Eindeckmedium)	Shandon	9999120
Label AK (LP34, AE1, CK14, HHF 35)	Biogenex	QA900-9L
Label AK (p63)	DAKO	K0679
Levamisole	Sigma	N9756
Link AK (LP34, AE1, CK14, HHF 35)	Biogenex	QA900-9L

## Fortsetzung: Übersicht der Reagenzien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>(Bestellnummer)</b>
Link AK (p63)	DAKO	K 0679
Kalialaun	Merck	150847901
Kaliumpyrosulfid	Merck	9023826
Kaliumjodid	Merck	7314613
Naphtol-AS-BI-Posphat	Sigma	N 2250
Natriumbisulfid	Merck	12968428
NaCl	Merck	20603400
Natriumcitrat	Merck	6448
Natriumnitrit	Merck	6549
Neufuchsin	Chroma	-
N,N-Dimethylformamid	Merck	3053
Perjodsäure	Merck	6243703424
Protease	Sigma	P6911
Schiffs Reagenz	Merck	87140332
Target Retrieval Solution	DAKO	S1699
Trizma base	Sigma	T-1503
Xylol	Merck	6025

Übersicht der technischen Geräte und Materialien

<b>Geräte und Materialien</b>	<b>Gerätetyp(Bestellnr.)</b>	<b>Hersteller</b>
Cover plates	72110013	Shandon
Mikrowelle	HMT 830A	Bosch
Objektträger (adhäsive)	Star frost	Engelbrecht
Objektträger	Superfrost (0794882)	Langenbrinck
Schlittenmikrotom	Tetrandermikrotom 207010	R. Jung
Sequenza	(73300003)	Shandon

**3.2. METHODIK****3.2.1. Herstellungsverfahren der benötigten Reagenzien**

- a.) Herstellung der Trisgepufferten Kochsalzlösung , TBS-Puffer, ph 7,6  
(Tris Based Saline Puffer)

100 ml Stammlösung wird auf 1000 ml mit Aqua destillata aufgefüllt.

Herstellung der Stammlösung- (10 x TBS pH 7,6 (0,5 M Tris, 8% NaCl), 1000 ml)

Tris 60,57 g

NaCl 80,00 g in etwa 800 ml Aqua destillata lösen

Der pH-Wert von 7,6 wird anschließend mit 37%iger HCL eingestellt. Anschließend wird die Lösung mit Aqua destillata auf 1000 ml aufgefüllt

b.) Herstellung der Trisgepufferten Kochsalzlösung, TBS-Puffers ph: 8,7  
(Tris Based Saline Puffer)

6,1 g Tris in ca. 900 ml Aqua destillata lösen und mit 1 molarer HCL auf pH 8,7 einstellen. Anschließend mit Aqua destillata auf 1000 ml auffüllen.

c.) Herstellung der Protease-Vorverdauungslösung 0,1%

Protease 10 mg

TBS-Puffer (ph 7,6) 10 ml

Herstellung des Reagenz nach Erwärmung des Puffers auf 37°C. Die Inkubation erfolgt ebenfalls im Brutschrank bei der gleichen Temperatur.

d.) Herstellung des 10M Citratpuffers, ph 6.0 für die Mikrowellen-Vorbehandlung

9 ml 0,1 M Zitronensäure und 41 ml 0,1 M Natriumcitrat mit 450 ml Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und mischen.

e.) Herstellung der Verdünnung der Target Retrieval-Lösung zur Mikrowellenvorbehandlung

Die Verdünnung erfolgt mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:10

Target Retrieval-Lösung: 50 ml

Aqua bidest. : 500 ml

f.) Herstellung der Verdünnungslösungen der primären Antikörper:

Die Zytokeratinantikörper wurden in den Verdünnungen 1:140 (LP34), 1:50 (AE1) und 1:8 (CK14) angewendet. Der Kernproteinmarker p63 in der Verdünnung 1:25. Allen diene TBS - Puffer, ph 7,6 als Verdünnungsmedium.

Der Mikrofilamentmarker HHF35 wurde in einem 0,08 mol/l EDTA enthaltenem Puffer verdünnt (1:50), um die nichtspezifische Hintergrundaktivität zu reduzieren.

g.) Herstellung des 0,08mol/l EDTA Puffers:

EDTA (1M) 0,744 g

TBS 25 ml

Das Reagenz muss auf dem Rüttler gut gemischt und immer frisch angesetzt werden.

h.) Herstellung der 5 % -Neufuchsinlösung

5 g Neufuchsin wird in 100 ml 2-molarer HCL gelöst

i.) Herstellung der Entwicklungslösung (Neufuchsin-Substrat-Lösung) für die Antikörper LP34, AE1, CK14 und HHF35 (Lösung für 2 Küvetten)

- Reagenz A:

Natriumnitrit: 0,1g

Aqua dest.: 2,5 ml

Gemisch muss mindestens 1 min stehen gelassen werden.

- Reagenz B (Chromogen)

Reagenz A (frisch angesetzt): 500 µl

Neufuchsin, 5% : 200 µl

Pipettierung in ein Eppendorfgefäß. Dieses muss ebenfalls 1 min stehen gelassen werden

- Reagenz C (Substrat)

Naphtol-AS-BI-Phosphat: 50 mg

N, N-Dimethylformamid: 600 µl

- Reagenz D

Levamisol: 0,042 g

TBS-Puffer (ph 8,7): 100 ml

Im Standzylinder ansetzen.

Zu Reagenz D (Puffer-Levamisole-Gemisch) wird nun zuerst Reagenz B, danach Reagenz C hinzugegeben. Nach Mischung wird die gesamte Lösung in zwei Küvetten gefiltert.

j.) Herstellung der Substrat-Chromogen-Lösung des DAKO LSAB®+Kitts für den Antikörper p 63

Die folgend aufgeführten Lösungen sind bereits fertig im Testkitt enthalten und müssen kurz vor ihrer Anwendung im unten aufgeführten Verhältnis gemischt werden. 1 ml dieser Lösung reicht für 4-7 Präparate.

Puffer-Substrat (ph 7,5)-Lösung (mit Hydrogenperoxid): 1 ml

Chromogen-Lösung (3,3'-diaminobenzidine): 1 Tropfen

k.) SO<sub>2</sub>-haltiges Wasser

- die Lösung muss immer frisch angesetzt werden -

Leitungswasser: 200 ml

10% K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : 10 ml

HCL: 10 ml

l.) Herstellung von Meyers Hämalaun aus Hämatoxylin

- 1 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua destillata lösen

- 200 mg Natriumjodit (NaJO<sub>3</sub>) und 50 g Kalialaun in der Hämatoxylinlösung unter Schütteln lösen; die so erhaltene Lösung soll blauviolett sein

- 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure werden zugegeben; nun schlägt der Farbton nach rotviolett um

### **3.2.2. Schnittanfertigung**

#### **3.2.2.1. Gewebeaufbereitung**

Für die Vorversuche des Antikörpers HHF35 und für die Vorversuche und die Testung des Kernmarkers p63 wird für erstgenannten caniner Dünndarm benötigt, für zweitgenannten physiologisch unverändertes canines Mammagewebe. In der Sektionshalle werden die Proben entnommen und für mindestens 24 Stunden und höchstens 48 Stunden in Formalin fixiert. Anschließend werden sie in Kapseln eingeschnitten, welche wieder ins Formalin gelegt werden. Danach kommen die Kapseln in den Tissue Tek Vip. Dort kommen sie für 1 Stunde und 40 min bei 40 °C in 10 %-iges Formalin. Anschließend werden sie eine Stunde bei 40 °C zur Entfernung des Formalins gewässert. Es folgt eine Dehydrierung zur Vorbereitung auf die Paraffineinbettung bei 40°C: 1.) Ethanol 70 %, 1 Stunde; 2.) Ethanol 80 %, 1 Stunde; 3.) Ethanol 96 % zweimal 1 Stunde; 4.) Ethanol 100%, ebenfalls zweimal 1 Stunde; und 5.) Xylol, zweimal 1 Stunde. Im Anschluss werden sie in flüssigem Paraffin (Temperatur 63°C)



eingebettet, das folgend aushärtet. Diese Paraffinblöcke werden wie unter 3.2.1.2. beschrieben weiter verwendet.

### 3.2.2.2. Herstellung der Paraffinschnitte

Von den zu untersuchenden, in Paraffin eingebetteten Tumorgewebeproben (den in der Sektionshalle entnommenen Proben und 120 Mammagewebsfällen), werden mittels eines Mikrotoms ca 4-5 µm dicke Schnitte hergestellt (pro Probe 8 Stück) und auf mit 3-Aminopropyltriethoxysilan beschichtete Objektträger aufgezogen. Diese werden erst auf einer Wärmeplatte luft- und im Anschluss für 24-36 h im Brutschrank bei 37 ° C hitzegetrocknet.

Nach einer Entparaffinierung mit anschließender Rehydrierung und einer Spülung in Aqua destillata, können diese histologischen Schnitte nun zur Färbung und für die Immunhistochemie verwendet werden.

### 3.2.3. HE-Routinefärbung

Alle Gewebeproben werden zunächst histologisch in der HE-Färbung beurteilt. Da auf über die Hälfte der 220 zu beurteilenden mammären Gewebeproben ein Zugriff auf die archivierten HE-Färbungen nicht möglich war, wurden von diesen 140 Fällen, sowie von den in der Sektionshalle entnommenen Testproben zunächst Paraffinschnitte hergestellt und diese folgend der HE-Färbung unterzogen.

<b><u>FÄRBEPROTOKOLL</u></b> (HE-FÄRBUNG)
1. Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 x 10 min in Xylol;</li> <li>• 2 x 2 min in 100% Alkohol</li> <li>• 2 x 2 min in 96% Alkohol</li> <li>• 1 x 2 min in 70 % Alkohol</li> </ul>
2. Spülung in Leitungswasser
3. Hämalan nach Meyer: für 6 Minuten
4. Bläuen in Leitungswasser für 15 Minuten
5. Eosin: 2 Minuten

Fortsetzung: Färbeprotokoll - HE-Färbung -

6. Dehydrierung der Schnitte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 x 2 min in 70 % Alkohol</li> <li>• 2 x 2 min in 96% Alkohol</li> <li>• 2 x 2 min in 100% Alkohol</li> </ul>
7. Eindecken der Schnitte aus dem Xylol heraus

### 3.2.4. PAS - (= Periodic Acid-Schiff) Färbung

Die PAS-Reaktion ist eine zytochemische Reaktion, die zur Darstellung der Basalmembran eingesetzt werden kann. Kohlenhydrate werden durch Perjodsäure oxidiert, und die entstandenen Aldehydgruppen ergeben mit fuchsin-schwefliger Säure (Schiff'sches Reagenz) eine charakteristische Färbung.

<b><u>FÄRBEPROTOKOLL</u></b> (PAS-FÄRBUNG)
1. Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 x 10 min in Xylol</li> <li>• 2 x 2 min in 100% Alkohol</li> <li>• 2 x 2 min in 96% Alkohol</li> <li>• 1 x 2 min in 70% Alkohol</li> </ul>
2. 2% Natriumbisulfit: 15 min
3. Aqua destillata, 3 x wechseln: 10 min
4. 0,5-1% Perjodsäure: 15 min
5. Aqua destillata, 3 x wechseln: 10 min
6. Schiff'sche Reagenz: 25 min
7. SO <sub>2</sub> -haltiges Wasser: 2 x wechseln, 5 min
8. Kernfärbung mit Hämatoxylin

Fortsetzung: Färbeprotokoll - PAS-Färbung

9. Spülung in fließendem Wasser
10. Dehydrierung der Schnitte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 x 2 min in 70 % Alkohol</li> <li>• 2 x 2 min in 96% Alkohol</li> <li>• 2 x 2 min in 100% Alkohol</li> </ul>
11. Eindecken der Schnitte aus dem Xylol heraus

### 3.2.5. Immunhistochemische Aufarbeitung

Bei den Immunfärbungen erfolgt eine Antigendarstellung mit dem Biotin-Streptavidin-Amplifikations-(B-SA)-Nachweissystem. Durchgeführt werden die immunhistochemischen Färbungen, mit Ausnahme des AK p63, welcher in der feuchten Kammer gefärbt wird, in den Inkubationskammern des Immunfärbecenters Sequenza<sup>TM</sup> der Firma Shandon. Hierzu werden die Schnittpräparate in die zum Sequenza gehörenden Coverplates® eingelegt und in die Kammern senkrecht eingestellt. Dabei entsteht ein kapillärer Spalt zwischen dem Objektträger und dem Coverplate® mit einem Volumen von 100µl. In diesem Spalt hält sich das aufpipettierte Reagenz und wird erst nach Zugabe von weiterer Flüssigkeit nach unten verdrängt. In der feuchten Kammer wird auf den waagrecht in der Kammer liegenden Schnitt das Reagenz direkt aufpipettiert und anschließend bei geschlossenem System inkubiert.

#### 3.2.5.1. Vorversuche

Vorversuche mussten für die Antikörper HHF35 und p63 durchgeführt werden. Die jeweils optimalen Antigendemaskierungsverfahren und Verdünnungsstufen wurden von SCHOEPE (2001) für die Antikörper LP34, AE1 und CK14 ermittelt.

Der Antikörper HHF35 wurde bezüglich seiner Eignung für canines Gewebe an Hundedünndarm und caninem Mammagewebe in den Verdünnungsstufen 1:25 und 1:50 getestet. Die Proben wurden in der Sektionshalle entnommen. Der eingeschnittene Darm wurde im Quer- und Längsschnitt gefärbt. Da sich zeigte, dass ohne ein Demaskierungsverfahren gute Färbeergebnisse erzielt wurden, gelangten für diesen Antikörper keine Vorbehandlungsmethoden zum Einsatz.

Vorversuche für die p63 Testung wurden an caniner Haut und caniner Mamma durchgeführt. Zur Gewährleistung der Spezifität des Antikörpers lief parallel humanes Prostatagewebe mit. Es wurden die Verdünnungsstufen 1:3, 1:5, 1:15, 1:25 und 1:50 und zusätzlich zwei verschiedene Andauungsverfahren sowie zwei unterschiedliche Pufferarten ausgetestet.

1. Andauung der Schnitte mittels Protease, gelöst in TBS (ph7,6), 15-20 min bei 37°C
2. Andauung der Schnitte in Citratpuffer (ph 6,0) in der Mikrowelle, 3 x 5 min bei 600 Watt
3. Andauung der Schnitte in Target Retrieval-Puffer (ph 6,0) in der Mikrowelle, 3 x 5 min bei 600 Watt

### 3.2.5.2. Hauptversuche

- In den Hauptversuchen an den mammären Gewebeveränderungen wurden von jedem Fall folgende Färbungen angefertigt:
  1. HE-Färbung
  2. PAS-Färbung
  3. Immunhistochemische Färbung unter Verwendung des AK LP34
  4. Immunhistochemische Färbung unter Verwendung des AK AE1
  5. Immunhistochemische Färbung unter Verwendung des AK CK14
  6. Immunhistochemische Färbung unter Verwendung des AK HHF35
  7. Immunhistochemische Färbung unter Verwendung des AK p63
- Für den Eignungstest des humanen Kernproteinmarkers p63 wurden die Gewebeproben zunächst einer HE-Färbung unterzogen und folgend mit dem Antikörper p63 gefärbt.
- Für die Beurteilung der nach WEISS und FRESE (1974) klassifizierten Basalzelltumoren bzw. nach GOLDSCHMIDT et al. (1998) als Trichoblastome reklassifizierten Neoplasien wurden von diesen einerseits HE-Färbungen und auch p63-Färbungen angefertigt. Zusätzlich erfolgte eine AE1-Färbung an caniner Haut, um die Untersuchungen von SCHNEIDER (2002), welche die Grunlage der Reklassifizierung bilden, evaluieren zu können.

In den immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern LP34, AE1, CK14 und HHF35 wurden Label- und Link-AK des TestKIT von Biogenex (QA900-9L), als Substrat Naphtol-AS-BI-phosphat und als Chromogen Neufuchsin verwendet.

Für den AK p63 kommt das DAKO LSAB®+Kit, Peroxidase zum Einsatz, welches Hydrogenperoxid als Substrat und DAB (3,3'-diaminobenzidin) enthält (s. Kap. 3.2.1.2.4.2.).

### 3.2.5.3. Überblick der Antigendemaskierungsverfahren

Antikörper	Demaskierungsverfahren
<b>LP34</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteolytische Vorbehandlung mit Proteinase</li> <li>• Inkubation in der Proteinase - Gebrauchslösung (Herstellung s. 3.2.4.6.c.) für 15-20 min im Brutschrank bei 37°C</li> </ul>

Antikörper	Demaskierungsverfahren
<b>AE1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteolytische Vorbehandlung mit Proteinase</li> <li>• s. LP34</li> </ul>

Antikörper	Demaskierungsverfahren
<b>CK14</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hitzebehandlung im Mikrowellengerät mittels 10 mM Citratpuffers (ph 6,0)</li> <li>• 1. 10 M Citratpuffer (ph 6,0) erstmal ohne Schnitte bei 750 Watt für 4 min erhitzen</li> <li>• 2. Schnitte in verschlossener Schüssel 2 x 5 min bei 600 Watt erhitzen</li> <li>• 3. 15 min bei Raumtemperatur in der Schüssel bei geöffneten Deckel abkühlen lassen</li> </ul>

Antikörper	Demaskierungsverfahren
<b>HHF35</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• eine Vorbehandlung ist nicht erforderlich</li> </ul>

Antikörper	Demaskierungsverfahren
<b>p 63</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hitzebehandlung im Mikrowellengerät mittels Target Retrieval – Puffers (ph 6,0)</li> <li>• Verfahren der Hitzeeinstellungen wie beim Antikörper CK14; die Target Retrieval-Lsg. wird mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:10 verdünnt und dann verwendet</li> </ul>

### 3.2.5.4. Färbeprotokolle für die Immunhistochemie

#### 3.2.5.4.1. Färbeprotokoll für die Marker LP34, AE1, CK14 und HHF35

#### Immunhistochemische Färbearbeitung für das BS-A-System modifiziert nach der Gebrauchsanleitung für das Super Sensitiv Nachweissysteme, Biogenex, Hamburg

Dieses Verfahren kam bei den immunhistochemischen Färbungen mittels der Antikörper LP34, AE1, CK14 und HHF35 zur Anwendung. (*-Modifizierte Schritte sind kursiv gedruckt-*)

1. Entparaffinieren der Schnitte:
  - 2 x 10 min in Xylol
2. Rehydrierung der Schnitte
  - 2 x 2 min in 100% Alkohol
  - 2 x 2 min in 96% Alkohol
  - 1 x 2 min in 70 % Alkohol
3. Spülung der Schnitte in Aqua destillata
4. Waschen in TBS – Puffer (ph 7,6)
  - 5 min
5. *Vorbehandlung der Präparate( s. Kap.3.2.2.2.3.)*
6. Waschung in TBS-Puffer (ph 7,6)
  - 5 min

Einlegen der Schnitte in die Coverplates® und Montage in die Inkubationskammern des Immunfärbecenters Sequenza™.

7. Waschen in TBS-Puffer (ph 7,6)
  - 5 min
8. Aufpipettierung des Primärantikörpers (100 µl pro Schnitt-mit Ausnahm der negativ Kontrolle)
  - 60 min Inkubation bei Raumtemperatur (20-24°C)
9. Waschen mit TBS-Puffer (ph 7,6)
  - 3 x 5 min
10. Inkubation mit Link-Antikörper (2 Tropfen pro Schnitt)
  - 20 min Inkubation bei Raumtemperatur
11. Waschen mit TBS–Puffer (ph 7,6)
  - 3 x 5 min
12. Inkubation mit Label-Enzym
  - 20 min bei Raumtemperatur
13. Spülung mit TBS–Puffer (ph 7,6)
  - 5 min

Demontage der Coverplates® aus den Inkubationskammern des Immunfärbecenters Sequenza™, Entfernung der Schnitte aus den Coverplates®.

14. Waschen der Präparate in TBS-Puffer, pH 7,6 in einer Küvette:
  - 5 min
15. Inkubation der Schnitte in der Entwicklungslösung (Neufuchsin-Substrat) s. Kap.3.2.2.6.h.)
  - je nach Intensität der Färbung bis 30 min
16. Spülung mit TBS - Puffer, pH 7,6 oder normalem Leitungswasser
17. *Gegenfärbung, bzw. Kernfärbung mit Hämatoxylin*
  - 10 sec
18. *Nachbläuen in Leitungswasser*
19. Dehydrierung mittels Durchlaufen der aufsteigenden Alkoholreihe
  - 2 x 2 min in 70% Alk
  - 2 x 2 min in 96% Alk
  - 2 x 2 min in 100% Alk
20. Xylol
21. Eindecken der Schnitte aus dem Xylol heraus mit Hypermount (chemisches Eindeckmedium)

#### **3.2.5.4.2. Färbeprotokoll für den Kernmarker p63**

Immunhistochemische Färbearbeitung für das BS-A-System zur Nutzung des Antikörpers p63

1. Entparaffinieren der Schnitte
  - 2 x 10 min in Xylol
2. Rehydrierung der Schnitte
  - 2 x 2 min in 100 % Alkohol
  - 2 x 2 min in 96 % Alkohol
  - 1 x 2 min in 70 % Alkohol
3. Spülung der Schnitte in Aqua destillata
4. Waschen in TBS-Puffer (pH 7,6)
  - 5 min
5. *Vorbehandlung: s. Kap. 3.2.2.3.*
6. Waschung in TBS-Puffer (pH 7,6)
  - 2 x 3 min

Die Präparate werden rund um das aufgezogene Gewebe trocken gewischt und in die feuchten Kammern eingelegt.

