

## 4. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Untersuchungen zu folgenden Thematiken durchgeführt:

1. Zur Etablierung des nukleären Antikörpers Anti-Human p63-Protein in der Veterinärmedizin erfolgten immunhistochemische Färbungen an caninem Haut- und Mammagewebe.
2. Basaloide, epitheloide Proliferationen und Neoplasien im Mammaparenchym der Hündin wurden in ihrer Morphologie in der HE- und PAS-Färbung und mittels immunhistochemischer Untersuchungen im Hinblick auf ihre Histogenese untersucht.
3. Untersuchungen zur im Rahmen der Novellierung der WHO-Klassifikation nach GOLDSCHMIDT et al. (1998) erfolgten Reklassifizierung der ursprünglich nach WEISS und FRESE (1974) als Basalzelltumoren und nun als Trichoblastome definierten Neoplasien hinsichtlich der immunhistochemischen Basis dieser Neueinteilung.

Verwendet wurden Archivmaterial und Fälle aus der laufenden Routinediagnostik sowie Gewebeproben von Sektionstieren des Institutes für Veterinär-Pathologie der FU-Berlin der Jahre 1994-2004 und Gewebe der Prostata des Menschen, zur Verfügung gestellt von der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

### 4.1. Antigendarstellung

In den immunhistochemischen Untersuchungen kam zur Antigendarstellung das neuere Biotin-Streptavidin Amplifikations (B-SA)-Nachweissystem zur Anwendung. Dieses zeichnet sich durch eine außerordentlich hohe Sensitivität, Fehlen unspezifischer Hintergrundfärbung und, im Vergleich zu anderen Methoden, relativ kurzen Inkubationszeiten aus (BOENISCH 1997; BOURNE 1997).

Die Färbungen mittels der Antikörper LP34, AE1, CK14 und HHF35 wurden in den Inkubationskammern des Immunfärbecenters Sequenza durchgeführt. Die einfache Handhabung bewährte sich, und durch die gleichmäßige Verteilung der aufpipettierten Reagenzien im kapillären Spalt wurden gute Färbeergebnisse erzielt.

Die immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper p63 wurden in der feuchten Kammer gefärbt. Ausschlaggebend für diese Entscheidung ist der um ein vielfaches höhere Preis des p63 Antikörpers. Bei Immunfärbungen in der feuchten Kammer wird das Reagenz direkt auf die zu untersuchende Gewebeprobe pipettiert, eine Variation in der aufpipettierten Menge ist somit je nach Gewebeprobengröße variierbar. Zudem ist für die Verwendung des Antikörpers p63 an formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeproben ein Antigende-

maskierungsverfahren mittels Hitzebehandlung im Mikrowellengerät erforderlich. Probleme dieser Vorbehandlung bestehen oftmals in einer, nach erfolgter Prozedur im Mikrowellengerät, schlechteren Haftung des Gewebes an die schon für die Immunfärbung speziell beschichteten Objektträger. Mittels der feuchten Kammern können diese Gewebeproben durch ihre waagerechte Lage und die schonendere Behandlung optimaler gehandhabt werden.

## **4.2. Das Anti-Human p63 Protein und seine Immunreaktivität in caninem Gewebe**

### **4.2.1. Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben des caninen pathologisch nicht veränderten Mammaparenchyms**

In allen untersuchten Gewebeproben des caninen pathologisch unveränderten Mammaparenchyms ist eine homogene, regelmäßige Anfärbung der Nuklei der basalen/myoepithelialen Zellen von starker Intensität zu beobachten. Dem alveolären und duktalem Epithel direkt anliegend, werden die flachen Zellkerne dieser Zellen sehr gut dargestellt. Dies stimmt mit den humanmedizinischen Untersuchungen überein (BARBARESCHI et al. 2001) und deckt sich mit dem Ergebnis der Studie von GAMA et al. (2003), die zwei Proben von ebenfalls pathologisch nicht verändertem caninen Mammagewebe untersuchten.

### **4.2.2. Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben der caninen Haut**

Bei den Untersuchungen an caniner Haut konnte eine p63-Expression in der germinativen Schicht, im Stratum basale, wie sie von GAMA et al. (2002) beim Hund und von PELEGRINI (2001) beim Menschen beschrieben wird, sowie in der äußeren epithelialen Wurzelscheide dargestellt werden. Bei Mammatumorexizidaten, welche auch Teile der Haut beinhalten, ist somit eine zusätzliche interne Positivkontrolle für die immunhistochemischen Färbungen gegeben.