7. Inkubation mit 3% Hydrogen Peroxide

- 5 min

8. Waschen mit TBS-Puffer (ph 7,6) und 3 min ins Pufferbad

Die Präparate werden rund um das aufgezogene Gewebe trocken gewischt und wieder in die feuchten Kammern eingelegt.

9. Inkubation mit Primärantikörper

- 30 min bei Raumtemperatur

10. Waschen mit TBS-Puffer (ph 7,6) und 3 min ins Pufferbad

Die Präparate werden rund um das aufgezogene Gewebe trocken gewischt und wieder in die feuchten Kammern eingelegt.

11. Inkubation mit Link-AK

- 30 min bei Raumtemperatur

12. Waschen mit TBS-Puffer (ph 7,6) und 3 min ins Pufferbad

Die Präparate werden rund um das aufgezogene Gewebe trocken gewischt und wieder in die feuchten Kammern eingelegt.

13. Inkubation mit Label-AK

- 30 min bei Raumtemperatur

14. Waschen mit TBS-Puffer (ph 7,6) und 3 min ins Pufferbad

Die Präparate werden rund um das aufgezogene Gewebe trocken gewischt und wieder in die feuchten Kammern eingelegt.

15. Inkubation mit der Substrat-Chromogen Solution

- bis 8 min

16. Waschen mit destilliertem Wasser

17. Gegenfärbung mit Hämatoxylin

18. Bläuen in Leitungswasser

19. aufsteigende Alkoholreihe

20. Eindecken aus dem Xylol heraus

### 3.2.5.5. Kontrollen

Um Fehler bei der immunhistochemischen Färbetechnik auszuschließen, bzw. zu erkennen, laufen bei jedem Färbvorgang eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit.



### **3.2.5.5.1. Positivkontrolle**

Die Positivkontrolle ist ein histologischer Schnitt, der das jeweilige Antigen sicher im Gewebe aufweist. Somit ist ein möglicherweise fälschlich negatives oder positives Färbergebnis, hervorgerufen durch Fehler in der Vorgehensweise der Färbetechnik, ausgeschlossen.

### **3.2.5.5.2. Negativkontrolle**

Der als Negativkontrolle mitgeführte Schnitt weist ebenfalls ein durch den Antikörper markierbares Antigen auf, wird aber nicht mit dem Primärantikörper, sondern mit TBS - puffer inkubiert. Das Gewebe dieser Schnitte darf sich bei einer korrekt durchgeführten Methodik nicht anfärben.

## **3.2.6. Auswertungskriterien und -methodik**

### **3.2.6.1. Auswertung der Untersuchungen bezüglich der Immunreaktivität des Anti-Human p63-Proteins im caninen dermalen und mammären Gewebe**

Die caninen dermalen und mammären Gewebeproben wurden zunächst in der HE-Färbung auf pathologisch-anatomische Veränderungen untersucht.

In den Immunhistochemischen Färbungen wurde der positiv reagierende Zelltyp, die Intensität der Anfärbung und die Verteilungsmuster der Färbung im Geamtbild beurteilt.

Im Anschluss daran werden die Resultate der Auswertung in ihrer Bedeutung betrachtet.

### **3.2.6.2. Auswertung der Untersuchungen an den mammären basaloide Gewebeveränderungen**

#### **3.2.6.2.1. Beurteilung der HE-Färbung**

Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin bewirkt eine blaue Färbung der Kerne und eine rötliche Anfärbung des Zytoplasmas der Zellen. Es ist eine unspezifische Färbung, d.h. alle Zellen des Präparates werden angefärbt. Sie dient als Übersichtsfärbung um histologische Schnitte von den zu untersuchenden Gewebeproben untersuchen zu können.

Zunächst wurden 220 Gewebeproben in der HE-Färbung beurteilt. Ausgesucht wurden Fälle, die proliferative oder neoplastische basaloide Gewebeveränderungen aufweisen. Grundlegende Kriterien sind einerseits die basaloide Zellmorphologie sowie andererseits die spezielle Gewebetextur der Veränderungen. Die weitgehend monomorphen Zellen sind in Nestern, Knoten oder Strängen angeordnet, wobei die zentralen Zellen drüsige oder squamöse Differenzierung zeigen oder solide Strukturen formieren und die peripheren Zellen

charakteristisch in palisadenartiger Form angeordnet sind. Die zu beobachtenden Bänder, meist zweireihig, formieren sich aus ebenfalls palisadenartig angeordneten Zellen, die senkrecht zur Ausbreitung der Bandstruktur stehen.

Zunächst wird anhand der HE-Färbung das histomorphologische Erscheinungsbild der untersuchten Fälle ermittelt und beschreibend dargestellt. Das Vorhandensein, bzw. der Ausprägungsgrad histomorphologischer Kriterien (Kapselbildung, bindegewebige Septierung, keratotische Differenzierungen und Nekrosen im Tumorgewebe) werden semiquantitativ beurteilt und in einer tabellarischen Übersicht gezeigt.

Die Besprechung der untersuchten Fälle erfolgt im Ergebnisteil zur besseren Übersicht anhand ihrer Einteilung in solitär und multiple vorkommende basaloide mammäre Veränderungen.

Mittels der erarbeiteten histologischen Merkmale der verschiedenen basaloiden mammären Gewebeveränderungen werden diese nach den Empfehlungen der WHO den verschiedenen Tumortypen zugeteilt.

Des Weiteren erfolgte eine histopathologische Befundung der gesamten Gewebeprobe.

#### **3.2.6.2.2. Beurteilung der PAS - (= Periodic Acid-Schiff) Färbung**

Die PAS-Reaktion wird in der vorliegenden Studie zur Darstellung der Basalmembran (Membrana basalis) genutzt. Diese ist PAS-positiv und besteht histochemisch aus einer „Matrix“ aus polymerisierten Polysaccharid-Proteinkomplexen.

Eingesetzt wird diese Färbung, um die Lokalisation und die Ausrichtung der Zellen darstellen zu können. Zudem kann die Integrität der Basalmembran, bzw. das Durchbrechen ihrer durch neoplastisch entartete Drüsen-, bzw. Myoepithelzellen beurteilt werden.

#### **3.2.6.2.3. Beurteilung der immunhistochemischen Färbereaktionen**

Durch den Einsatz der fünf Antikörper unterschiedlicher Spezifität wird der *Immunphänotyp* der basaloiden, die tumorösen mammären Veränderungen bildenden Zellen ermittelt. Durch die Erstellung dieses immunhistochemischen Profils soll eine Grundlage geschaffen werden, diese basaloiden Veränderungen im Mammaparenchym der Hündin durch die Kenntnis ihrer Histogenese korrekt klassifizieren zu können.

Die Einzelfallauswertung der verschiedenen Immunfärbungen erfolgt für jeden Antikörper unter Berücksichtigung der dargestellten Zellart, der Intensität der Anfärbung, der Verteilungsmuster und der Homogenität der Färbung im Gesamtbild und im Falle der basalen/myoepithelialen Marker auch der Zellmorphologie.

- Die Beurteilung der Intensität der Anfärbung erfolgt semiquantitativ wie folgend dargestellt:

1. Anfärbung starker Intensität	+++
2. Anfärbung moderater Intensität	++
3. Anfärbung schwacher Intensität	+
4. keine Anfärbung	-

Des Weiteren werden Intensitätsunterschiede bei Betrachtung des Gesamtbildes mitberücksichtigt, d.h. gleichmäßige, homogene Färbungen unterscheiden sich von Fällen, die ein wechselhaftes Gesamtbild durch Bereiche unterschiedlicher Intensitäten aufweisen.

- Als beschreibende Beurteilungskriterien bei Tumorproben, in denen sich nicht immer alle Zellen gleichmäßig durch den jeweils verwendeten Antikörper anfärben, werden folgende Termini zur Darstellung der Verteilungsmuster durch die immunhistochemische Reaktion genutzt:

1. verstreut liegende Einzelzellen
2. Anfärbung einzelner fokaler Herde im Präparat
3. Anfärbung multipler fokaler Herde im Präparat
4. (multiple) größere herdförmige Areale
5. diffuse Anfärbung der Zellen im Präparat (der AK-Spezifität entsprechend)

In den immunhistochemischen Färbungen mittels der Antikörper LP34 und HHF35 werden neben der Befunderhebung an den basaloiden Gewebeveränderungen noch das in 12 der Fälle enthaltene, pathologisch unveränderte Mammagewebe in seiner Immunreaktivität mit dem jeweiligen Antikörper beurteilt.

#### **3.2.6.2.4. Vergleichende Darstellung der Myoepithel-/Basalzellmarker und erzielte Resultate bzw. erweiterte diagnostische Möglichkeiten durch den Einsatz dieser Marker**

Eine vergleichende Darstellung der immunhistologischen Befunde der Myoepithel-/Basalzellmarker erfolgt in Bezug auf ihre Spezifität und Sensitivität.

Ebenso werden die durch den Einsatz dieser Marker erzielten Ergebnisse bzw. geschaffenen Möglichkeiten einer spezifischeren Diagnostik aufgezeigt.

#### **3.2.6.2.5. Gegenüberstellung der Diagnostik mittels HE- und immunhistochemischen Färbungen**

Die Befundungen erfolgten in allen Färbungen gemäß der Empfehlung der WHO nach der zurzeit gültigen histologischen Klassifikation der Mammatumoren des Hundes, überarbeitet von MISDORP et al. (1999). Die Diagnostik mittels HE-Färbung und jene nach Einbeziehung der immunhistologischen Befunde werden sich gegenüber- und die Differenzen dargestellt. Durch die Anwendung verschiedener Antikörper unterschiedlicher Spezifität können alle den Tumor bildenden Zellen identifiziert und den entsprechenden Zelltypen zugeordnet werden. Somit ist durch den Einsatz der Immunfärbungen eine höchst sichere und verlässliche Diagnostik der vorliegenden Tumortypen möglich, konträr zur alleinigen Befundung in der HE-Färbung, die auf deskriptive histologische Kriterien limitiert ist.

#### **3.2.6.2.6. Bedeutung der immunhistochemischen Befunde für die Klassifizierung der basaloiden mammären Gewebeveränderungen und Empfehlungen zur Erweiterung der WHO-Klassifikation**

Basierend auf den ermittelten immunhistochemischen Resultaten werden die Differenzen sowie die diesen zu Grunde liegenden Ursachen zwischen der HE- und der immunhistochemischen Diagnostik aufgezeigt und Vorschläge zur Modifizierung der Beschreibung einzelner Tumortypen und zur Klassifizierung des basaloiden Adenoms im Rahmen der WHO-Klassifikation dargestellt.

#### **3.2.6.3. Auswertung der Untersuchungen an den zugehörigen Lymphknoten**

Die zur Verfügung stehenden Lymphknoten werden zunächst in der HE-Färbung befundet. Folgend kommen immunhistochemische Färbungen zum Einsatz.

BUSCH und RUDOPH (1995) etablierten zum Nachweis okkulten Mikrometastasen in den regionären Lymphknoten die immunhistochemische Färbemethode mittels des Antikörpers AE1 zur zuverlässigen neuen Routinediagnostik. Aus verschiedenen Zytokeratinantikörpern, die in der Humanmedizin eingesetzt werden, ermittelten sie den polyclonalen Antikörper AE1 als an Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebeproben als zuverlässig arbeitenden Marker. Während in der HE-Färbung einzelne Karzinomzellemboli häufig nur vermutet werden können, oder gar übersehen werden, erlaubt die immunhistochemische

Färbung sichere Aussagen (BUSCH und RUDOPH 1995). So zeigten sie, dass in 84,4% der von ihnen untersuchten Lymphknoten okkulte Tumorzellemboli und/oder Mikrometastasen immunhistochemisch nachweisbar waren, die im HE-gefärbten Präparat nicht sicher zu erkennen waren.

Bei den immunhistochemischen Färbungen kamen neben dem Antikörper AE1 auch die Antikörper LP34, CK14, HNF35 und p63 vergleichend zum Einsatz.

#### **3.2.6.4. Auswertung der Untersuchungen an den ursprünglich nach WEISS und FRESE (1974) als Basalzelltumoren klassifizierten Neoplasien**

Zunächst wurden Neoplasien ausgesucht, die anhand ihres histomorphologischen Erscheinungsbildes in der HE-Färbung nach WEISS und FRESE (1974), SANDERSLEBEN (1967), SCHÄFER (1967), SEDLMEIER et al. (1967), WEISS et al. (1977), SANDERSLEBEN (1989), PULLEY und STANNARD (1990), DAHME und WEISS (1999) als Basalzelltumoren zu befunden sind. Diese Tumoren werden folgend, anhand der von GOLDSCHMIDT et al. (1998) novellierten WHO-Klassifikation epithelialer und melanotischer Tumoren der Haut, in der eine ausschließliche Reklassifizierung dieser Neoplasien als Trichoblastome vorgenommen wurde, neu diagnostiziert. Anschließend werden die neu zu diagnostizierenden Tumortypen kurz dargestellt.

Die Beurteilung der immunhistochemischen Färbung mittels des Antikörpers p63 erfolgte analog wie unter Punkt 3.2.6.2.3. aufgeführt.

#### **3.2.6.5. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen caniner Haut mittels des Antikörpers AE1**

In den der Reklassifizierung zugrunde liegenden immunhistochemischen Untersuchungen (SCHNEIDER 2002) kam der Antikörper AE1 zum Einsatz. Es wurde von SCHNEIDER (2002) zunächst die Immunreaktivität der caninen Epidermis und der Haarfollikel mit diesem Antikörper getestet, als Grundlage zur Bewertung der immunhistochemischen Ergebnisse, die sie anhand dieses Markers an den Trichoblastomen erzielte.

In der vorliegenden Studie fiel bei der Auswertung der AE1-gefärbten mammären Gewebeveränderungen in 8 Fällen, die ebenfalls canine Haut in der Gewebeprobe enthielten, eine -von den negativen Ergebnissen SCHNEIDERS (2002) abweichende- positive Immunreaktivität der caninen Epidermis auf. Daher wird folgend die canine Epidermis in diesen 8 Fällen, sowie an 4 weiteren, in der Sektionshalle entnommenen und AE1-gefärbten Hautproben, beurteilt.

In der Auswertung werden die angefärbten Strukturen, die positiv reagierenden Zelltypen und die Intensität der Anfärbung beschrieben.

### **3.3. ERGEBNISSE**

Zunächst erfolgt eine Darstellung der Ergebnisse der Vorversuche und die Beurteilung der verwendeten Positiv- und Negativkontrollen. Der anschließende Teil ist in 3 Abschnitte untergliedert:

- Abschnitt I gibt die Testergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mittels des humanen Kernproteinantikörpers Anti-Human p63 Protein wieder, die in Hinblick auf seine Eignung im caninem Gewebe durchgeführt wurden.
- Im II. Abschnitt sind die Ergebnisse der Untersuchungen an den basaloiden Proliferationen und Neoplasien der Mamma, einschließlich der zugehörigen Lymphknoten aufgeführt.
- Abschnitt III gibt die Resultate der immunhistochemischen Untersuchungen mittels des Antikörpers p63 an den nach WEISS und FRESE (1974) als Basalzelltumoren bezeichneten Neoplasien wieder. Zusätzlich werden die Resultate der immunhistochemischen Färbungen mittels des Antikörpers AE1 an caniner Haut dargestellt, um die immunhistochemischen Untersuchungen, die der Reklassifizierung dieser Tumoren als Trichoblastome als Grundlage dienen, zu ergänzen und evaluieren zu können.

#### **3.3.1. Ergebnisse der Vorversuche der immunhistochemischen Färbungen und die Beurteilung der verwendeten Positiv- und Negativkontrollen**

##### **3.3.1.1. Ergebnisse der Vorversuche der immunhistochemischen Färbungen**

In den Vorversuchen ergab sich für den HHF35, dass keine Vorbehandlung erforderlich und die geeignetste Verdünnungsstufe 1:50 ist.

Für den Antikörper p63 stellte sich heraus, dass eine zweimalige fünfminütige Hitzebehandlung im Mikrowellengerät in Target Retrieval Puffer (ph:6,0) bei 600 Watt und anschließender 15-minütiger Abkühlung bei Raumtemperatur in einer Verdünnungsstufe von 1:25 die geeignetste Vorverdauungsmethode ist.

Diese Vorbehandlungen und Verdünnungsstufen kamen, ebenso wie die unter Punkt aufgeführten für die Antikörper LP34, AE1 und CK14, in den Hauptversuchen zum Einsatz.

##### **3.3.1.2. Beurteilung der verwendeten Positiv- und Negativkontrollen**

Die bei jedem Färbvorgang mitlaufenden Positivkontrollen wiesen stets das nachzuweisende Antigen auf, so dass die einwandfreie Anwendung der Färbetechnik bestätigt war.

Die Negativkontrollen färbten sich erwartungsgemäß nicht an, womit die Reaktionsspezifität der jeweiligen Antikörper gewährleistet war.

## **Abschnitt I**

### **3.3.2. Untersuchungsergebnisse des Testes mit dem Anti-Human p63-Protein im Hinblick auf seine Eignung in caninem Gewebe**

#### **3.3.2.1. HE-Färbung**

Die zur Untersuchung ausgewählten Proben weisen in der Beurteilung der HE-Färbung keine pathologisch-anatomischen Veränderungen auf.

#### **3.3.2.2. Immunhistologische Ergebnisse**

##### **3.3.2.2.1. Immunhistochemische Befunde der p63-Färbungen an caniner Haut**

In allen untersuchten Gewebeproben stellt der Antikörper p63 regelmäßig und homogen folgende Strukturen der Haut und ihrer Anhangsorgane deutlich und mit starker Färbeintensität dar:

1. Kubische, ovale und vereinzelt prismatische Zellkerne der germinativen Schicht der Epidermis, dem Stratum basale
2. Runde und ovale Zellkerne der äußeren epithelialen Wurzelscheide der Haare

##### **3.3.2.2.2. Immunhistochemische Befunde der p63 Färbungen an caninem pathologisch unveränderten Mammagewebe**

Es ist eine homogene, regelmäßige Anfärbung der Nuklei der Myoepithelien von starker Intensität in allen der untersuchten Gewebeproben des physiologischen Mammaparenchyms zu beobachten. Dem glandulären und duktalem Epithel direkt anliegend, werden die flachen, kubischen und teils auch rundlichen Kerne sehr gut dargestellt.

Durch das nukleäre Färbeprofil ist eine deutliche Darstellung dieser Zellen möglich. Die sich in ihrer Zellmorphologie als verzweigt darstellenden Myoepithelien konnten durch einen Marker mit zytoplasmatischem Färbeprofil zwar in ihrer Einheit, jedoch nicht, wie mit dem Zellkernmarker p63, individuell als Einzelzelle erkannt werden.

### **3.3.2.2.3. Zusammenfassende Beurteilung der immunhistochemischen Färbeergebnisse des humanen Antikörpers p63 im untersuchten caninem Gewebe**

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der monoclonale Antikörper, Anti-Human p63 Protein, in der durchgeführten Studie eine ausgesprochen gute antigene Reaktivität im caninem Gewebe zeigt und sich durch eine hohe Spezifität und eine hohe Sensitivität auszeichnet, die sich in der durchweg homogenen Anfärbung im Gesamtbild und in den starken Intensitäten der Anfärbung äußert, welche in allen Proben zu verzeichnen ist.

Basalzellen des Stratum basale der Epidermis und epidermaler Differenzierungsprodukte, sowie die basalen/myoepithelialen Zellen im caninem Mammaparenchym reagieren zuverlässig mit diesem humanen Antikörper und zeigen eine starke Intensität bei ihrer Anfärbung.

## **Abschnitt II**

### **3.3.3. Ergebnisse der Untersuchungen an den basaloiden Neoplasien und Proliferationen im Mammaparenchym der Hündin**

#### **3.3.3.1. Nationale**

##### **3.3.3.1.1. Altersverteilung**

Die Tiere sind im Durchschnitt 9,3 Jahre alt, wobei die Altersangabe bei einem Tier fehlte. Der jüngste Patient (Tibet-Terrier, weiblich) ist 4 Jahre alt, der älteste (Rauhaardackel, weiblich) 14 Jahre.

##### **3.3.3.1.2. Geschlechtsverteilung**

Im Untersuchungskollektiv stammen 20 Gewebeproben von weiblichen Tieren. Bei einem Tier fehlte die Geschlechtsangabe. Es liegen leider keine Angaben darüber vor, ob diese Tiere kastriert oder einer hormonellen Behandlung unterzogen wurden.

##### **3.3.3.1.3. Rasseverteilung**

Das Patientengut beinhaltet neben Mischlingen insgesamt 8 Rassen. Die verschiedenen Rassen sowie ihre Vorkommenshäufigkeit in der Studie sind aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich.



Im Untersuchungsgut vorkommende Rassen

<b>Rang</b>	<b>Rasse</b>	<b>n</b>	<b>davon</b>
1	Mix	7	1 Beagle-Mix 1 Cocker-Mix 1 Dackel-Mix 1 Foxterrier-Mix 1 Golden Retriever-Mix 1 Terrier-Mix 1 Mischling-ohne weitere Angabe
2	Terrier	3	1 Cairn Terrier 1 Tibet-Terrier 1 Westhighlandterrier
3	Dackel	2	1 Rauhaardackel 1 Dackel ohne weiteren Angaben
	Beagle	2	
	DSH	2	
	Dobermann	2	
4	Boxer	1	
	Deutsch-Langhaar	1	
		Summe:	20

n=Anzahl der Tiere

**3.3.3.2. HE-Diagnostik****3.3.3.2.1. HE-Diagnostik der basaloiden Gewebeveränderungen****3.3.3.2.1.1. Ermittlung der histomorphologischen Erscheinungsbilder**

Anzumerken ist, dass die in dieser Studie untersuchten basaloiden Veränderungen von multifokal auftretenden Proliferationen unterschiedlicher Stadien bis zu solitären profunden Tumoren reichen. In den folgend aufgeführten Tabellen ist für jeden Fall sein histomorphologisches Erscheinungsbild in der HE- Färbung beschrieben.

**Übersicht des histomorphologischen Erscheinungsbildes in der HE- Färbung unter Berücksichtigung ihres solitären- bzw. multiplen Vorkommens**

**I. Darstellung der 14 Fälle mit *solitär* vorkommenden basaloiden Neoplasien**

1.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
01	605-94	<ul style="list-style-type: none"> <li>- keine Verbindung zur darüber liegenden Haut zeigend, liegt der Tumor, durch eine zarte bindegewebige Kapsel begrenzt, in der Subkutis und ist teils von Mammagewebe umgeben bzw. nimmt von dort seinen Ursprung;</li> <li>- der Tumor besteht aus mehreren Teilknoten, die durch bindegewebige Septen begrenzt sind;</li> <li>- das Stroma weist oft leere Spalten auf, was in einigen Arealen den Eindruck eines mikrozystischen Geschehens verleiht, bzw. den Eindruck falscher Lumina vermittelt;</li> <li>- die peripheren basaloiden Zellen sind palisadenartig angeordnet, während die zentralen Zellen squamöse, keratotische (s.Abb.2) und teils auch drüsige Differenzierung, also tubuläre Strukturen zeigen;</li> <li>- ebenfalls sind in einigen Teilknoten solide Strukturen ausgebildet, die sich einerseits in bandartigen Strukturen (palisadenartig angeordnete Zellen doppelreihig) zeigen und sich andererseits als lumenfüllend darstellen;</li> <li>- Zelltypen als Abweichungen vom uniformen basaloiden Zellbild sind in einigen kleinen soliden Anteilen zu beobachten;</li> <li>- im Gesamtbild zeigt sich der Tumor in großen Arealen von gut differenzierter tubulärer Struktur mit palisadenartig angeordneten peripheren Zellen, und die neoplastischen Zellen zeichnen sich durch ihr basaloides, monomorphes Erscheinungsbild, keine Mitosen aufweisend, aus (s. Abb. 1);</li> <li>- angrenzend zum fokalem Areal, in welchem solide Strukturen mit Zellpleomorphien zu beobachten sind, zeigt sich ein infiltratives Wachstum in die umgebende Kapsel.</li> </ul>

2.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
03	726-95	<ul style="list-style-type: none"> <li>- der Tumor liegt mitten im Mammagewebe, zeigt keine Verbindung zur darüberliegenden Haut und besteht aus mehreren Teilknoten, die durch deutlich ausgeprägte bindegewebige Kapseln vom Mammagewebe abgegrenzt sind;</li> <li>- die Teilknoten zeigen solide Formationen, die sich in großen Arealen aus bandartigen Formationen (palisadenartige Anordnung der Tumorzellen) zusammensetzen (s.Abb. 5 und 6);</li> </ul>

(03)	(726-95)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- auffällig ist die starke Bindegewebsproliferation, angrenzend zur Neoplasie;</li> <li>- vereinzelt sind zentrale Nekrosen in einigen der Teilknoten zu beobachten;</li> <li>- die neoplastischen Zellen besitzen eine basaloide, uniforme Zellmorphologie, vereinzelt sind Zellatypien zu sehen;</li> <li>- infiltratives Wachstum ist zu beobachten.</li> </ul>
------	----------	---

3.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
04	1521-95	<ul style="list-style-type: none"> <li>- diffus vermehrte basaloide Zellen, vereinzelt sind Lumina zu beobachten;</li> <li>- Spaltbildungen im sehr gering ausgebildeten Stroma und im neoplastischen Gewebe;</li> <li>- infiltratives Wachstum.</li> </ul>

4.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
05	1979-96	<ul style="list-style-type: none"> <li>- in der Peripherie palisadenartige Anordnung der basaloiden Zellen, während die zentralen Zellen drüsige, aber größtenteils keratotische Differenzierung zeigen;</li> <li>- durch lumenfüllende Proliferation sind solide Bezirke entstanden;</li> <li>- Spaltenbildung im Stroma;</li> <li>- in einem Bereich ist ein infiltratives Wachstum in die umgebende Kapsel zu beobachten.</li> </ul>

5.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
06	2809-96	<ul style="list-style-type: none"> <li>- der Tumor dieser Gewebeprobe liegt im Mammagewebe, zeigt keine Verbindung zur darüber liegenden Haut und setzt sich aus multiplen Einzelknoten zusammen;</li> <li>- es sind palisadenartige Anordnungen der peripheren Zellen zu sehen, die teils auch "Bänder" formieren;</li> <li>- zentrale Zellen zeigen zum einen drüsige Differenzierung, aber zum größten Teil keratotische Differenzierung, wobei sich in vielen Bezirken keratotische zystische Hohlräume gebildet haben.</li> <li>- ebenfalls sind in einem Areal vereinzelt Zysten mit eosinophilen amorphen Material (Cholesterinkristalle);</li> <li>- infiltratives Wachstum ist zu beobachten.</li> </ul>

6.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
07	2853-96	<ul style="list-style-type: none"> <li>- der Tumor zeigt drei ineinander fließende Areale:</li> <li>- in einem Areal sind basaloide Drüsenhyperplasien zu beobachten;</li> <li>- im anschließendem sind Differenzierungen, die an das Bild des papillären Hidradenom des Menschen erinnern (bandartige Strukturen zeigen sich durch doppelreihige Anordnung palisadenartig formierter basaloider Zellen; s.Abb.7);</li> <li>- im nun anschließenden Areal zeigen die peripheren Zellen palisadenartige Anordnung, die zentralen Zellen drüsige (tubuläre) Differenzierungen; in kleinen Arealen sind auch solide Strukturen durch lumenfüllende Proliferation des Drüsenepithels gebildet worden, welche Zellpleomorphien in Form von Anisozytose, -nukleose, vakuolisierte Zytoplasmen und auch prominente Nukleoli zeigen;</li> <li>- im Bereich des zuletzt beschriebenen Areals ist infiltratives Wachstum in die Kapsel zu beobachten.</li> </ul>

7.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
08	540-97	<ul style="list-style-type: none"> <li>- der Tumor liegt im Mammaparenchym und zeigt keine Verbindung zur Haut;</li> <li>- er ist von einer unterschiedlich stark ausgeprägten Kapsel zum Mammagewebe und der darüberliegenden Haut abgegrenzt;</li> <li>- Zellnester basaloider Zellen sind durch ein stark ausgeprägtes Bindegewebe voneinander getrennt (s. Abb. 8)</li> <li>- infiltratives Wachstum in die umgebene Kapsel ist zu beobachten.</li> </ul>

8.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
09	913-97	<ul style="list-style-type: none"> <li>- die Neoplasie ist durch eine zarte Kapsel vom umliegenden Mammagewebe abgegrenzt und zeigt eine Drüsendifferenzierung unter Ausbildung tubulärer Strukturen, mit palisadenartig angeordneten peripheren Zellen;</li> <li>- das Gesamtbild erinnert an die Struktur eines papillär-zystischen Syringadenoms;</li> <li>- vereinzelt sind auch durch intraluminal epitheliale Proliferationen solide Strukturen ausgebildet worden;</li> <li>- der überwiegende Anteil der neoplastischen Zellen ist von basaloider Morphologie, jedoch sind auch in Bereichen solider Struktur Zellpleomorphien zu beobachten;</li> </ul>

(09)	(913-97)	- in einer Lokalisation ist ein infiltratives Wachstum in die Kapsel zu beobachten (s. Abb. 9).
------	----------	---

9.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
10	684-01	<ul style="list-style-type: none"> <li>- durch eine Kapsel gut abgegrenzter Tumor, der im Inneren durch Bindegewebssepten unterteilt ist;</li> <li>- innerhalb der "Läppchen" sind multifokale solide Strukturen ausgebildet, deren basaloide periphere Zellen palisadenartig angeordnet sind; nur in fokalen Bereichen fehlt diese periphere palisadenartige Anordnung, und es sind vereinzelt Zellpleomorphien in diesen Arealen zu beobachten;</li> <li>- multifokal sind keratotische kleine Herde erkennbar, im Stroma sind leere Spalten zu beobachten;</li> <li>- beginnende Infiltration in die Kapsel.</li> </ul>

10.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
11	684-01	<ul style="list-style-type: none"> <li>- durch eine zarte Kapsel abgegrenzt, weist der Tumor in allen Arealen Drüsendifferenzierung der basaloide Zellen auf, teils sind die Lumina erweitert;</li> <li>- die peripheren basaloide Zellen sind palisadenartig angeordnet.</li> </ul>

11./12.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
19/ 20	2754-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>- es wurden zwei Tumoren (mit einem Durchmesser 2,5 mm) eingeschickt: beide sind durch eine Kapsel deutlich abgegrenzt und zeigen sich multinodulär;</li> <li>- beide Neoplasien bestehen aus uniformen basaloide Zellen, die zentral drüsige und keratotische Differenzierungen und in der Peripherie eine palisadenartige Anordnung zeigen;</li> <li>- während die Neoplasie (Fall 19) ein infiltratives Wachstum in die umgebende Kapsel zeigt (s. Abb. 14), ist dies beim zweiten Tumor (Fall 20) nicht zu beobachten;</li> <li>- zudem zeigt Fall 19 in kleinen Arealen eine Differenzierungsabnahme in Form von Zellpleomorphien.</li> </ul>

13.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
21	2761-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>- multilobulärer Tumor, der streckenweise durch eine dicke und an einzelnen Bereichen durch eine dünne Kapsel begrenzt ist;</li> <li>- bindegewebige Stränge im Inneren verleihen ihm ein lobuliertes Aussehen;</li> <li>- das Gesamtbild zeigt basaloide Zellen, welche in weiten Teilen bandartige Strukturen durch eine doppelreihige, palisadenartige Anordnung haben (s. Abb. 15)</li> <li>- in einigen Lobuli ist eine Drüsendifferenzierung zu sehen;</li> <li>- keratotische Herde sind in vielen Lobuli zu beobachten;</li> <li>- in mehreren Bezirken sind leere Lumina und Spalten zwischen den bandartigen Strukturen zu sehen;</li> <li>- durch Lumenproliferationen sind in vielen Lobuli solide Formationen entstanden, wobei in fokalen Herden eine Differenzierungsabnahme feststellbar ist; die zentralen Zellen zeigen bereits Abweichungen in ihrer Zellmorphologie, in Form von Anisozytosen, -nukleosen, vakuolisierten Zytoplasmen, prominenten Nukleoli, bzw. vereinzelt weisen auch Zellkerne mehrere Nukleoli auf;</li> <li>- einige der Läppchen zeigen Nekrosen;</li> <li>- infiltratives Wachstum in die Kapsel ist zu beobachten.</li> </ul>

14.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
22	2735-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>- durch eine zarte äußere Kapsel vom umgebenen Mammagewebe abgegrenztes, in sich aber multifokal erscheinendes Adenom (durch Septen kompartiert);</li> <li>- es besteht aus basaloiden Zellen, in der Peripherie palisadenartig angeordnet, während die zentralen Zellen zum Teil drüsig differenzieren, teils lumenfüllend solide Strukturen bilden und sich teils auch - analog eines Syringadenoms - differenzieren (s. Abb. 17 und 18)</li> </ul>

### Histomorphologische Kriterien der solitären Neoplasien im Überblick

Fall Nr.	E-Nr.	Keratotische Anteile*	Kapsel**	Binde-gewebssepten**	Nekrosen im Tumorge-webe***
01	605-94	++	++	+	+
03	726-95	-	++	++	+
04	1521-95	-	-	-	-
05	1979-96	+	+	-	-
06	2809-96	+++	+	++	-
07	2853-96	-	+	+	-
08	540-97	-	+ - +++	++	-
09	913-97	+	+	-	-
10	684-01	+	+	+	-
11	684-01	-	+	+	-
19	2754-03	++	++	+	-
20	2754-03	++	+++ - ++++	+	-
21	2761-03	+++	+ - +++	+++	+ - ++
22	2735-03	-	+	+ - ++	-

Legende:

	-	+	++	+++
*	keine keratotischen Anteile	kleine fokale Herde	multifokal kleine und größere keratotische Herde	multiple keratotische Differenzierungen mit Zystenbildung
**	nicht ausgebildet	schwach ausgebildet	moderat ausgebildet	stark ausgebildet
***	nicht ausgebildet	vereinzelt fokale Nekrosen	multifokal nekrotische Areale	-

**II. Darstellung der 8 Fälle mit *multipel* auftretenden basaloiden Proliferationen und Neoplasien**

1.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
02	2428-94	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mehrere multifokale lobuläre, das Lumen ausfüllende solide Proliferationen uniformer Zellen basaloiden Phänotyps, die weder Atypien noch Mitosefiguren aufweisen;</li> <li>- in extralobulären Gängen bilden Proliferationen basaloider, uniformer Zellen solide Strukturen (s. Abb. 4), die durch die palisadenartige Anordnung der Zellen bandartige Strukturen zeigen; Spaltbildungen innerhalb der soliden Proliferationen sind zu beobachten (s. Abb. 3).</li> </ul>

2.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
12	1451-02	<ul style="list-style-type: none"> <li>- im Gesamtbild zeigt sich eine ausgeprägte primäre Multiplizität in Form von vielen multifokal ausgebildeten Tumoren variierender Größe;</li> <li>- die größeren Tumoren weisen unterschiedlich stark ausgeprägte zentrale Nekrosen auf, erscheinen in ihrem Wachstum invasiv und zeigen eine Tendenz, untereinander zu konfluieren; sie sind überwiegend von solider Struktur; verstreut sind äußerst vereinzelt Lumina im Tumorgewebe ausgebildet; die den Tumor formierenden Zellen sind von basaloider Morphologie, multifokal sind jedoch auch Anisonukleosen, prominente, bzw. multiple Nukleoli sowie Hyper- und Hypochromatosen zu beobachten;</li> <li>- im umgebenden Mammagewebe sind multifokal außerordentlich viele unterschiedliche Stadien der Neoplasieentwicklung zu beobachten; verschiedene Größen aufweisend, zeigen sie ebenfalls Konfluations-tendenzen, vereinzelt auch schon Nekrosen; sie wirken invasiv;</li> <li>- das gesamte Mammagewebe erscheint unter ausgeprägter Proliferationsneigung zu stehen;</li> <li>- Zellpleomorphismus zeigt sich in einigen der Neoplasien in Form von Anisozytosen, -nukleosen, vakuolisierten Zytoplasmen, prominenten Nukleoli und Hypo- und Hyperchromatosen;</li> <li>- das an sie angrenzende Bindegewebe ist hyperplastisch (s. Abb. 10 und 11).</li> </ul>

3.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
13	1902-02	<ul style="list-style-type: none"> <li>- multifokale intraluminale epitheliale Proliferationen in den extralobulären Gängen unter Ausbildung solider Strukturen, welche ausgeprägte</li> </ul>



(13)	02 (1902)	<p>bandartige Formationen durch doppelreihig, palisadenartig angeordnete basaloide Zellen aufweisen; multifokale Spaltbildungen in den Proliferationen vermitteln den Eindruck falscher Lumina (s. Abb. 12)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- die Zellen sind basaloide und uniform, nur in vereinzelt Proliferationen sind in kleinen Arealen Abweichungen im Zellbild zu erkennen;</li> <li>- sehr vereinzelt sind lobuläre epitheliale basaloide Proliferationen zu beobachten;</li> <li>- das umgebende Mammaparenchym zeigt zudem sekretorische Aktivität.</li> </ul>
------	--------------	---

4.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
14	2951-02	<ul style="list-style-type: none"> <li>- es sind multifokale Proliferationen basaloider uniformer Zellen in die Lumina von Alveolen und kleinen Tubuli und vereinzelt in extralobuläre Gänge zu beobachten;</li> <li>- die peripheren Zellen sind palisadenartig angeordnet;</li> <li>- die ins Lumen proliferierten Zellen zeigen oftmals bandartige Formationen durch doppelreihige, palisadenartig angeordnete basaloide Zellen.</li> </ul>

5.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
15	177-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>- einige multifokale basaloide intraluminale Proliferationen im angrenzenden Gewebe zum Adenokarzinom;</li> <li>- die solide Struktur weist vereinzelt Spaltbildungen auf; bandartige Formationen durch doppelreihige, palisadenartig angeordnete basaloide Zellen sind ebenfalls zu beobachten;</li> <li>- es zeigen sich Abweichungen von der uniformen Zellmorphologie: Anisonukleosen, Hyper- und Hypochromatosen, prominente und multiple Nukleoli sowie Anisozytosen.</li> </ul>

6.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
16	533-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>- multifokale alveoläre und tubuläre Proliferationen basaloider Zellmorphologie, teils bandartige, teils solide Strukturen formierend, sind im angrenzenden Gewebe zu einem Adenokarzinom, welches Knorpelstrukturen aufweist, zu beobachten.</li> </ul>

7.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
17	561-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>- multifokale lobuläre und duktale basaloide Proliferationen, die solide Strukturen, teils mit Spaltbildung und auch bandartige Strukturen durch palisadenartig angeordnete Zellen formieren;</li> <li>- an einigen der Gewebeveränderungen sind in kleinen Arealen die Zellkerne hyperchromatisch und zeigen auch prominente Nukleoli.</li> </ul>

8.)

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b><u>Histomorphologisches Erscheinungsbild, Differenzierungen, bzw. Tumorstruktur</u></b>
18	1698-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>- lobuläre und vor allem duktale basaloide Proliferationen, teils lumenfüllend, teils bandartige Strukturen aufweisend, sind im angrenzenden Mammagewebe zum ausgebildeten umfangreicheren Adenokarzinom zu sehen;</li> <li>- die basaloide Zellen zeigen sich uniform, mit ovoiden Zellkernen, umgeben von wenig Zytoplasma und zeigen keine Mitosefiguren;</li> <li>- vereinzelt sind lumenfüllende alveoläre Lumenproliferationen zu beobachten, an denen Zellgrenzen nicht zu differenzieren sind und in ihrer Zellmorphologie von der basaloide Uniformität teils abweichen;</li> <li>- in einzelnen extralobulären Gängen sind in sehr vereinzelt Arealen Zellpleomorphien zu beobachten.</li> </ul>

### **Histomorphologische Kriterien der *multiple* vorkommenden Neoplasien im Überblick**

<b>Fall Nr.</b>	<b>E-Nr.</b>	<b>Keratotische Anteile*</b>	<b>Kapsel**</b>	<b>Binde-gewebssepten**</b>	<b>Nekrosen Im Tumor-gewebe***</b>
2	2428-94	-	-	-	-
12	1451-02	-	-	-	+++
13	1902-02	-	-	-	-
14	2951-02	-	-	-	-
15	177-03	-	-	-	-

Fortsetzung: Histomorphologische Kriterien der *multiple* vorkommenden Neoplasien im Überblick

Fall Nr.	E-Nr.	Keratotische Anteile*	Kapsel**	Binde-gewebssepten**	Nekrosen Im Tumorge-webe***
16	533-03	-	-	-	-
17	561-03	-	-	-	-
18	1698-03	-	-	-	-

Legende:

	-	+	++	+++
*	keine keratotischen Anteile	kleine fokale Herde	multifokal kleine und größere keratotische Herde	multiple keratotische Differenzierungen mit Zystenbildung
**	nicht ausgebildet	schwach ausgebildet	moderat ausgebildet	stark ausgebildet
***	nicht ausgebildet	vereinzelt fokale Nekrosen	multifokal nekrotische Areale	multifokale ausgeprägte Nekrosen

### 3.3.3.2.1.2. Klassifizierung der basaloiden mammären Gewebeeränderungen

Anhand der ermittelten deskriptiven histologischen Merkmale können nach den Empfehlungen der WHO-Klassifikation verschiedene Tumortypen unterschiedlicher Dignität diagnostiziert werden, die eine Übereinstimmung in ihrer basaloiden Zellmorphologie und histologischen Gewebetextur aufwiesen.

Zwanzig Gewebeprobe sind als Neoplasien oder Hyperplasien des Mammaparenchyms zu beurteilen. Das Untersuchungskollektiv umfaßt 2 basaloiden Adenome, ein komplexes Adenom, 3 Karzinoma in situ Veränderungen, 3 tubulopapilläre Karzinome, 5 adenosquamöse Karzinome, ein squamöses und ein solides Karzinom, sowie in 6 Gewebeprobe enthaltene, multifokal auftretende, epitheliale und duktales Hyperplasien.

2 der untersuchten Gewebeprobe sind als in das Mammaparenchym eingewachsene Basalzellkarzinome der Haut zu befunden.

Die Diagnosen der einzelnen untersuchten Gewebeprobe sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

<b>Fall Nr.</b>	<b>Diagnostik der basaloiden mammären Gewebeveränderungen in der HE-Färbung</b>
01	• Adenosquamöses Karzinom
02	• Epitheliale und duktales Hyperplasien
03	• Basalzellkarzinome vom infiltrativen Typ
04	• Tubulopapilläres Karzinom
05	• Adenosquamöses Karzinom
06	• Adenosquamöses Karzinom
07	• Tubulopapilläres Karzinom
08	• Basalzellkarzinome vom clear cell Typ
09	• Papillär-zystisches Karzinom
10	• Squamöses Karzinom
11	• Basaloides Adenom
12	• Solide Karzinome und nicht infiltrierende Karzinoma (in situ)
13	• Epitheliale und duktales Hyperplasien
14	• Epitheliale und duktales Hyperplasien
15	• Nicht infiltrierende Karzinoma (in situ)
16	• Epitheliale und duktales Hyperplasien
17	• Nicht infiltrierende Karzinome (in situ) und epitheliale und duktales Hyperplasien
18	• Epitheliale und duktales Hyperplasien
19	• Adenosquamöses Karzinom
20	• Basaloides Adenom
21	• Adenosquamöses Karzinom
22	• Einfaches Adenom

### **3.3.3.2.2. HE-Diagnostik der gesamten Gewebeprobe**

Neben den basaloiden Gewebeveränderungen sind in 11 von 22 untersuchten Fällen Adenokarzinome verschiedener Entwicklungsstufen zu befinden.