### **4.2.3. Abschließende Bewertung und Ausblick**

Die Ergebnisse der Studie betrachtend, ist festzustellen, dass der monoclonale Mouse-Antikörper Anti-Human p63 Protein eine ausgesprochen gute antigene Reaktivität in caninem Gewebe aufweist und die p63-Expression in den Geweben, den Untersuchungen der Humanmediziner gleichend (BARBARESCHI et al. 2001; REIS-FILHO und SCHMITT 2002), mit hoher Sensitivität und Spezifität darstellt.

Myoepitheliale Marker mit Angriffspunkt am kontraktilen Apparat stellen ebenfalls Myofibroblasten dar, was besonders bei der Lokalisation der Myofibroblasten direkt an Gängen oder Alveolen Schwierigkeiten für die Diagnosestellung hervorruft. Besonders in der humanmedizinischen Pathologie der Mammatumoren, aber auch in der Veterinärmedizin ist die Identifizierung einer intakten myoepithelialen Schicht zur Differenzierung invasiver und

nicht invasiver Karzinome von entscheidender Relevanz für Therapie und Prognose. Der Antikörper p63 färbt ausschließlich die Basal- und Myoepithelzellen, die Myofibroblasten des stromalen Gewebes jedoch nicht. Dies verleiht ihm seine hohe Spezifität. Seine hohe Sensitivität zeigt sich in der zuverlässigen, regelmäßigen, homogenen Anfärbung aller Zellen, die das p63-Protein im Kern aufweisen. Bei Betrachtung der Intensitäten der Anfärbung der durch den Antikörper p63 markierten Zellkerne zeigen sich durchweg gute Ergebnisse. Die Anfärbungsintensität der caninen Basalzellen der Haut liegen im moderaten bis starken Bereich, ebenso die der Myoepithelien im pathologisch unveränderten Mammagewebe. Die Färbereaktionen an caninem Mammaparenchym decken sich mit den Untersuchungen von GAMA et al. (2003), die 2 Proben physiologischen Mammaparenchyms, aber auch benigne und maligne Neoplasien sowie Hyperplasien der caninen Mamma mittels des gleichen Antikörpers untersuchten und ihn ebenfalls als einen äußerst sensitiven und spezifischen Marker ansahen.

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wird ein weiterer Vorteil dieses Markers im Vergleich zu den herkömmlichen myoepithelialen Antikörpern sichtbar: Sein nukleäres Färbemuster bedingt eine optisch einfachere Auswertung der immunhistochemischen Präparate im Vergleich zu zytoplasmatischen Markern. Diese Meinung stimmt mit den Ausführungen von REIS-FILHO und Schmitt (2002) überein.

Aufgrund der exzellenten Ergebnisse in seiner Eignungsprüfung kam der Antikörper p63 zur Untersuchung der basaloiden mammären Veränderungen ebenfalls zum Einsatz. Vergleichend wurden CK14 und HHF 35 in den Färbungen verwendet. Auch hier zeigten die immunhistochemischen Färbungen der mammären basaloiden Proliferationen und Neoplasien mittels des Antikörpers p63, wie auch schon seine Testergebnisse demonstrierten, diesen Marker als einen sensitiven, hoch spezifischen Antikörper.

Die in den vorliegenden Untersuchungen erzielten Ergebnisse der positiven Immunreaktivität des humanen p63-Antikörpers in caninem Gewebe rechtfertigen seinen Einsatz in der veterinärmedizinischen Immunhistochemie stark. Der Antikörper erfüllt zudem, wie in vorliegender Austestung gezeigt werden konnte, auch die für die Routinediagnostik notwendige Voraussetzung, als Primärantikörper an formalinfixiertem und paraffineingebettetem Material zuverlässige Färbeergebnisse zu liefern.

Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um seinen diagnostischen Wert einschätzen zu können. So wäre die Erstellung eines Profils der p63-Expression in den verschiedenen caninen Epithelien und in ihren Neoplasien, insbesondere den karzinomatösen Veränderungen, interessant.

Neben diesen Studien des Einsatzes des p63-Antikörpers in der pathohistologischen Diagnostik stehen Untersuchungen der biologischen Relevanz des p63-Proteins und seiner Isoformen noch aus. Der derzeitige Wissensstand der Erforschung des p63-Proteins in seiner Bedeutung und Funktion im Organismus lässt noch viele Fragen ungeklärt und Freiraum für Spekulationen.