**Übersicht der neben den basaloiden Gewebeveränderungen in den Fällen zu diagnostizierenden Neoplasien und Gewebeveränderungen**

<b>Fall Nr.</b>	<b>E -Nr.</b>	<b>HE-Befund</b>
02	2428-94	- mehrere Adenokarzinome mit Nekrosen, Blutungen und infiltrativem Wachstum
05	1979-96	- es liegen sowohl verschiedene frühe Entwicklungsformen zu Adenokarzinomen, als auch Karzinoma in situ Stadien vor
06	2809-96	- einer der drei eingesandten Tumoren stellt ein höhermalignes Adenokarzinom der Mamma dar, aus multiplen Einzelknoten bestehend, die von myoepithelialer Hyperplasie und Sklerosierungstendenz begleitet sind; - infiltratives Wachstum ist zu beobachten, sowie Nekrosen und eine unspezifische Begleitentzündung
07	2853-96	- multiple Drüsenhyperplasien mit Stadien der Karzinoma in situ - Sklerosierungen - chronische Mastitis und Galaktophoritis
09	913-97	- als Karzinoma in situ zu befundene multiple frühe Proliferationsstadien des Drüsenepithels; - im Rahmen einer chronischen, fibrosierenden Entzündung und Abflußbehinderungen besteht eine Tendenz zur Zystenbildung.
10/ 11	684-01	- kleine Adenokarzinome; - Zysten und Fibrosierungen:
13	1902-02	- in einem Areal befinden sich mehrere Adenokarzinome mit Tendenz zur Ausbildung von Knorpelstrukturen - in der Peripherie finden sich die basaloiden duktaalen Hyperplasien
14	2951-02	- diffuse Fibrosierungstendenz - Zysten
15	177-03	- multiple Adenokarzinome bilden eine umfangreiche Neoplasie - in der Peripherie der Neoplasie finden sich die basaloiden Gewebeveränderungen
16	533-03	- von seiner Umgebung gut abgegrenztes Adenokarzinom, welches in weiten Teilen Knorpelgewebesstrukturen aufweist - in der Peripherie der Neoplasie finden sich die basaloiden Gewebeveränderungen

Fortsetzung: Übersicht der neben den basaloiden Gewebeveränderungen in den Fällen zu diagnostizierenden Neoplasien und Gewebeveränderungen

Fall Nr.	E -Nr.	HE-Befund
17	561-03	- mehrere Adenokarzinome, welche teils Knorpelstrukturen ausgebildet haben - Myoepitheliome - Zysten - in der Peripherie der Neoplasie finden sich die basaloiden Gewebeveränderungen
18	1698-03	- umfangreiches, durch eine bindegewebige Kapsel begrenztes Adenokarzinom, welches überwiegend Bereiche mit Knorpelstrukturen aufweist und in einigen Bereichen angrenzend eine assoziierte Hyperplasie des Myoepithels aufweist - in der Peripherie der Neoplasie finden sich die basaloiden Gewebeveränderungen
22	2735-04	- Zysten und Fibrosierungstendenz

In 8 Fällen (05, 09, 10, 11, 16, 17, 18 und 19) sind die in der vorangehenden Tabelle beschriebenen Befunde in der gleichen Gewebeprobe zu diagnostizieren. In einem Fall (Fall 06) kann anhand des Begleitschreibens vermutet werden, dass das Adenosquamöse Karzinom und das Adenokarzinom dem gleichen Mammakomplex entstammen. In 2 Fällen (Fall 02 und 07) ist im Begleitschreiben nicht angegeben, ob die beiden eingesandten Proben dem gleichen oder verschiedenen Mammakomplexen entstammen.

### 3.3.3.3. Beurteilung der PAS-Färbung

Zunächst kann mittels der PAS-Färbung in den Veränderungen der Fälle 11, 20, 22 die Anordnung der peripheren Zellen gegen eine dünne Basalmembranen deutlich dargestellt werden.

In insgesamt 8 Fällen (11, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22) ist die Basalmembran in allen Bereichen in ihrer Kontinuität dargestellt. Diskontinuierlich an Bereichen des infiltrativen Wachstums zeigt sie sich in 10 der Fälle (01, 03, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 19, 21), während in 2 Fällen (04, 12) durch die PAS-Färbung überwiegend fehlende Basalmembranen gezeigt werden. Im Fall 02 sind an den basaloiden Proliferationen der extralobulären Gänge weitgehend Basalmembranen in der PAS-Färbung dargestellt, die jedoch an den lobulären Proliferationen zumeist fehlen. Ebenfalls ist im Fall 17 überwiegend keine deutliche PAS-Reaktion an den basaloiden Proliferationen zu beobachten.

### 3.3.3.4. Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Antikörper der immunhistologischen Färbung dargestellt.

#### 3.3.3.4.1. Befunde der mit dem Antikörper AE1 gefärbten Gewebeproben

Der Antikörper AE1 ist im Mammaparenchym ein panepithelialer Marker, welcher durch den Nachweis der sauren Zytokeratine 10, 14, 15, 16 und 19 zur Identifikation und Differenzierung epithelialen Gewebes genutzt wird. Somit gibt er einen ersten Hinweis auf epitheliales Ursprungsgewebe.

Der Breitspektrum-AK reagierte mit den basalen und luminalen epithelialen Zellen. Dies hatte eine panepitheliale Anfärbung der epithelialen Anteile zur Folge. Die Einzelfallauswertung mit Darstellung der Verteilungsmuster und der Anfärbungsintensität ist dem Punkt 8.1. im Anhang zu entnehmen.

#### Zusammenfassende Darstellung der immunhistochemischen Befunde der AE1-Färbungen an den solitär und multipel vorkommenden basaloiden Proliferationen und Neoplasien unter Berücksichtigung des Verteilungsmusters und der Intensität der Anfärbung

Anzahl der Fälle	Färbeprofil AE1
22 Fälle	zeigen eine positive Färbereaktion <b>der basalen / myoepithelialen, suprabasalen und luminalen</b> Zellen ;
davon weisen 20 Fälle	eine gleichmäßiges, homogenes Färbeprofil, starker Intensität auf;
während ein Fall	eine stärkere Intensität in der Anfärbung der suprabasalen und basalen Zellen zeigt;
und ein Fall	zwar ebenfalls eine positive Reaktion dieser Zellen zeigt, jedoch nur in multiplen fokalen Herden.

Die Tabelle zeigt, dass in 21 Fällen eine homogene Anfärbung erfolgte, nur in einem Fall (Fall 03) waren die Immunreaktionen auf multiple fokale Herde beschränkt. Ähnliches ist für die Intensität der Anfärbung zu beobachten, die in 21 Fällen als starke Anfärbung zu beurteilen ist, während ein Fall (Fall 04) eine starke Anfärbung der luminalen Zellen, im Gegensatz zu den moderat gefärbten basalen/myoepithelialen Zellen, zeigt.

Durch den Einsatz des Antikörpers AE1 konnte in allen Fällen der Nachweis des epithelialen Ursprungs der basaloiden Proliferationen und Hyperplasien des caninen Mammaparenchyms demonstriert werden.

### 3.3.3.4.2. Befunde der mit dem Antikörper LP34 gefärbten Gewebeproben

Der Antikörper LP34 dient der Markierung der Zytokeratine 5, 6 und 18. Sein zelluläres Färbemuster ist in einer intensiven Rotfärbung des Zytoplasmas sichtbar.

Es konnte gezeigt werden, dass der Antikörper LP34 auch an Paraffinschnitten einen Nachweis des Zytokeratins CK 18 erbringt und nicht nur, wie bekannt, an Gefrierschnitten. Ersichtlich ist dies aus der Anfärbung der adluminalen Zellen, welche dieses Zytokeratin im Gegensatz zu den basalen Zellen enthalten.

Die Einzelfallauswertung ist dem Punkt 8.2. im Anhang zu entnehmen.

#### Zusammenfassende Darstellung der immunhistochemischen Befunde der LP34-Färbungen an den *solitär* und *multipel* vorkommenden basaloiden Proliferationen und Neoplasien unter Berücksichtigung des Verteilungsmusters und der Intensität der Anfärbung

Anzahl der Fälle	Färbeprofil LP 34
12 Fälle	zeigen eine positive Reaktion der <b>basalen, suprabasalen</b> und <b>luminalen</b> Zellen;
davon weisen 6 Fälle	eine gleichmäßige, homogene Anfärbung im Gesamtbild auf;
während 3 Fälle	eine intensivere Anfärbung der basalen/myoepithelialen Zellen zeigen (basalzellbetontes Gesamtbild);
in einem Fall	sind die luminalen Zellen mit stärkerer Intensität gefärbt, wodurch drüsig differenzierte Strukturen gut zu identifizieren sind; des Weiteren zeigen große Areale positive Reaktionen;
ein Fall	hat ein wechselhaftes Gesamtbild, durch moderat und stark angefärbte Bereiche;
in einem Fall	erfolgte eine Anfärbung multifokaler Areale, in denen entweder basale oder basale, suprabasale und luminalen Zellen gefärbt sind.



Fortsetzung: Zusammenfassende Darstellung der Resultate des Antikörpers LP34

<b>6 Fälle</b>	zeigen eine positive Reaktion der <b>basalen/myoepithelialen</b> Zellen;
davon weisen 3 Fälle	eine homogene basale Anfärbung auf;
während in 3 Fällen	zusätzliche folgend aufgeführte Anfärbungen zu verzeichnen sind: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. eine diffuse Anfärbung von Einzelzellen im Tumor,</li> <li>2. eine Anfärbung fokaler Herde, in denen sich alle Tumorzellen positiv darstellen</li> <li>3. eine Anfärbung suprabasaler und luminaler Zellen in fokalen Herden.</li> </ol>
<b>4 Fälle</b>	zeigen diffuse Anfärbung aller Tumorzellen.

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass in 12 Fällen, also in mehr als der Hälfte der untersuchten Fälle der Antikörper LP34 die Zytokeratine 5 und 18 nachwies. In 6 Fällen markierte er nur das Zytokeratin 5. Eine positive Reaktion aller den Tumor bildenden Zellen zeigte sich in 4 Fällen.

Die basalen Zellen wurden in 11 Fällen mit starker, in 9 mit moderater und in 2 Fällen mit schwacher Intensität gefärbt. Im Vergleich betrachtet, erfolgte die Anfärbung der suprabasalen und luminalen Zellen weitgehend im ähnlichen Bereich: in 8 Fällen erfolgte ein starke, in 10 eine moderate und nur in einem Fall ein schwache Intensität der Anfärbung.

#### Zusätzliche Beurteilung der Immunreaktivität des physiologischen, d.h. pathologisch unverändertem Mammaparenchyms mit dem Antikörper LP34

In 11 der untersuchten Fälle konnte zusätzlich das ebenfalls in der Gewebeprobe enthaltene pathologisch unveränderte Mammagewebe in seiner Immunreaktivität mit dem Antikörper LP 34 beurteilt werden. Bei Betrachtung der LP34 Immunreaktivität des unveränderten Mammagewebes zeigt sich ein ähnliches Bild. In 5 Fällen konnte ein alleiniger Nachweis des Zytokeratins 5 beobachtet werden (d.h. nur eine auf die basalen Zellen beschränkte Reaktion), während in 6 Fällen durch die Markierung der Zytokeratine 5 und 18 das basale und lumbale Epithel in der Färbung dargestellt wurde.

#### **3.3.3.4.3. Befunde der mit dem Antikörper CK14 gefärbten Gewebeproben**

Mittels des eingesetzten monoclonalen Antikörpers wird das Zytokeratin 14, ein saures Zytokeratin, Typ I, im Zytoplasma der Basalzellen der Haut und der Myoepithelzellen markiert (s. Abb. 13), wodurch dieser Antikörper in der Erforschung der Histogenese eingesetzt werden kann.

Die detaillierte Beschreibung der immunhistologisch positiv dargestellten Strukturen und die sich daraus ergebenden Verteilungsmuster sowie die Intensitäten der Anfärbungen der einzelnen Gewebeproben sind in den im Anhang unter Punkt 8.3. aufgeführten Tabellen ersichtlich.

**Zusammenfassende Darstellung der immunhistochemischen Befunde der CK 14-Färbungen an den solitär und multipel vorkommenden basaloiden Proliferationen und Neoplasien unter Berücksichtigung des Verteilungsmusters und der Intensität der Anfärbung**

<b>Anzahl der Fälle</b>	<b>Färbeprofil CK14</b>
<b>9 Fälle</b>	zeigen eine charakteristische Zeichnung durch die einheitliche Anfärbung der <i>basaloiden</i> Basal-/Myoepithelzellen;
davon weist 1 Fall	eine homogene Anfärbung der basaloiden Basal-/Myoepithelzellen auf; die myoepithelialen Schichten scheinen vollständig an den basaloiden Proliferationen ausgebildet zu sein (Fall 16);
während 8 Fälle	neben der basalen Färbung zusätzlich noch weitere Verteilungsmuster zeigen: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. verstreut reagieren neoplastische Einzelzellen in den soliden Anteilen positiv (Fall 11)</li> <li>2. vereinzelt fokale positive Herde (Fall 20, 21)</li> <li>3. einzelne fokale positive Herde und in fokalen Herden zeigen sich auch vereinzelt Suprabasalzellschichten positiv (Fall 01)</li> <li>4. multiple positive Herde (Fall 03, 22)</li> <li>5. Anfärbung der Suprabasalzellen und multifokale positive Herde (Fall 06)</li> <li>6. Anfärbung größerer Areale (Fall 04)</li> </ol>
<b>1 Fall</b>	zeigt ein zweigeteiltes Erscheinungsbild: in einem Teil des Tumors sind die Basal-/Myoepithelzellen in <i>basaloider</i> , in der anderen Hälfte in <i>spindelförmiger</i> Zellmorphologie dargestellt (Fall 07);
<b>1 Fall</b>	weist positive Reaktionen der basal lokalisierten und die Lumina auskleidenden Zellen auf, in teils <i>basaloider</i> aber auch <i>spindelförmiger</i> Morphologie und zeigt zusätzlich fokale positive Herde (Fall 22);
<b>6 Fälle</b>	zeigen eine homogene Anfärbung der <i>flachen, spindelförmig</i> basalen, myoepithelialen Zellen;
<b>1 Fall</b>	weist eine homogene Anfärbung der <i>spindelförmigen</i> und auch der <i>kubischen</i> basalen, myoepithelialen Zellen auf (Fall 15);

Fortsetzung: Zusammenfassende Darstellung der Resultate des Antikörpers CK14

<b>in einem Fall</b>	sind teils vollständige Schichten <i>spindelförmiger</i> Myoepithelien an den Proliferationen der extralobulären Gänge zu beobachten, aber an einigen ist die Myoepithelschicht nur abschnittsweise ausgebildet; an den intralobulären Proliferationen fehlt sie weitgehend (Fall 02)
<b>in einem Fall</b>	erscheint eine Schicht <i>spindelförmiger</i> Myoepithelien nur sehr vereinzelt an einigen Veränderungen ausgebildet zu sein (Fall 17)
<b>2 Fälle</b>	weisen eine Anfärbung aller neoplastischen <i>basaloiden</i> Zellen auf (Fall 8, 12))

Als positiv dargestellte Zellart repräsentierten sich in 20 Fällen die basal lokalisierten, d.h. sich direkt über der Basalmembran befindenden Zellen des Mammagewebes, die Basal-, bzw. Myoepithelzellen. In 2 Fällen (Fall 08,12) war eine Zuordnung aufgrund ihrer Lokalisation in der histologischen Struktur nicht möglich, da sich alle neoplastischen Zellen positiv darstellten. In einem Fall scheint zusätzlich zur basalen Anfärbung auch eine Anfärbung der lumenauskleidenden Zellen zu bestehen.

Mittels des zytoplasmatischen Antikörpers ist in 11 Fällen eine basaloide Morphologie der basalen/myoepithelialen Zellen darstellbar. In 9 Fällen zeigen sich die Zellen spindelförmig, während 2 Fälle Zellen von spindelförmiger und basaloider Gestalt haben und ein Fall neben spindelförmigen auch kubische Zellformen aufweist.

Die multiplen basaloiden Veränderungen betrachtend, sind 2 Fälle in ihrem Ergebnis eindeutig abweichend. Im Fall 16 sind myoepitheliale Schichten an den Veränderungen nur sehr vereinzelt darstellbar. Im Fall 02 sind an den extralobulären Hyperplasien neben vollständigen Myoepithelschichten auch einige von ihnen nur abschnittsweise ausgebildet, und an den intralobulären Veränderungen fehlen die Myoepithelschichten weitgehend.

Des Weiteren sind in 5 Fällen (01, 06, 19, 20, 21) positiv dargestellte keratinisierte Zellen zu beobachten, die mit starker Intensität angefärbt wurden (s. Abb. 2).

Auffällig ist die insgesamt relativ schwache Anfärbung dieses Antikörpers. In 15 Fällen ist eine schwache Intensität zu verzeichnen, in 3 Fällen eine moderate und in einem einzigen Fall eine starke Anfärbung. In 2 Fällen wechseln sich Bereiche schwacher und moderater Intensität ab und in einem Fall Bereiche moderater und starker Anfärbungen.

#### **3.3.3.4.4. Befunde der mit dem Kernproteinmarker p63 gefärbten Gewebeproben**

Die durch diesen AK markierten Zellen zeigen ein nukleäres Färbemuster, d.h. positiv reagierende Zellen weisen eine deutliche hellbraune Kernfärbung auf.

Die Auswertung der Einzelfälle ist dem Punkt 8.4. im Anhang zu entnehmen.

**Zusammenfassende Darstellung der immunhistochemischen Befunde der p63-Färbungen an den *solitär* vorkommenden basaloiden Proliferationen und Neoplasien unter Berücksichtigung des Verteilungsmusters und der Intensität der Anfärbung**

<b>Anzahl der Fälle</b>	<b>Färbeprofil p63</b>
<b>7 Fälle</b>	zeigen eine Anfärbung der Zellkerne der basalen/ myoepithelialen Zellen mit <i>basaloider</i> Zellmorphologie;
davon weist 1 Fall	ausschließlich eine Anfärbung der basal lokalisierten basaloiden Zellen auf (Fall 10);
während 6 Fälle	noch zusätzlich weitere Verteilungsmuster in der Färbung zeigen: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. einzelne fokale positive Herde, und in fokalen Herden zeigen sich auch vereinzelt Suprabasalzellschichten positiv (Fall 01);</li> <li>2. große Areale zeigen sich positiv mit Ausnahme der lumenauskleidenden Zellen (Fall 04);</li> <li>3. in fast allen Bereichen Anfärbung der mehrreihigen Bandstrukturen, sowie multifokal positive Herde, vereinzelt aber auch Areale positiver Zellen (Fall 06);</li> <li>4. sehr vereinzelt positive Herde (Fall 19 und 20);</li> <li>5. multiple positive Herde sowie multiple Bereiche, in denen sich mehrreihig Zellen positiv darstellen und dadurch bandartige Strukturen formieren (Fall 21);</li> </ol>
<b>2 Fälle</b>	zeigen eine homogene Anfärbung der Zellkerne aller <i>basaloiden</i> Tumorzellen (Fall 03,08; s. Abb. 5,6 und 8);
<b>1 Fall</b>	zeigt ein zweigeteiltes Erscheinungsbild, d.h. in einem Teil des solitären Tumors sind einheitlich die runden Zellkerne der <i>basaloiden</i> Basal-/Myoepithelzellen in, in der anderen Hälfte sind die Zellkerne in <i>spindelförmiger</i> Form dargestellt (Fall 07);
<b>1 Fall</b>	zeigt eine Anfärbung der Zellkerne der basalen aber auch lumenauskleidenden Zellen und in fokalen Herden auch suprabasalen Zellen; in einigen Arealen weisen diese <i>basaloiden</i> Zellen runde Zellkerne, in anderen zeigen sich Zellen mit <i>spindelförmigen</i> Zellkernen; zusätzlich zeigen sich fokale positive Herde (Fall 22).
<b>3 Fälle</b>	zeigen eine einheitliche Anfärbung <i>flacher, spindelförmiger</i> Zellkerne der basalen, myoepithelialen Zellen.

**Zusammenfassende Darstellung der immunhistochemischen Befunde der p63-Färbungen an den *multipel* vorkommenden basaloïden Proliferationen und Neoplasien unter Berücksichtigung des Verteilungsmusters und der Intensität der Anfärbung**

<b>Anzahl der Fälle</b>	<b>Färbeprofil p63</b>
<b>6 Fälle</b>	zeigen eine Anfärbung <i>flacher, spindelförmiger Zellkerne</i> der basalen, myoepithelialen Zellen;
davon weisen 4 Fälle	eine kontinuierlich ausgebildete myoepitheliale Schicht auf (Fall 13,14,16, 18);
in 1 Fall	zeigen die Proliferationen der extralobulären Gänge ebenfalls weitgehend eine vollständige myoepitheliale Schicht; diese Schicht ist jedoch an einigen wenigen dieser Veränderungen nur streckenweise nachweisbar; an den intralobulären Hyperplasien fehlt sie in der überwiegenden Anzahl der Veränderungen (Fall 02);
1 Fall	weist an den größeren Tumoren vereinzelt positiv reagierende Einzelzellen auf, und an den kleinen Neoplasien sind vereinzelt unvollständige Myoepithelschichten zu beobachten (Fall 12);
1 Fall	demonstriert die Anfärbung <i>spindelförmiger</i> und <i>kubischer Zellkerne</i> der basalen, myoepithelialen Zellen; vollständig ausgebildete Myoepithelschichten sind zu beobachten (Fall 15);
<b>in einem Fall</b>	erfolgte eine Anfärbung <i>basaloïder Zellkerne</i> der myoepithelialen/basalen Zellen; an einigen der proliferativen Veränderungen sind nur abschnittsweise Myoepithelschichten zu beobachten, an anderen fehlen die myoepithelialen Schichten vollständig (Fall 17).

Der Antikörper zeigt spezifisch eine p63-Expression im Zellkern der basalen/myoepithelialen Zellen. Es erfolgte durchweg eine homogene Anfärbung. Die Intensität der Anfärbung der einzelnen Fälle erfolgte in 10 der Fälle stark, in 8 Fällen moderat und lediglich in 3 Fällen schwach. Ein Fall wies ein wechselhaftes Gesamtbild mit stark und moderat gefärbten Bereichen auf.

In mehr als der Hälfte der untersuchten Fälle (12) konnte die basaloïde Morphologie der basalen/myoepithelialen Zellen gezeigt werden. Eine spindelförmige Erscheinung war in 9 Fällen, und ein kubisches Erscheinungsbild war in einem Fall zu beobachten. In zwei der untersuchten Neoplasien stellte die p63-Färbung die gleichzeitige Ausprägung des basaloïden und spindelförmigen Phänotyps der basalen/myoepithelialen Zellen in derselben Neoplasie dar.

Die Resultate der Immunfärbungen an den solitären Neoplasien zeigen in 5 der Fälle eine ausschließliche Anfärbung der basal lokalisierten Zellen, während in 6 Fällen zusätzliche

Verteilungsmuster in der Anfärbung zu beobachten sind. Eine homogene Anfärbung aller Zellkerne der neoplastischen Zellen zeigt sich in 2 Fällen, während in einem Fall neben basalen auch suprabasale und lumenauskleidende Zellen positiv reagieren.

Durch sein deutliches, nukleäres Färbemuster sind die Myoepithelschichten der multipel auftretenden Veränderungen exzellent zu beurteilen. So können in 4 Fällen der epithelialen und duktaalen Hyperplasien und in 2 Fällen der Karzinoma in situ vollständig ausgebildete myoepitheliale Schichten demonstriert werden. In 2 Fällen, die epitheliale und duktaale Hyperplasien aufweisen, kann die Myoepithelschicht an den Veränderungen nur abschnittsweise dargestellt werden, bzw. ihr Fehlen gezeigt werden. Im Fall 12 zeigen sich an den größeren Tumoren Einzelzellen positiv, und vereinzelt sind unvollständige Myoepithelschichten an den kleineren Veränderungen zu beobachten.

#### **3.3.3.4.5. Befunde der mit dem Antikörper HHF35 gefärbten Gewebeproben**

Der Antikörper HHF35 dient der qualitativen Identifizierung von Muskelaktin in normalem und neoplastisch verändertem Gewebe. Sein zelluläres Färbemuster ist zytoplasmatisch, d.h. positiv reagierende Myoepithelien präsentieren nach der immunhistochemischen Färbung ein rotes Zytoplasma.

Die Einzelfallauswertung ist im Anhang dem Punkt 8.5. entnehmbar.

Es ist festzustellen, dass nur in 3 Fällen positiv reagierende Myoepithelzellen durch die Rotfärbung ihres Zytoplasmas nachweisbar sind. In allen 22 Fällen zeigten jedoch die mitlaufenden Positivkontrollen, sowie die im Gewebe enthaltenen Blutgefäße, als interne Kontrolle fungierend, eine deutliche positive Reaktion der glatten Muskelzellen.

Im Stroma und in Kapseln enthaltene Myofibroblasten waren in 6 Fällen mit dem Antikörper HHF35 deutlich darstellbar.

Im Keratinisierungsprozess begriffene Zellen wurden in 2 der Fälle (01, 06) positiv dargestellt (s. Abb. 26)

#### Beurteilung des pathologisch unveränderten Mammagewebes in der Peripherie der basaloiden Veränderungen

In 12 Fällen enthielt die untersuchte Gewebeprobe physiologisches, d.h. pathologisch unverändertes Mammagewebe. Obwohl in allen untersuchten Gewebeproben sich Blutgefäße mittels positiver Reaktion ihrer glatten Muskelzellen gut anfärbten, waren in nur 2 der untersuchten Gewebeproben Myoepithel um alveoläre und duktaale Strukturen darstellbar, und in einem weiteren Fall erfolgte eine unregelmäßige, wenig homogene Färbung der myoepithelialen Zellen.

### **3.3.3.5. Vergleichende Darstellung der immunhistologischen Befunde der Basal-/Myoepithelzellmarker: CK14, p63 und HHF35**

Alle drei myoepithelialen Marker stellen übereinstimmend im Fall 11, 14 und 15 die basalen/myoepithelialen Zellen als spindelförmige und auch teils kubische Zellen dar.

Der Antikörper HHF35, nur in eben genannten Fällen positive Ergebnisse aufweisend, färbte als einziger der drei Antikörper ebenfalls Myofibroblasten im Stroma und in den Kapseln der Tumore, die durch ihre negative Reaktion mit den Antikörpern CK14 und p63 als solche differenziert werden konnten.

Keratinisierte Zellen wurden von HHF35 und CK14 übereinstimmend in den Fällen 01 und 06 positiv dargestellt, während der Antikörper CK14 in drei weiteren Fällen (19, 20, 21) keratinisierte Zellen markierte. Der Antikörper p63 färbte ausschließlich die Zellkerne der myoepithelialen/basalen Zellen.

Der Zytokeratinantikörper CK14 und der Kernproteinmarker p63 zeigen zwar in vielen der untersuchten Gewebeproben ähnliche Ergebnisse, jedoch sind deutliche Differenzen zu erkennen. Während CK14 im Fall 03, 04 und 21 multiple positive Herde zeigt, färbt der Antikörper p63 im Fall 03 alle Zellkerne der basaloiden neoplastischen Zellen an, im Fall 04 sind weitaus größere Areale positiv reagierender Zellen zu sehen, und im Fall 21 sind zusätzlich zu den multiplen Herden ebenfalls multiple Bereiche zu beobachten, in denen sich mehrreihig Zellen positiv darstellen und dadurch bandartige Strukturen formieren.

In den 7 Fällen (02, 13, 14, 15, 16,17 und 18) der multiple auftretenden Proliferationen ist die myoepitheliale Schicht in der CK 14 Färbung teils schwierig zu beurteilen. Die Anfärbung des schmalen, oft ausgezogenen Zytoplasmas, sowie die durchweg schwache Anfärbung durch den Antikörper CK14 bereiten der Differenzierung Probleme. Im Gegensatz dazu stellt der Antikörper p63 die Zellkerne der Myoepithelien deutlich dar und zeigt somit in 5 Fällen (13, 14, 15, 16, 18) ihre Kontinuität und in 2 Fällen Diskontinuitäten bzw. das deutliche Fehlen der myoepithelialen Schicht (02, 17).

Durch den Einsatz des Antikörpers CK14 und p63 kann in 2 der untersuchten Gewebeproben (Fall 10 und 12) eine Neoeffektion des Zytokeratins 14 durch maligne entartete Drüsenepithelien differenziert werden. Dadurch kann im Fall 12 die Diagnose des Vorliegens eines Myoepithelkarzinoms ausgeschlossen werden. In der Gewebeprobe des Falls 12 zeigen die neoplastischen Zellen eine einheitlich positive Reaktion mit dem Antikörper CK14. Durch den Kernproteinmarker p63 können an den größeren Tumoren Einzelzellen und an den multifokalen kleineren Neoplasien vereinzelt unvollständige basale/myoepitheliale Schichten dargestellt werden. Im Fall 10 ist die Neoeffektion in im Tumor verstreut liegenden Zellen zu beobachten.

Im Vergleich der Intensitäten der Anfärbarkeit zeigt sich, dass p63 in 19 Fällen mit starker bis moderater Intensität anfärbt, während CK14 dies nur in insgesamt 5 Fällen zeigt. Der Antikörper CK 14 färbt in 15 Fällen nur mit schwacher Intensität, p63 dies hingegen in nur dreien. In zwei Fällen färbte der Antikörper CK14 mit schwacher bis moderater Intensität. Der Antikörper HHF35 färbt 2 seiner positiven Fälle mit moderater und den dritten mit starker Intensität.

### **3.3.3.6. Durch den Einsatz der Basal-/Myoepithelzell-Marker erzielte Ergebnisse**

#### **3.3.3.6.1. Morphologische Darstellung der Basal-/Myoepithelzellen**

Die Antikörper CK 14, p63 und HHF35 wurden mit dem Ziel eingesetzt, die Zellart der untersuchten proliferativen und neoplastischen Veränderungen zu identifizieren und histogenetisch zuordnen zu können. Mit den Färbungen können zunächst durch die positiv reagierenden Zellen Aussagen über die Morphologie der basalen/myoepithelialen Zellen getroffen werden. So sind drei Phänotypen zu beobachten:

1. ein basaloides, epitheloides Erscheinungsbild
2. längliche, spindelförmige Zellen und
3. vereinzelt kubische Zellformen

Das basaloides Erscheinungsbild lässt die myoepithelialen-/ basalen Zellen in der HE-Färbung wie Drüsenepithelien erscheinen. Dies wurde in 12 der Fälle anhand der Immunfärbungen verifiziert.

Die kubische Form zeigte sich nur in einem Fall (15).

#### **3.3.3.6.2. Befundung einer Hyper- bzw. Neoplasie der basalen/myoepithelialen- Zellen mit basaloider Zellmorphologie**

Des Weiteren sind aufgrund der positiven Darstellung dieser Zellart Hyper- bzw. Neoplasien der myoepithelialen/basalen Zellen diagnostizierbar, die in der routinemäßigen HE-Färbung aufgrund des basaloiden, epithelzellähnlichen Erscheinungsbildes nicht zu differenzieren sind. Diese hyper- bzw. überwiegend neoplastischen Myoepithel-/Basalzellen tragen also mit unterschiedlich großen Anteilen zum Erscheinungsbild bzw. zum Ausmaß der untersuchten Veränderungen im Mammaparenchym bei.

Anhand der immunhistologischen Ergebnisse sind somit 3 der untersuchten Fälle als eine ausschließlich aus entarteten Basal-/Myoepithelzellen bestehende Neoplasie zu befunden (s. Abb. 5, 6 und 8)

In 3 Fällen wird deutlich, dass die neoplastisch entarteten Myoepithel-/ Basalzellen einen großen Anteil der untersuchten Tumoren darstellen (s. Abb. 16, 20-24).



Eine gleichzeitige Hyperplasie der Myoepithel-/Basalzellen, und zwar in basaloider Phänotypie, ist in einem Fall zu beobachten.

<b>Die Neoplasien bestehen nur aus entarteten Basal-/Myoepithelzellen</b>	<b>Neoplastische Basal-/Myoepithelzellen stellen einen großen Anteil der Neoplasie dar</b>	<b>Assoziierte Hyperplasie der basalen/myoepithelialen Zellen mit basaloider Zellmorphologie</b>
Fall 03 (E.- 726- 95)	Fall 06 (E.-2809- 96)	Fall 01 (E.- 605- 94)
Fall 04 (E.- 1521- 95)	Fall 21 (E.-2761-03)	
Fall 08 (E.-540- 97)	Fall 22 (E.-2735-04)	

So ist durch die angewandten Immunfärbungen eine Differenzierung der Diagnosen und die Bestimmung des Vorliegens von einfachen oder komplexen Neoplasien möglich.

### **3.3.3.6.3. Beurteilung von Myoepithelschichten an mammären Gewebeveränderungen**

Mittels immunhistochemischer Darstellung der basalen/myoepithelialen Zellen ist das Vorhandensein von Myoepithelschichten und ihre Vollständigkeit beurteilbar. Dies ermöglichte die differenzierte Diagnostik in 6 der untersuchten Fälle.

### **3.3.3.6.4. Beurteilung des Phänomens der Neoexpression in mammären Veränderungen**

Durch den Einsatz von myoepithelialen Markern mit unterschiedlichen antigenen Angriffspunkten an der basalen/myoepithelialen Zelle kann anhand des Ergebnisses der Immunfärbungen eine spezifische Diagnostik erfolgen. Eine Neoexpression des myoepithelialen Zytokeratins 14 durch neoplastisch entartete Drüsenepithelien kann, wie sie im Fall 10 und 12 vorlag, differenziert werden.

### **3.3.3.7. Befundung aller immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben im Vergleich zur HE-Färbung**

Alle HE- Schnitte der untersuchten basaloiden Gewebeveränderungen wurden mit den immunhistologisch gefärbten Präparaten verglichen und ausgewertet.

**I. Vergleichende Diagnostik der solitär vorkommenden Neoplasien**

<b>Fall Nr.</b>	<b>E.-Nr.</b>	<b>Diagnostik in der HE-Färbung</b>	<b>Diagnose unter Berücksichtigung der immunhistochemischen Färbungen</b>
01	605-94	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenosquamöses Karzinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenosquamöses Karzinom vom einfachen Typ; assoziierte myoepitheliale Hyperplasie</li> </ul>
03	726-95	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basalzellkarzinom vom infiltrativem Typ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basalzellkarzinom vom infiltrativem Typ</li> </ul>
04	1521-95	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubuläres Adenokarzinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Myoepithelkarzinom</li> </ul>
05	1979-96	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenosquamöses Karzinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenosquamöses Karzinom vom einfachem Typ</li> </ul>
06	2809-96	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adnosquamöses Karzinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenosquamöses Karzinom vom komplexen Typ</li> </ul>
07	2853-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubuläres Adenokarzinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubuläres Adenokarzinom</li> </ul>
08	540-97	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basalzellkarzinom vom Clear-cell-Typ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die Diagnose eines Basalzellkarzinoms vom Clear-cell-Typ sowie die eines Myoepithelkarzinoms kommt in Betracht</li> </ul>
09	913-97	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Papillär-zystisches Adenokarzinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Papillär-zystisches Adenokarzinom vom einfachen Typ</li> </ul>
10	684-01	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenosquamöses Karzinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenosquamöses Karzinom vom einfachen Typ</li> </ul>
11	684-01	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basaloides Adenom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basaloides Adenom</li> </ul>
19	2754-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenosquamöses Karzinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenosquamöses Karzinom vom einfachen Typ</li> </ul>
20	2754-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basaloides Adenom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basaloides Adenom</li> </ul>
21	2761-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenosquamöses Karzinom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adenosquamöses Karzinom vom komplexen Typ</li> </ul>
22	2735-04	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multifokales einfaches Adenom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multifokales komplexes Adenom</li> </ul>

## II. Vergleichende Diagnostik der multipel vorkommenden Neoplasien

Fall Nr.	E.-Nr.	Diagnostik in der HE-Färbung	Diagnose unter Berücksichtigung der immunhistochemischen Färbungen
02	2428-94	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multifokale reguläre epitheliale Hyperplasien</li>   <li>• Multifokale reguläre duktales Hyperplasien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multifokale reguläre epitheliale Hyperplasien; aufgrund der weitgehend fehlenden begrenzenden Myoepithelschichten kann eine mögliche Invasivität vermutet werden</li>   <li>• Multifokale reguläre duktales Hyperplasien; einige wenige der duktales hyperplasien weisen nur abschnittsweise eine myoepitheliale Schicht auf, was die Möglichkeit einer Entwicklung invasiver Eigenschaften hinweisen könnte</li> </ul>
12	1451-02	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multiple solide Adenokarzinome; die größeren Tumoren zeigen aufgrund von Diffusionsinsuffizienzen ausgedehnte zentrale Nekrosen (Komedokarzinome);</li>   <li>• Karzinoma in situ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multiple solide Adenokarzinome vom einfachen Typ</li>   <li>• Invasive solide Karzinome</li> </ul>
13	1902-02	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguläre duktales Hyperplasien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguläre duktales epitheliale Hyperplasien</li> </ul>
14	2951-02	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguläre epitheliale und vereinzelt duktales Hyperplasien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguläre epitheliale und vereinzelt duktales Hyperplasien</li> </ul>
15	177-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Karzinoma in situ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Karzinoma in situ</li> </ul>
16	533-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguläre epitheliale und vereinzelt duktales Hyperplasien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguläre epitheliale und vereinzelt reguläre duktales Hyperplasien</li> </ul>

Fortsetzung: II. Vergleichende Diagnostik der **multipl** vorkommenden Neoplasien

<b>Fall Nr.</b>	<b>E.-Nr.</b>	<b>Diagnostik in der HE-Färbung</b>	<b>Diagnose unter Berücksichtigung der immunhistochemischen Färbungen</b>
17	561-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguläre epitheliale und duktale Hyperplasien</li> <li>• Karzinoma in situ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguläre epitheliale und duktale Hyperplasien; die Möglichkeit einer Invasivität ist für die Veränderungen zu vermuten, die fehlende oder nur abschnittsweise ausgebildete Myoepithel-schichten zeigen</li> <li>• Karzinoma in situ</li> </ul>
18	1698-03	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguläre epitheliale und duktale Hyperplasien;</li> <li>• Karzinoma in situ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reguläre epitheliale und duktale Hyperplasien;</li> <li>• Karzinoma in situ</li> </ul>

Bei vergleichender Betrachtung der Diagnostik anhand der HE-Färbung und der unter Einbeziehung der immunhistochemischen Resultate ist Folgendes festzustellen:

1. Die untersuchten basaloiden Adenome (Fall 11 und 20) zeigen sich vom einfachen Typ.
2. Die in der HE-Färbung als einfaches Adenom diagnostizierte Neoplasie ist durch die Immunfärbungen als komplexer Tumor zu befunden.
3. Die in der HE-Färbung in 3 Fällen gestellte Diagnose des Karzinoma in situ wird durch die p63 Färbung in 2 der Fälle (15 und 17) verifiziert, und im Fall 12 wird anhand der Resultate dieser Färbung das Vorliegen invasiver Karzinome, die das in situ Stadium bereits hinter sich gelassen haben, gezeigt.
4. Das tubuläre Karzinom im Fall 07 sowie das papillär-zystische des Falles 09 sind vom einfachen Typ. Die in der HE-Färbung getroffene Diagnose des Vorliegens eines tubulären Karzinoms im Fall 04 wird durch die Immunfärbungen deutlich widerlegt. Die Neoplasie stellt ein hoch infiltrativ wachsendes Myoepithelkarzinom dar. Die in der HE-Färbung vereinzelt zu erkennenden drüsigen Strukturen stellen die Überreste der verdrängten Drüsenendstücke dar. Der Ausgang der entarteten basalen/myoepithelialen Zellen von der Basis der residualen luminalen Strukturen wird in den verschiedenen Färbungen deutlich.

5. Die Diagnose des soliden Karzinoms im Fall 12, das sich durch eine ausgeprägte primäre Multiplizität und Konfluationstendenzen der einzelnen Tumoren unter Ausbildung von Komedokarzinomen auszeichnete, wird durch den Einsatz der Immunhistochemie bestätigt.

6. Von den in der HE-Färbung als adenosquamöse Karzinome zu befundenen Neoplasien zeigten sich 2 der untersuchten Fälle dem komplexen (Fall 06 und 21), und die restlichen drei dem einfachen Typ zugehörig (Fall 01, 05, 20). Im Fall 01 ist eine assoziierte myoepitheliale Hyperplasie in den Immunfärbungen ersichtlich. Das squamöse Karzinom im Fall 10 zeigte sich in den Immunfärbungen ebenfalls vom einfachen Typ (Fall 10).

7. In 2 Fällen kann eine eindeutige Diagnose der Neoplasien anhand der Immunfärbungen nicht gestellt werden. Es handelt sich um die in der HE-Färbung diagnostizierten Basalzellkarzinome (Fall 03 und 08). Die Resultate der Immunfärbungen lassen die Diagnose eines Basalzellkarzinoms, aber auch eines Myoepithelkarzinoms zu. Im Fall 03 könnte aufgrund des histologischen Bildes erstgenannte Diagnose vermutet werden.

8. Die anhand der HE-gefärbten Schnitte gestellten Diagnosen der epithelialen und duktaalen Hyperplasien sind in 4 Fällen (13, 14, 16, 18) durch die p63-Färbung bestätigt worden. Jedoch konnten in 2 Fällen (02 und 17) fehlende und nur noch abschnittsweise ausgebildete myoepitheliale Schichten gezeigt werden. In der überwiegenden Anzahl sind an den duktaalen Hyperplasien die Myoepithelschichten in der p63-Färbung darstellbar, an einigen wenigen sowie am überwiegenden Anteil der epithelialen Hyperplasien, also intralobulären Veränderungen, fehlen sie. Die Möglichkeit der Invasivität der Veränderungen ist aufgrund dessen zu vermuten.

### **3.3.3.8. Bedeutung der Resultate für die WHO-Klassifizierung**

Allgemein betrachtet birgt die dargestellte mögliche basaloide, epithelzellähnliche Morphologie der basalen/myoepithelialen Zellen Probleme für die Diagnostik anhand HE-gefärbter Gewebeproben, da eigentliche basale/myoepitheliale Zellen fälschlicherweise als entartete Drüsenepithelien beurteilt werden könnten.

In der vorliegenden Studie konnte dies in einigen Fällen anhand der immunhistochemischen Resultate gezeigt werden:

1. Im Fall 04 wurde die Diagnose in der HE-Färbung widerlegt, da anstelle des vermuteten tubulären Karzinoms ein Myoepithelkarzinom vorliegt.
2. Im Fall 22 konnte die komplexe Natur des Adenoms gezeigt werden.
3. In den Fällen der adenosquamösen Karzinome wurde durch die Immunfärbungen in zweien der Fälle die Zugehörigkeit zum komplexen Typ enthüllt.
4. Im Fall 01 konnte durch die angewendeten Antikörper eine assoziierte Hyperplasie gezeigt werden.