Bekannt ist die Lokalisation des p63-Gens, seine biochemische Struktur, seine durch alternatives Splicing der p63-mRNA entstehenden 6 verschiedenen  $\Delta$ N- und TA-Isoformen,

und die bevorzugte Expression der einzelnen Isoformen in den unterschiedlichen humanen Geweben. So wird eine selektive Expression der  $\Delta N$ -Isoformen in den Basalzellen von Plattenepithelien (YANG et al. 1999; STRANO et al. 2001; PELLEGRINI et al. 2001; PARK et al. 2000) und in den Myoepithelzellen der Mamma (YANG et al. 1999; BARBARESCHI et al. 2001), der Speichel- und Tränendrüsen (YANG et al. 1999) beobachtet. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass  $\Delta N$ -Isoformen für die Aufrechterhaltung einer Stamm-/Vorläuferzellen- Population wichtig zu sein scheinen (YANG et al. 1999; BARBARESCHI et al. 2001; PELLERINI et al. 2001; PARK et al. 2000; SIGNORETTI et al. 2000). BARBARESCHI et al. (2001) stellen fest, dass die p63-Immunreaktivität im adulten Epithel normalerweise auf Vorläuferzellen beschränkt ist und vermuten, dass das myoepitheliale Kompartiment Stamm- bzw. Vorläuferzellen, welche eine analoge Rolle wie die Basalzellen der Haut, Prostata und anderer Organe spielen, enthält. Spekulationen dieser Art werden durch Erkenntnisse der Schlüsselrolle des p63-Proteins in der Embryogenese sowie durch klinische Krankheitsbilder beim Menschen, welche Keimzellmutationen im p63-Gen aufweisen, gestützt. Durch den Nachweis des p63-Proteins in myoepithelialen Zellen scheint eine Analogie zu den basalen Reservezellen anderer Epithelien in der physiologischen Funktion vermutbar. Inwieweit diese Kenntnis zur Klärung der Frage der Existenz von mammären Stamm- bzw. Vorläuferzellen genutzt werden kann, muss durch weitere Studien untersucht werden.

Der diagnostische Wert des p63-Antikörpers zur Identifizierung myoepithelialer und auch basaler Zellen bleibt gegeben und sollte für den Hund durch weitere Untersuchungen (mit noch größeren Probenanzahlen als in der vorliegenden Studie) auf seine Verlässlichkeit überprüft werden. Studien in Hinblick auf seine Eignung für die Diagnostik zytologischer Präparate sind ebenfalls sinnvoll und erstrebenswert.

### **4.3. Diskussion der Untersuchungen an den mammären basaloiden Gewebeveränderungen**

#### **4.3.1. Rasse-, Alters- und Geschlechtsverteilung**

Bei den untersuchten Tieren mit mammären basaloiden Gewebeveränderungen handelt es sich ausschließlich um weibliche Tiere. Leider sind in den Begleitschreiben der eingesandten Tumoren weder Informationen zu erfolgten Kastrationen bzw. Ovariohysterektomien (inklusive deren genauen Zeitpunkt), noch zu hormonellen Behandlungen (Läufigkeitsunterdrückung) oder zum Zyklusstand der jeweiligen Hündin vorhanden. Die klinischen Angaben über genauen Sitz, Größe, Konsistenz, Verschieblichkeit und Wachstumsverhalten sowie -geschwindigkeit des Tumors sind meist unvollständig bzw. fehlen ganz.

Bei Betrachtung der vertretenen Rassen stehen Mischlinge an erster Stelle, wie auch von BUSCH (1993) angegeben, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass Mischlingshunde erfahrungsgemäß den Hauptteil der Gesamtpopulation der Hunde darstellen. Den zweiten Rang nehmen die Terrier ein, was sich mit den Aussagen von DAHME und WEISS (1958)

deckt, die Terrier ohne weitere Rassespezifizierung als überdurchschnittlich häufig betroffene Rassegruppe angaben. An dritter Stelle stehen zum einen die, wie auch von VON SANDERSLEBEN (1959), GUTBERLET (1994) und ESKENS (1983) als häufig betroffen angesehenen Dackel, sowie der Deutsche Schäferhund, den BOSTOCK (1986) als häufig betroffen betrachtet, und der Dobermann. Den vierten Rang teilt sich der Deutsch Langhaar mit dem Boxer, für welchen HOWARD und NIELSON (1965) ein geringes Erkrankungsrisiko sehen.

Das Durchschnittsalter der erkrankten Tiere liegt bei 9,3 Jahren. Dies deckt sich mit den Angaben von GUTBERLET et al. (1998), die das häufigste Auftreten von Mammatumoren in einem Alter zwischen 7 und 13 Jahren beobachten. Übereinstimmung zeigt sich auch mit den Aussagen von DAHME und WEISS (1999), die ein Maximum der Tumorfrequenz zwischen dem 9. und dem 11. Lebensjahr sehen.