Somit ist nahezu in fast einem Drittel der Fälle der mammären Neoplasien eine Mitbeteiligung des Myoepithels in Form einer Hyper- oder Neoplasie vorhanden, die in der HE-Färbung nicht zu vermuten war, jedoch für prognostische Aspekte Relevanz besitzt.

Aufgrund der ermittelten Erkenntnisse dieser Studie werden folgende Vorschläge zur Modifizierung der WHO-Klassifikation aufgeführt.

#### 1. Basaloide Adenome

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den basaloiden Adenomen befürworten die Führung dieser Tumoren als eine eigene Kategorie innerhalb der mammären Adenome. Sie unterscheiden sich von den einfachen Adenomen durch ihre spezielle histologische Gewebetextur, aber auch durch die in dieser Studie ermittelte Histogenese, die ausschließlich auf Drüsenepithelien zurückzuführen zu sein scheint. Die Definition der einfachen Adenome schließt benigne Neoplasien der myoepithelialen Zellen, die Myoepitheliome, mit ein.

#### 2. Komplexe Adenome

Die in dieser Studie ermittelte außergewöhnliche Morphologie des komplexen Adenoms weicht von der Beschreibung dieses Tumortyps in der WHO-Klassifikation in der Form ab, dass die myoepitheliale Komponente sich in basaloider, epitheloider Morphologie zeigt. Die Beobachtung des Vorkommens dieser Struktur sollte in der Klassifikation Erwähnung finden.

#### 3. Adenosquamöse Karzinome

Die Möglichkeit des Vorkommens dieser Tumoren als komplexe Neoplasien sollte in die Beschreibung dieses Tumortyps der Klassifizierung mit aufgenommen werden.

Ebenfalls ist das Vorkommen einer speziellen Variante dieses Tumortyps, welcher in seiner Morphologie an die Charakteristika der basaloiden Adenome erinnert, sich jedoch durch sein infiltratives Wachstum von diesen unterscheidet, erwähnenswert.

### 3.3.4. Ergebnisse der untersuchten zugehörigen Lymphknoten

In 2 der untersuchten Fälle (Fall 05/E.- 1979- 96; Fall Nr. 09/E.-913-97;) wurde der zugehörige, tributäre Lymphknoten mit entnommen und eingeschickt und stand so der Untersuchung zur Verfügung.

#### 3.3.4.1. Befundung der Lymphknoten in der HE- Färbung

Fall Nr.	E.-Nr.	Histologischer Befund in der HE-Färbung
05	1979-96	- Der innen liegende Lymphknoten zeigt Rindenhypertrophie und relativ geringe Markreaktion als Abwehrsteigerung (im Mammagewebe ist teilweise eine untergeordnete, unspezifische Begleitentzündung zu beobachten) - Metastasierung ist nicht nachweisbar
09	913-97	- Zwei Lymphknoten sind hyperplastisch und weisen Sinuszellproliferation mit Erythrophagozytose und Hämosiderose auf - Metastasenbildung ist nicht nachweisbar

#### 3.3.4.2. Immunhistologische Befunde der Lymphknoten

Das Lymphknotengewebe wurde analog der mammären Veränderungen mit den Markern LP 34, AE 1, CK 14, HHF 35 und p63 immunhistologisch untersucht.

In keinem der vorliegenden Lymphknoten wurden durch die 5 verschiedenen angewandten Färbungen neoplastische Zellen detektiert.

Somit ist in keinem der beiden Fälle eine Metastasierung neoplastischer Zellen in die tributären Lymphknoten nachzuweisen.

#### 3.3.4.3. Vergleich der Befundung in der HE- und der immunhistologischen Färbung

In beiden untersuchten Gewebeproben konnte die in der HE-Färbung gestellte Diagnose einer Metastasenfreiheit der zugehörigen Lymphknoten durch die immunhistologischen Färbungen bestätigt werden.

### Abschnitt III

#### 3.3.5. Ergebnisse der Untersuchungen an den nach WEISS und FRESE (1974) als Basalzelltumoren befundeten Neoplasien

##### 3.3.5.1. Befundung in der HE-Färbung

Die ehemals nach SANDERSLEBEN (1967), SCHÄFER (1967), SEDLMEIER et al. (1967), WEISS und FRESE (1974), WEISS et al. (1977), SANDERSLEBEN (1989), PULLEY und STANNARD (1990), DAHME und WEISS (1999) als Basalzelltumoren klassifizierten Neoplasien werden anhand ihres histomorphologischen Erscheinungsbildes in der HE-Färbung nach der von GOLDSCHMIDT et al. (1998) novellierten WHO-Klassifizierung epithelialer und melanotischer Tumoren der Haut beurteilt und wie in folgender Tabelle dargestellt diagnostiziert.

<b>Fall Nr.</b>	<b>E.-Nr.</b>	<b>Befund anhand des histomorphologischen Erscheinungsbildes in der HE-Färbung</b>
01	438-95	Basalzellkarzinom vom infiltrativem Typ (bandartige und medusoide Wuchsform; eine Verbindung zur Epidermis ist nicht feststellbar)
02	1294-95	Basalzellkarzinom vom infiltrativem Typ (Tumorinseln, aber auch Stränge und Bänder werden formiert)
03	1698-95	Trichoblastom der medusoiden Wuchsform (infiltratives Wachstum ist zu beobachten)
04	1785-95	Basosquamöses Karzinom
05	2015- 95	Basalzellkarzinom vom infiltrativem Typ (Tumorinseln, aber auch Stränge und Bänder werden formiert)
06	2404- 95	Trichoblastom der medusoiden Wuchsform (bandartige Formation sind in einigen Arealen ebenfalls ausgebildet; infiltratives Wachstum ist zu beobachten)
07	2600- 95	Basosquamöses Karzinom
08	3017- 95	Trichoblastom der medusoiden Wuchsform
09	2336- 96	Trichoblastom vom Granularzelltyp
10	2514- 96	Trichoblastom der medusoiden Wuchsform



In der Diagnostik an HE-gefärbten Präparaten sind die ehemals als Basalzelltumoren befundenen Neoplasien anhand der novellierten Klassifikation verschiedenen Tumortypen zuzuordnen. Als Basalzellkarzinome vom infiltrativem Typ zeigen sich 3 der untersuchten Fälle, während 2 als basosquamöse Karzinome und 5 Fälle den Trichoblastomen zuzuordnen sind. Bei den Trichoblastomen sind zwei verschiedene Subtypen zu beobachten: In einem Fall ist der Granularzelltyp, in den restlichen 4 Fällen der medusoide Subtyp vertreten. Zwei der medusoiden Trichoblastome zeigen infiltratives Wachstum, sind aber, aufgrund der fehlenden Kategorie für infiltrative Tumoren mit medusoider Gewebetextur, als Trichoblastome zu diagnostizieren.

### **3.3.5.2. Immunhistochemische Befunde der p63-Färbung**

Die Einzelfallauswertung der durch den Antikörper dargestellten Zellen, die Verteilungsmuster sowie die Intensitäten der Anfärbung ist den im Anhang unter Punkt 8.6. aufgeführten Tabellen zu entnehmen.

Der Antikörper p63 zeigt eine sehr gute Reaktivität mit den Zellkernen der neoplastischen Zellen der untersuchten Trichoblastome, Basalzellkarzinome und basosquamösen Karzinome. (s. Abb. 27).

In allen 10 Fällen färbte er zuverlässig alle den Tumor bildenden neoplastischen Zellen an. Die Intensität der Anfärbung zeigt ebenfalls gute Ergebnisse. 6 Fälle zeigen im Gesamtbild eine Anfärbung starker Intensität. In einem Fall wechseln sich große Bereiche starker Anfärbung mit kleinen Arealen moderater Intensität ab. Ein weiterer Fall zeigt große Bereiche mit moderater und kleine Areale stärkerer Intensität. Zwei der untersuchten Fälle zeigen eine moderate Anfärbung.

### **3.3.5.3. Bedeutung der Immunhistochemischen Befunde**

Diese immunhistochemischen Resultate stellen den Nachweis einer p63-Expression in neoplastisch veränderten Basalzellen dar. Die entarteten Vorläuferzellen können durch den Einsatz dieses Markers mit großer Sicherheit immunhistochemisch dargestellt werden. Somit zeigt sich der verwendete Antikörper für den Einsatz an unverändertem, aber auch neoplastisch entartetem caninen Gewebe als geeignet.

Eine definitive ausschließliche Zuordnung des Ursprungs dieser Neoplasien zu den Strukturen der Haarfollikel oder des Stratum basale der Epidermis kann aufgrund der Spezifität des Markers nicht erfolgen. Wie dem Punkt 3.3.2.3.1. entnehmbar, zeigen die Basalzellen der Epidermis sowie die Zellen der äußeren epithelialen Wurzelscheide des Haares eine positive Immunreaktivität. Somit ist ein Ursprung der ehemals als Basalzelltumoren bezeichneten Neoplasien, basierend auf den vorliegenden immunhistochemischen Ergebnissen, von den Zellen des Stratum basale der Epidermis, als auch von den Zellen der äußeren epithelialen

Wurzelscheide des Haares möglich, wobei letztgenannte Struktur nach LIEBICH (1993) die Fortsetzung des Stratum germinativum der Epidermis darstellt.

### **3.3.6. Ergebnisse der Anfärbungen der caninen Haut mittels des Antikörpers AE1**

Die einzelnen Ergebnisse der Auswertung der Anfärbbarkeit caniner Haut mit ihren Hautorganen mit dem Antikörper AE1 sind in tabellarischer Form dem Punkt 8.7. des Anhangs entnehmbar.

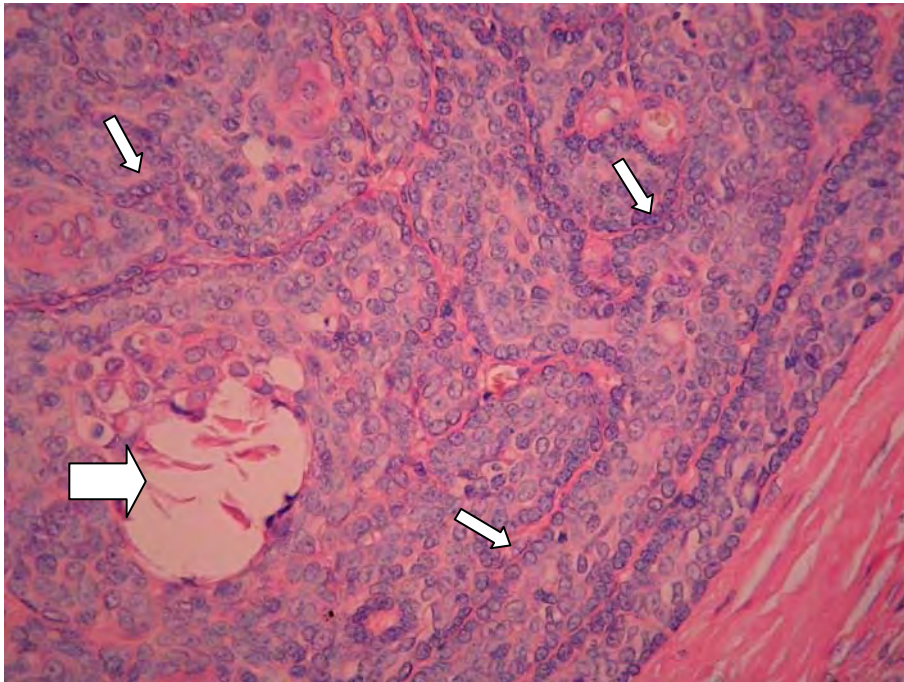
In allen der 12 untersuchten Gewebeproben konnte das Stratum basale der Epidermis mit dem Antikörper AE1 dargestellt werden. Es erfolgte eine homogene Anfärbung der Basalzellen. In 6 Gewebeproben zeigte sich eine starke bis moderate Intensität der Anfärbung, während 4 Fälle wechselnde Bereiche moderater und schwacher Intensität und nur 2 Fälle eine schwache Intensität der Färbung aufwiesen.

Die suprabasalen Zellen konnten kontinuierlich in 9 Fällen dargestellt werden. In einem Fall (F16) zeigen sich fokal einzelne suprabasale Zellen positiv.

Das sekretorische Epithel der Schweißdrüsen konnte in 10 der untersuchten Gewebeproben hinsichtlich seiner Reaktion mit dem Antikörper AE1 beurteilt werden: In 9 der untersuchten Fälle zeigte sich eine deutlich starke Anfärbung und in einem weiteren Fall eine moderate Intensität der Färbung.

Immunhistochemische Befunde der Haarfollikel mit dem Antikörper AE1 konnten in 10 der untersuchten Gewebeproben erhoben werden. Die äußere epitheliale Wurzelscheide stellt sich in 9 der untersuchten Fälle, ähnlich dem sekretorischen Epithel der Schweißdrüsen, außerordentlich deutlich mit starker Intensität angefärbt dar. In einem Fall ist eine moderate Anfärbung zu verzeichnen.

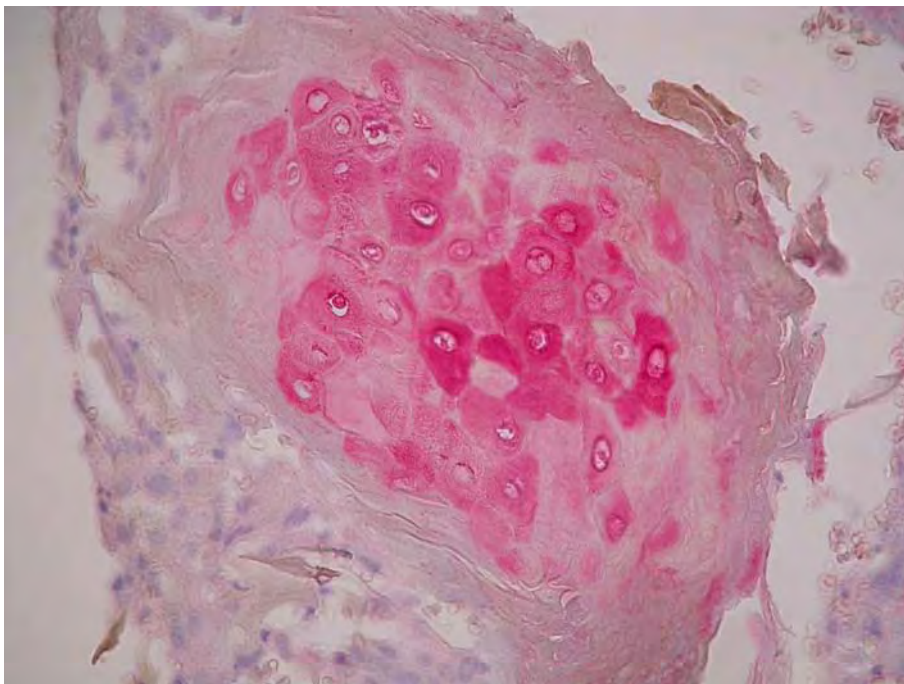
### 3.7.7. BILDTEIL



**Abb. 1:** - Fall 01 -

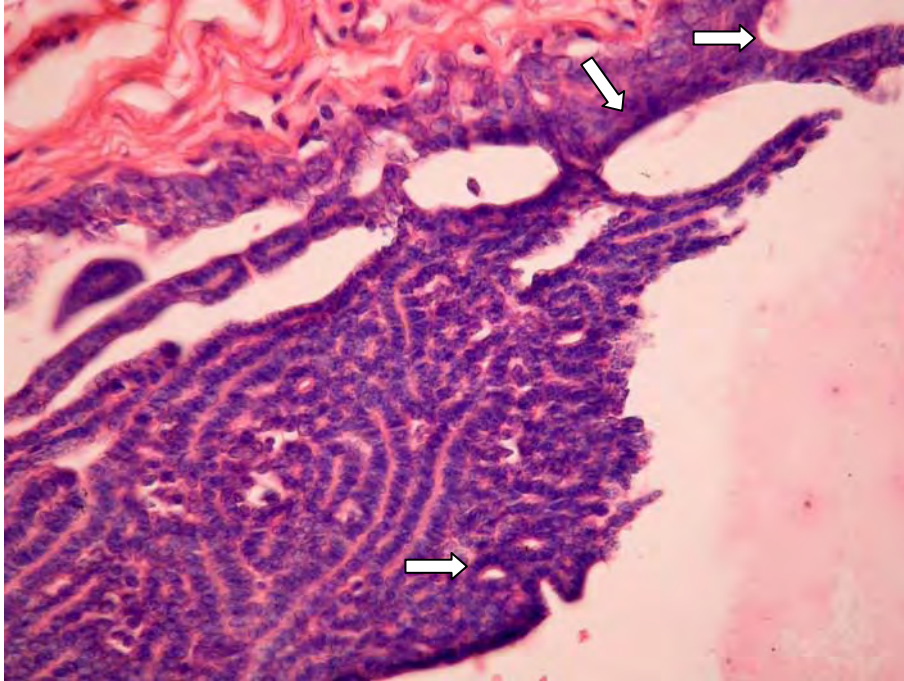
(HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung)

Es ist die palisadenartige Anordnung der peripheren basaloiden Zellen (kleine Pfeile), Reste eines keratotischen Herdes (großer Pfeil) und solide Formationen der luminalen Zellen zu beobachten. Da diese Neoplasie in anderen Arealen deutliche Kriterien der Malignität erfüllt, wird sie in ihrer Gesamtheit als Adenosquames Karzinom befundet.

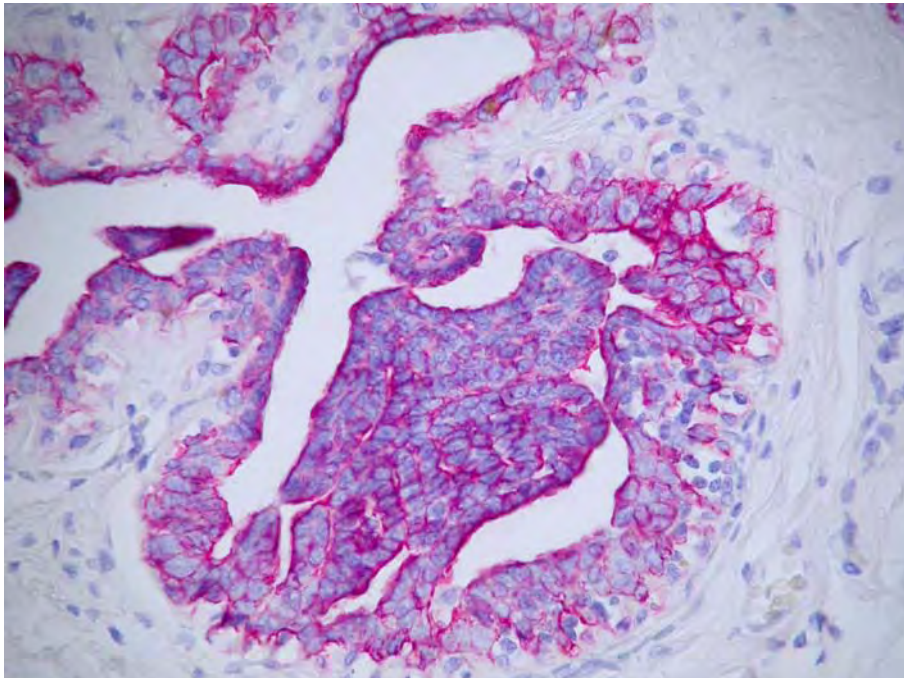


**Abb.2 :** - Fall 01 - (CK14-Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)

Im keratotischen Herd ist die positive Immunreaktivität der keratinisierten Zellen mit dem Antikörper CK14 zu sehen.

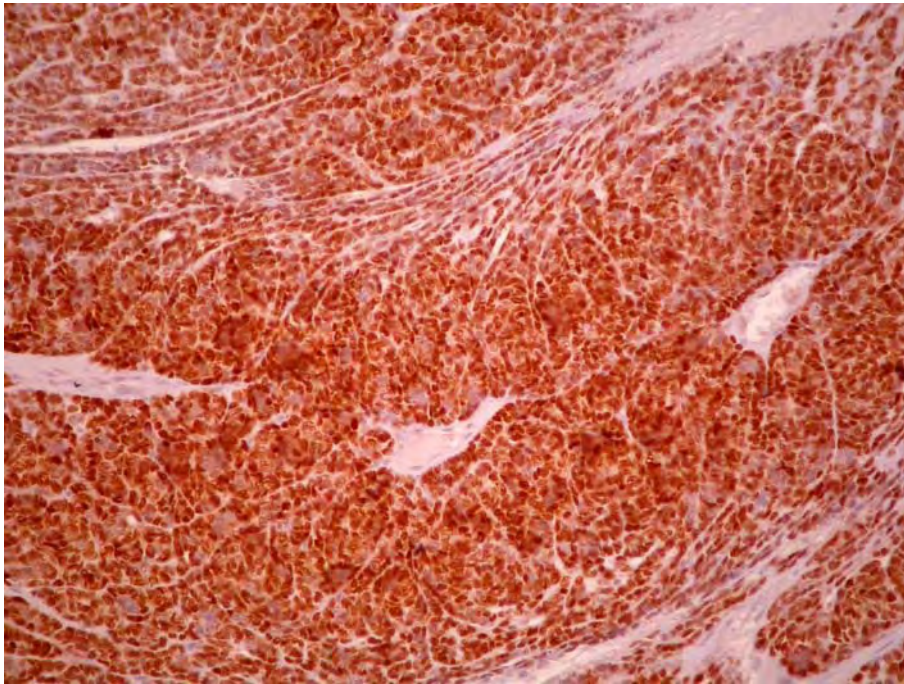


**Abb. 3:** - Fall 02 -  
 (HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung)  
 Duktale Hyperplasie. Palisadenartig aufgereihete basaloide Zellen formieren Bänder;  
 Spaltbildung im hyperplastischen Gewebe ist zu beobachten (weiße Pfeile).



**Abb. 4:** - Fall 02-  
 (LP34 Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)  
 Duktale Hyperplasie. Alle hyperplastischen Zellen der duktaalen Proliferation  
 zeigen eine positive Immunreaktivität mit dem Antikörper LP34

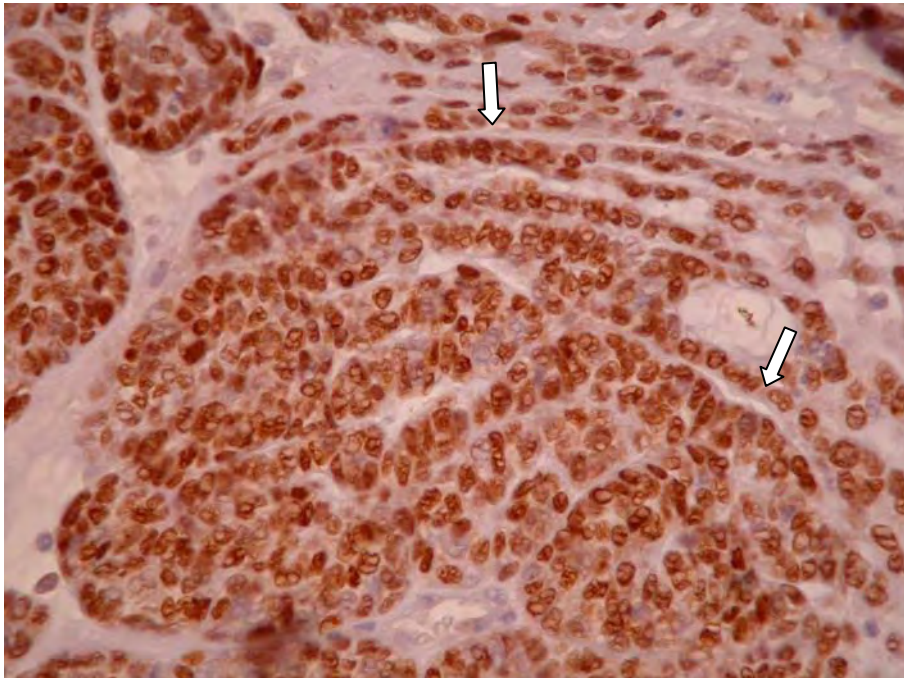




**Abb.5:** - Fall 03-

(p63-Färbung, BSA-Methode, 200-fache Vergrößerung)

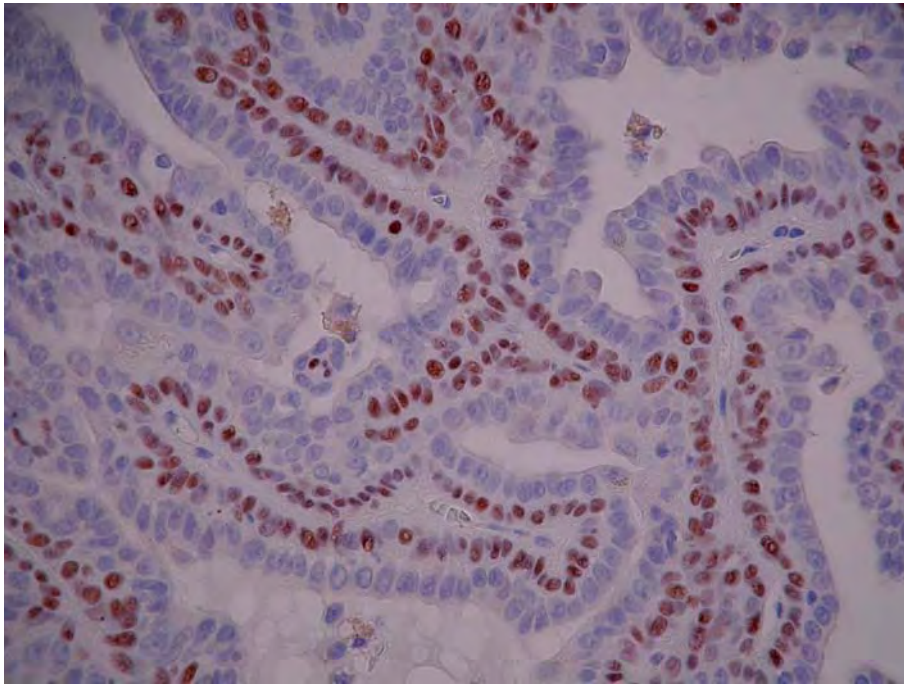
In allen neoplastischen Zellen ist eine p63-Expression nachzuweisen. Dieser Befund lässt die Diagnose eines Myoepithelkarzinoms oder eines ins Mammaparenchym gewachsenen Basalzellkarzinoms zu.



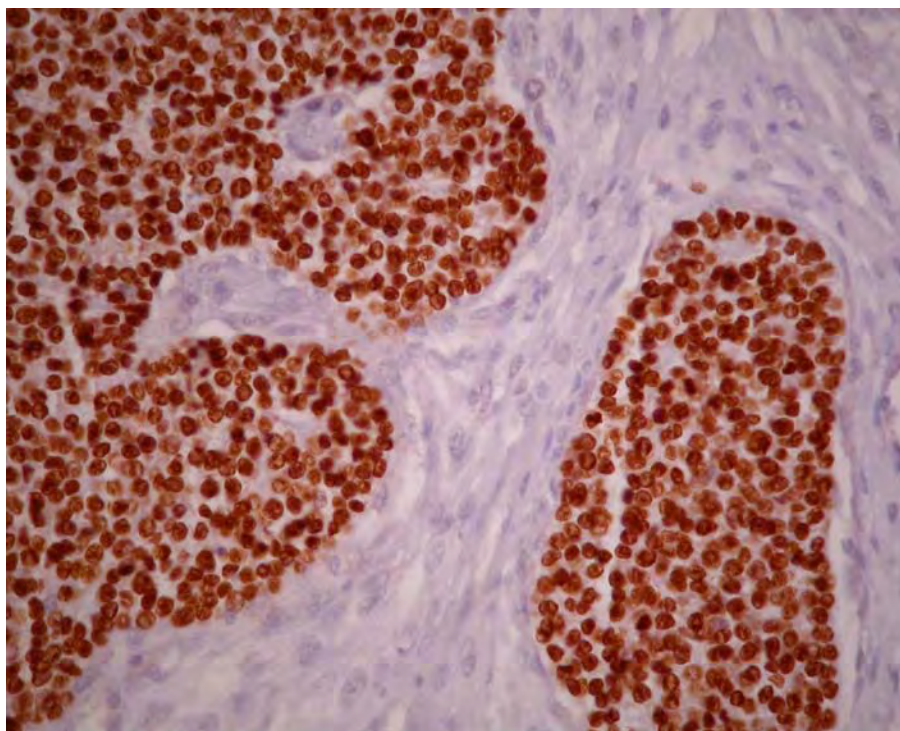
**Abb. 6:** - Fall 03 –

(p63-Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)

Ausschnitt aus Abbildung 5: Die neoplastischen basaloiden Zellen formieren Bänder durch ihre palisadenartige Anordnung (weiße Pfeile).

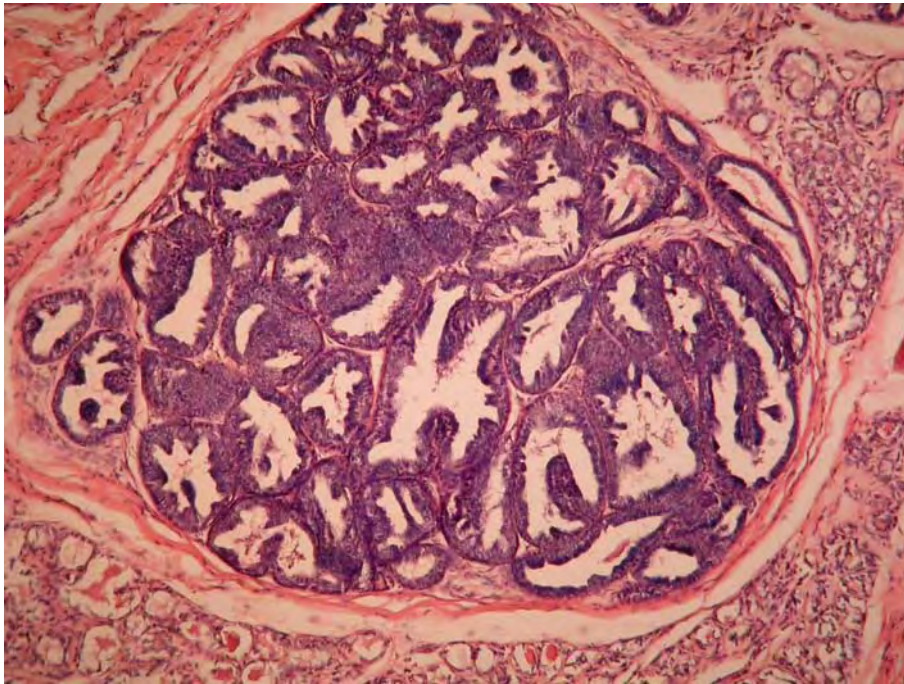


**Abb. 7 :** - Fall 07- (p63-Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)  
Eine p63-Expression ist in den basalen/myoepithelialen Zellen nachzuweisen. Dieses Areal des Tumors zeigt die palisadenartige Anordnung von Myo-/und Drüsenepithelzellen, die in der HE-Färbung als bandartige Strukturen auffallen.

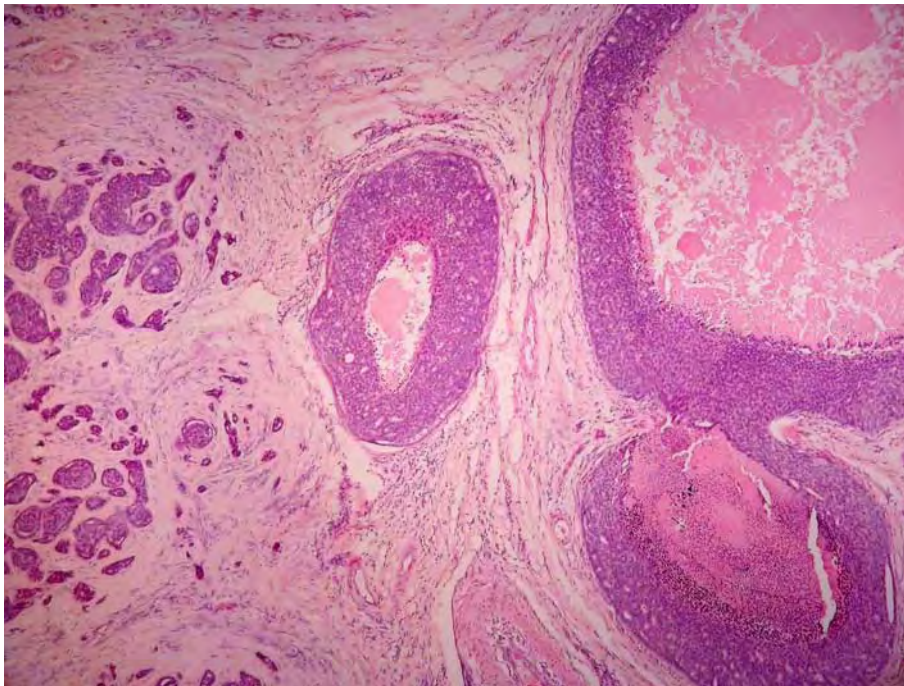


**Abb. 7:** - Fall 08 -  
(p63-Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)  
Eine desmoplastische Antwort des Stromas auf den invasiven Tumor ist erkennbar.  
Alle basaloiden Tumorzellen zeigen eine positive Immunreaktion mit dem Antikörper p63.  
Auch hier kommt differentialdiagnostisch ein Myoepithelkarzinom oder Basalzellkarzinom in Betracht.

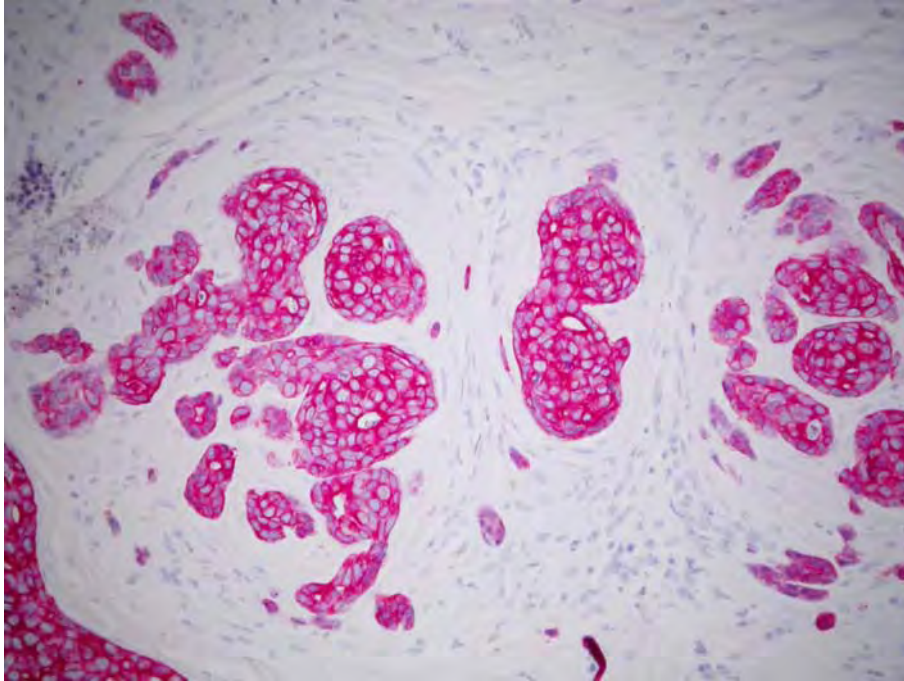




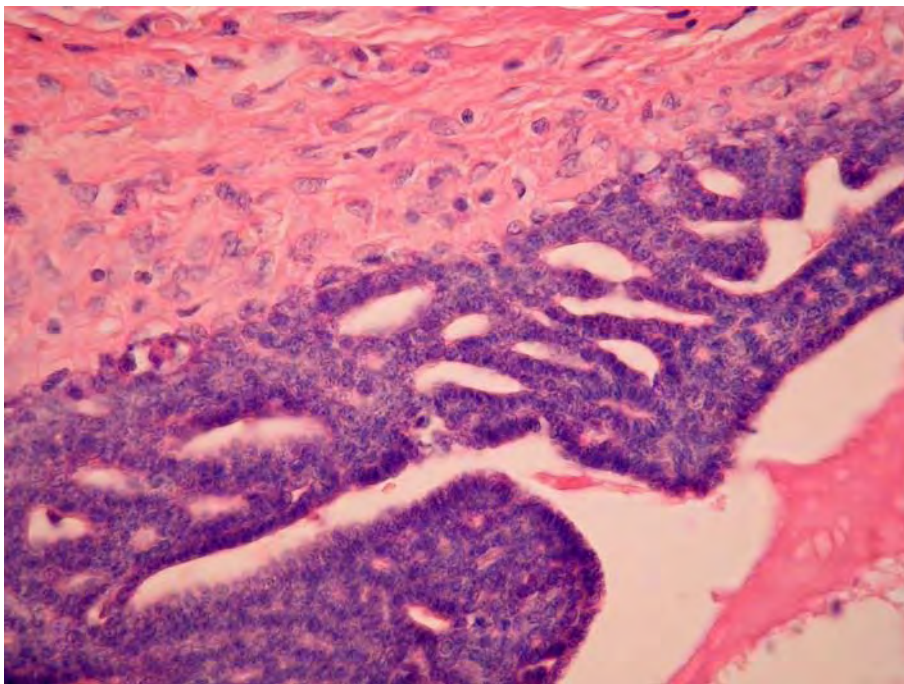
**Abb. 9:** - Fall 09 - (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)  
Papillär-zystisches Karzinom.



**Abb. 10:** - Fall 12 - (HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung)  
Ausgeprägte primäre Multiplizität in Form von multifokal ausgebildeten Tumoren  
variierender Größe, wobei die größeren Tumoren zentrale Nekrosen aufgrund von  
Diffusionsinsuffizienzen aufweisen (Komedokarzinome); die multifokalen frühen Formen der  
Tumorentwicklung scheinen invasiv und ebenfalls konfluierend.  
Eine reaktive Bindegewebshyperplasie ist erkennbar.

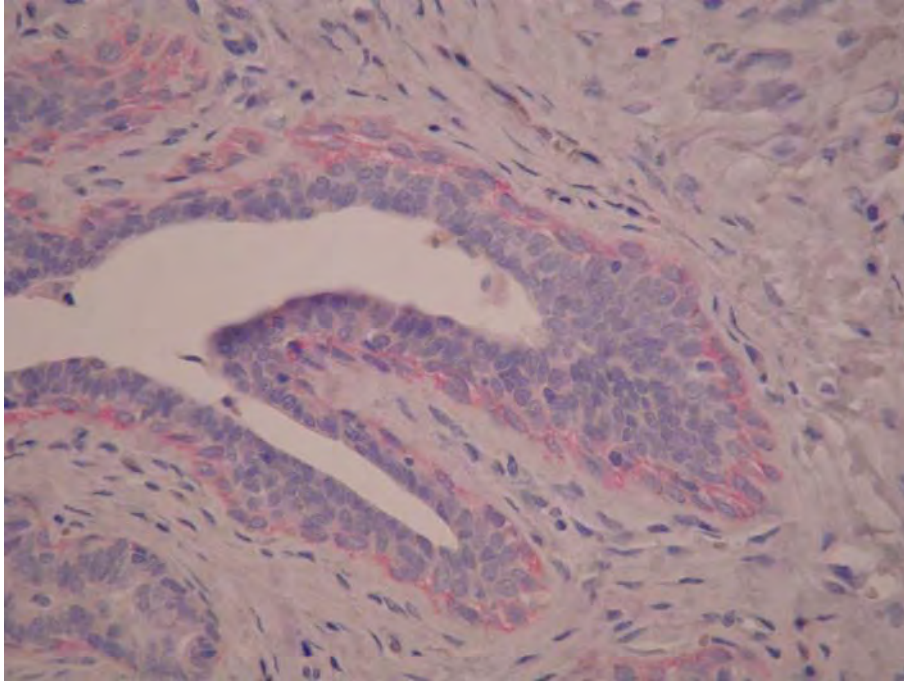


**Abb11:-** Fall 12- ( AE1-Färbung, BSA-Methode, 200-fache Vergrößerung)  
Die positive Immunreaktivität der basaloiden neoplastischen Zellen zeigt sich in der deutlich roten Anfärbung des Zytoplasmas.

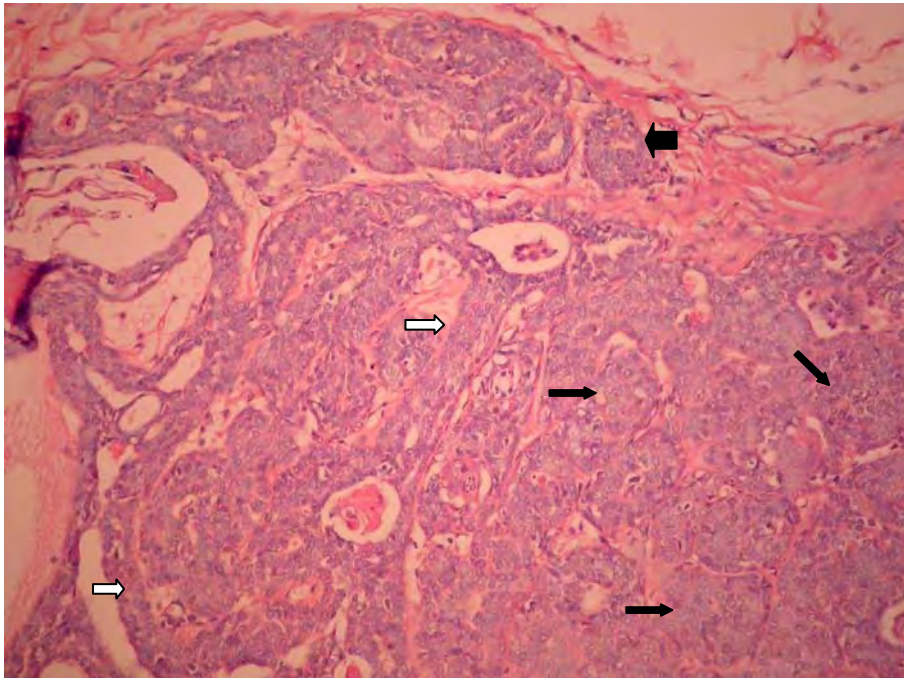


**Abb. 12:** - Fall 13 –  
(HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung)  
Das Bild zeigt einen Ausschnitt einer duktaalen Hyperplasie mit den typischen bandartigen Formationen, die durch palisadenartige Anordnung der basaloiden Zellen entstehen. Spaltbildungen, die den Eindruck falscher Lumina vermitteln, sind ebenfalls zu beobachten.

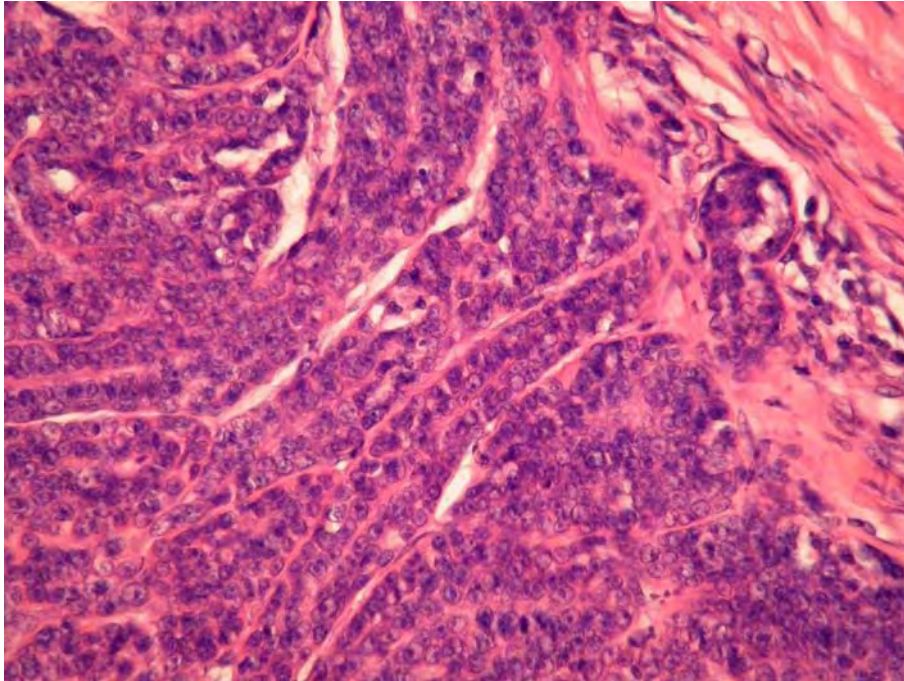




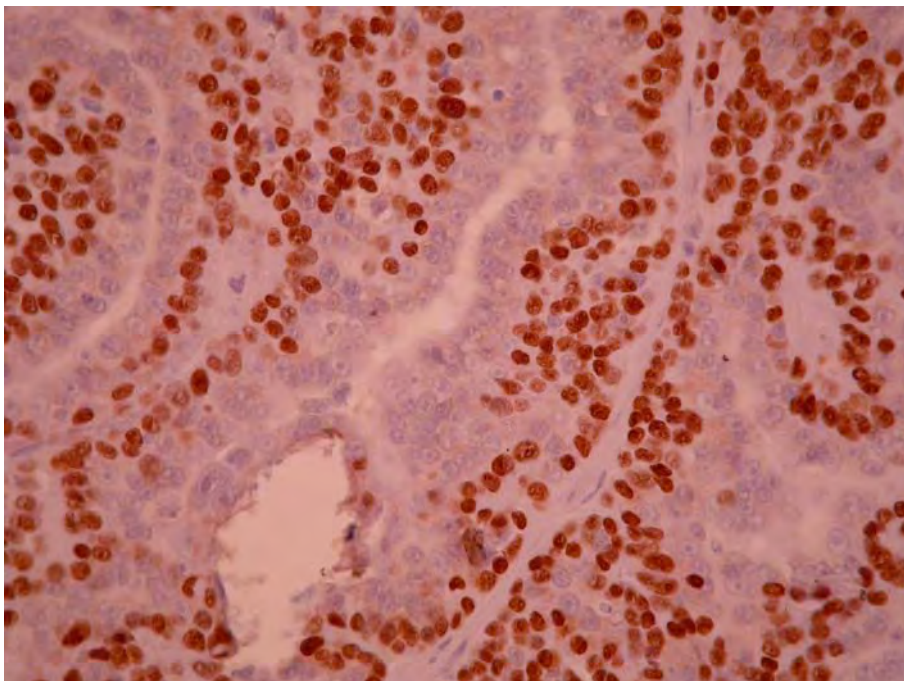
**Abb.13:** - Fall 16 -  
 (CK14-Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)  
 Durch die Reaktion der basalen/myoepithelialen Zellen mit dem AK CK14 erfolgt eine zarte Anfärbung des Zytoplasmas dieser Zellen.



**Abb. 14:** - Fall 19 – (HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung)  
 Adenosquamöses Karzinom: Solide Strukturen (dünne schwarze Pfeile), infiltratives Wachstum in die Kapsel (schwarzer dicker Pfeil) und in einzelnen Bereichen ist noch die palisadenartige Anordnung der basaloiden Zellen zu sehen (weiße Pfeile). Multifokal sind keratotische Herde und sehr vereinzelt sind Lumendifferenzierungen zu sehen.

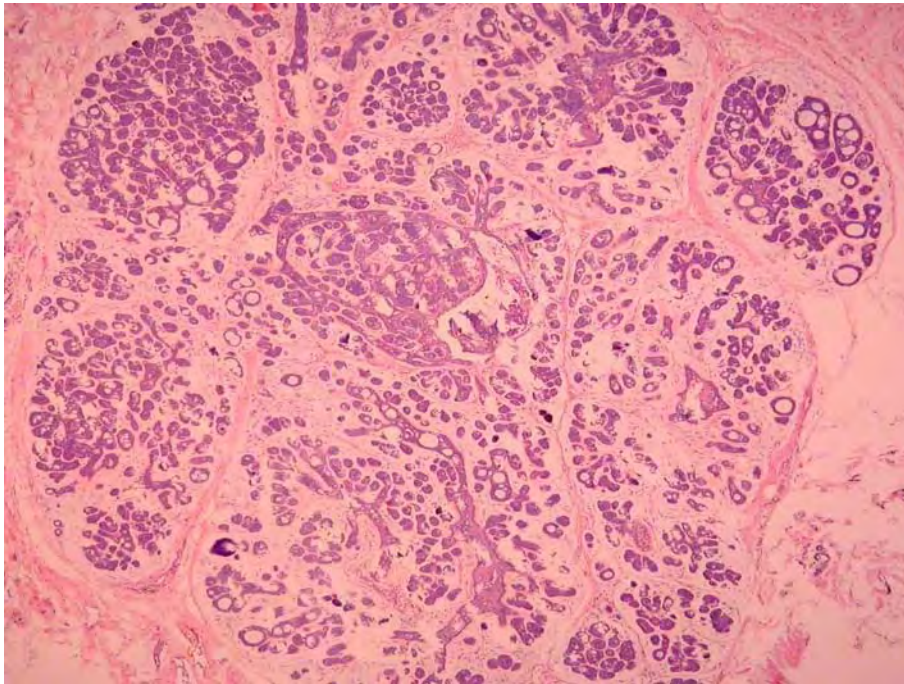


**Abb. 15:** - Fall 21-  
 (HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung)  
 Das Bild zeigt die auffälligen bandartigen Formationen, aber auch die Ausbildung solider Strukturen und ein infiltratives Wachstum.

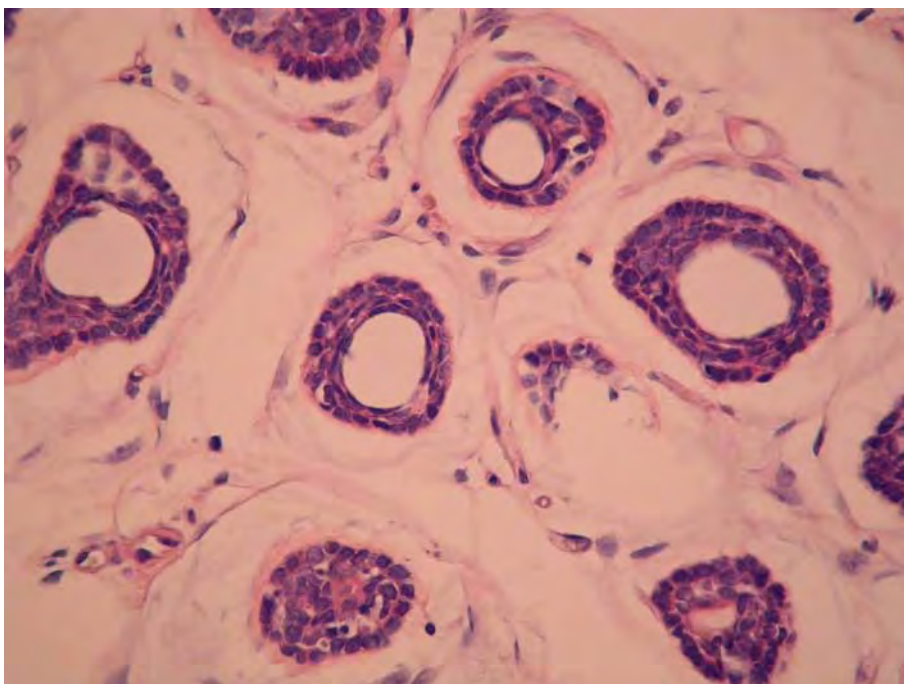


**Abb. 16:** - Fall 21 -  
 (p63-Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)  
 Die p63-Färbung zeigt den in der HE-Färbung nicht zu vermutenden basaloiden Phänotyp des entarteten Myoepithels.

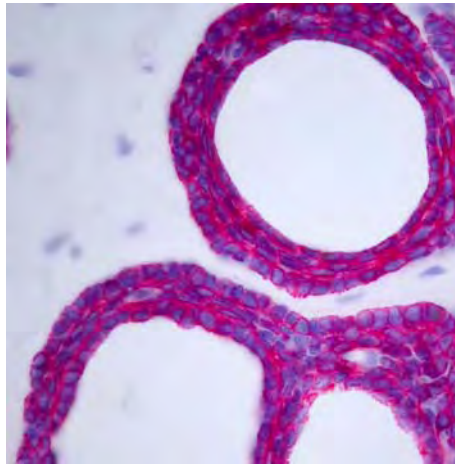




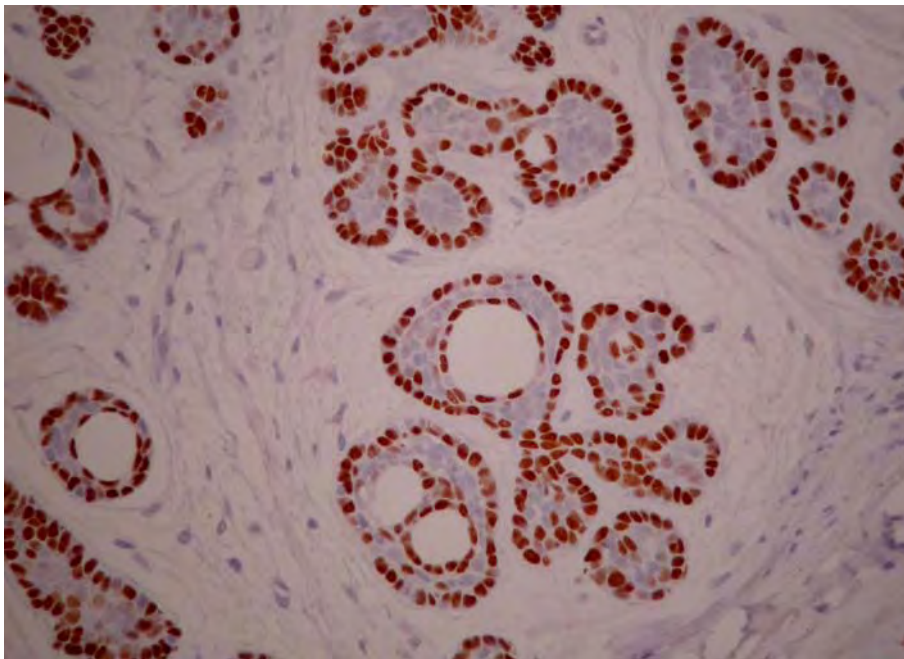
**Abb. 17:** - Fall 22 -  
(HE-Färbung, 25-fache Vergrößerung)  
Gesamtbild des multifokalen Adenoms.



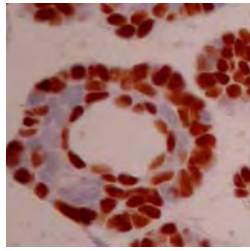
**Abb. 18:** - Fall 22- (HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung)  
Lumendifferenzierungen und palisadenartige Anordnungen der  
peripheren Zellen sind zu beobachten.



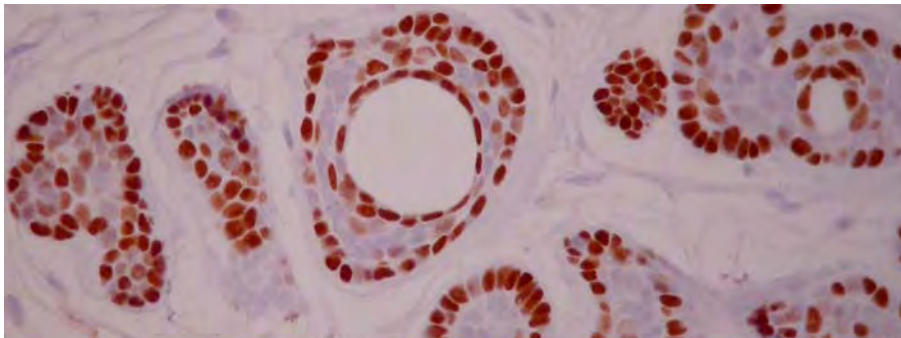
**Abb.19:** - Fall 22 -  
(AE1-Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)  
Das Bild zeigt die positive Reaktivität der basalen, suprabasalen und luminalen basaloiden Zellen mit dem Antikörper AE1.



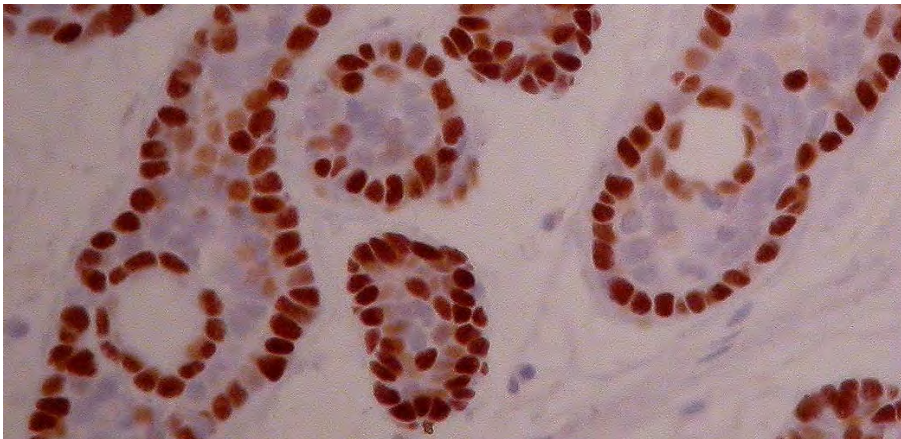
**Abb. 20:** - Fall 22 -  
(p63-Färbung, BSA-Methode, 200-fache Vergrößerung)  
Die Immunfärbung repräsentiert den überraschenden Nachweis einer p63-Expression in den basalen und in den luminalen Zellen.



**Abb. 21:** - Fall 22 - (p63-Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)



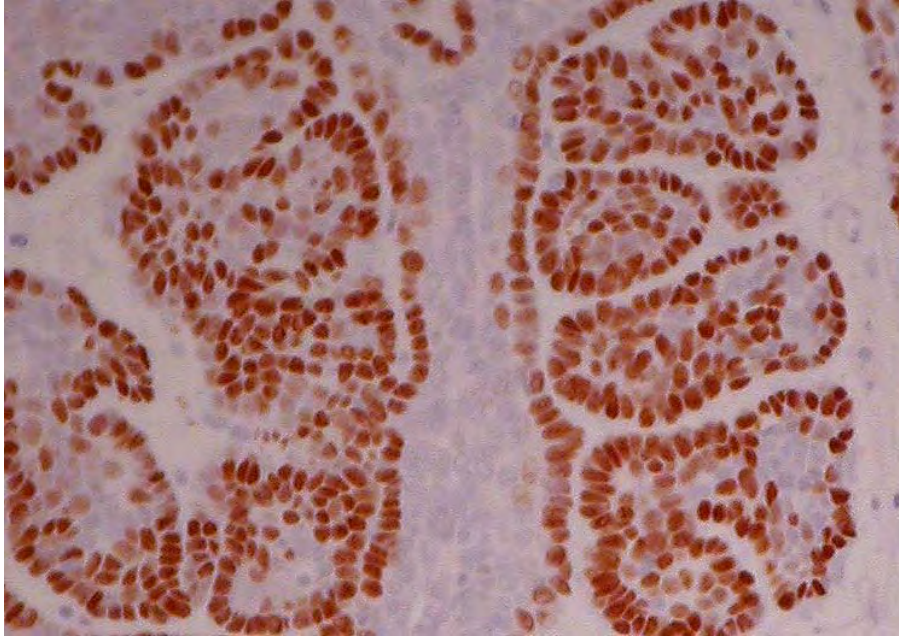
**Abb. 22:** - Fall 22 - (p63-Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)



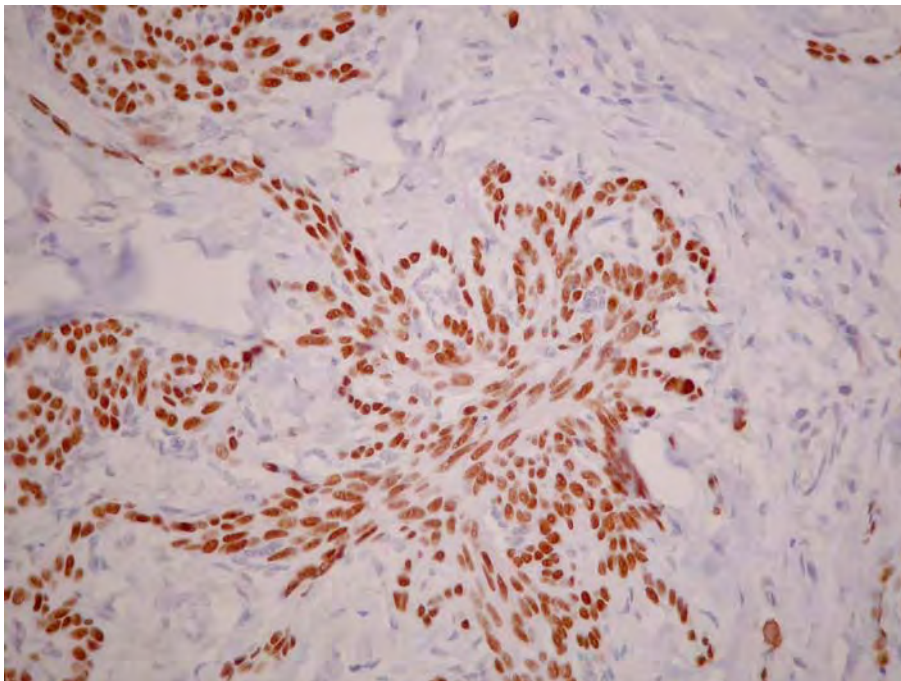
**Abb.23:** - Fall 22 - (p63-Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)

**Abb. 21; Abb. 22; Abb.23:** Neben basalen und lumenauskleidenden Zellen zeigen lokalisiert ebenfalls suprabasale Zellen eine positive Immunreaktivität, so dass der Eindruck von „Zellbrücken“ zwischen der basalen und luminalen Zellschicht entsteht. In Abb. 25 ist eine direkte Verbindung zwischen basalen und Lumina formierenden Zellen zu beobachten.

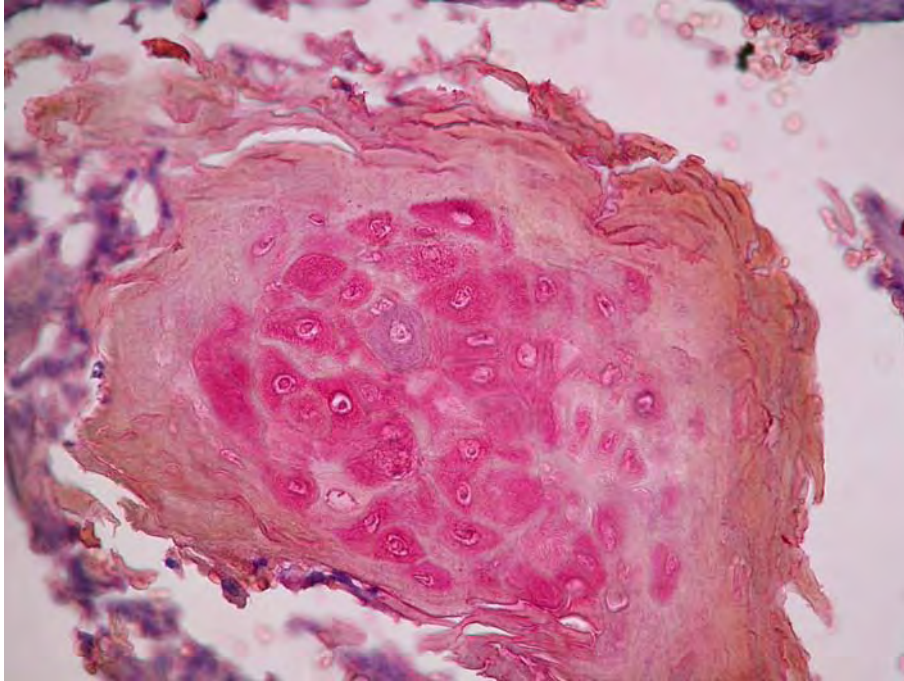




**Abb.24:** - Fall 22 -  
(p63-Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)  
Dieser Ausschnitt zeigt das Areal des Tumors, in dem durch den Nachweis der p63-Expression der neoplastischen Zellen solide erscheinende Strukturen zu beobachten sind.



**Abb.25:** E-Nr. 2514-96  
(p63-Färbung, BSA-Methode, ca. 200-fache Vergrößerung)  
Trichoblastom vom medusoiden Subtyp.



**Abb. 26:** - Fall 01- (HHF35-Färbung, BSA-Methode, 400-fache Vergrößerung)  
Die im Keratinisierungsprozess begriffenen Zellen zeigen erstaunlicherweise eine positive Immunreaktivität mit dem Antikörper HHF35.