Aufgrund der geringen Fallzahl sind diese Beurteilungen der Geschlechts-, Rassedisposition und des Durchschnittsalters, der dieser Studie zugrunde liegenden Fälle jedoch nicht aussagekräftig und waren in Hinblick auf die untersuchte Fragestellung der Histogenese der basaloiden Tumoren nicht Ziel dieser Arbeit. Weitere Untersuchungen zur Ermittlung statistisch repräsentativer Daten sind erstrebenswert.

#### **4.3.2. Bewertung der in den immunhistochemischen Untersuchungen der basaloiden mammären Gewebeveränderungen eingesetzten Antikörper**

Der Diskussion der Befunde der Untersuchungen an den basaloiden Proliferationen und Neoplasien des caninen Mammaparenchyms wird die Besprechung der Sensitivität und Spezifität der verwendeten Antikörper vorangestellt.

##### **4.3.2.1. Die Zytokeratinmarker AE1 und LP34**

Als panepithelialer Marker wurde der Antikörper AE1 eingesetzt. Er umfaßt die sauren Zytokeratine 10, 14, 15, 16 und 19 und gibt den ersten Hinweis auf epidermales Ursprungsgewebe. Den Erwartungen entsprechend, zeigten die basalen/myoepithelialen, suprabasalen und luminalen Zellen eine positive Reaktion, die sich in einer starken Rotfärbung des Zytoplasmas dieser Zellen äußerte. Diese positive Reaktion des Myoepithels mit AE1 steht konträr zu den Ergebnissen von WALTER (1995), in dessen Untersuchungen (an 10 Proben pathologisch unverändertem Mammagewebe und 8 komplexen Adenokarzinomen) eine Darstellung der Myoepithelien durch AE1 nicht erfolgte. Eine positive Reaktion dieses Zelltyps ist aufgrund der angegebenen Antikörperspezifität, die auch die Erkennung des Zytokeratins 14 beinhaltet, nicht verwunderlich, da wie unter Punkt 2.11. aufgeführt eine CK14-Expression in den basalen/myoepithelialen Zellen von VOS et al. (1993c) und GRIFFEY et al. (1993) des caninen Mammagewebes nachgewiesen wurde.

Im Exzidat enthaltene Haut reagierte weitgehend einheitlich: Basalzellen und Suprabasalzellen, sowie das sekretorische Epithel der Schweißdrüsen und die äußere epitheliale Wurzelscheide der Haarfollikel zeigten weitgehend starke Anfärbungen und konnten als interne Kontrollen genutzt werden.

Der Antikörper LP34 hat sich als nützlich für die Identifizierung und Differenzierung epithelialer Tumoren erwiesen (LANE et al. 1985; PERKINS et al. 1992). Er markiert die Zytokeratine 5, 6 und 18, wobei der Hersteller darauf hinweist, dass die Markierung von CK 18 bis jetzt nur an Gefrierschnitten von PERKINS et al. (1992) mitgeteilt wurde.

Das Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen der Mammagewebsproben zeigt in 19 Fällen eine positive Reaktion der basalen, suprabasalen und luminalen Zellen, teils mit verschiedenen Intensitäten oder Verteilungsmustern, und in nur 3 Fällen (09, 11, 16) eine ausschließlich auf die basalen Zellen beschränkte Immunreaktivität. Bei Betrachtung des unveränderten Mammagewebes in der Peripherie der mammären Veränderungen zeigt sich ein ähnliches Bild: in 5 Fällen ist eine nur auf die basalen Zellen beschränkte Reaktion zu beobachten, in 6 Fällen zeigt sich das basale und lumbale Epithel als positiv, und ein Fall zeigt eine basale Immunreaktivität und eine positive Reaktion im duktalem Epithel. Alveoläres und duktales Epithel der Mamma ist durch die Markierung der Zytokeratine 8/18 (VOS et al. 1993; Moll et al. 1993; WALTER 1995; ALTMANNBERGER et al. 1985a), basales/myoepitheliales durch Markierung der Zytokeratine 5/14 (ALTMANNBERGER et al. 1985a; Moll et al. 1993; MULAS et al. 2002) und 14 und 17 (VOS et al. 1993) in der Immunhistochemie darstellbar.

Die in dieser Studie gewonnenen Färbepprofile des Mammaparenchyms machen deutlich, dass der Antikörper LP34 auch an Paraffinschnitten das Zytokeratin 18 markiert. Evident ist dies aus der Anfärbung der luminalen Zellen, welche dieses Zytokeratin im Gegensatz zu den basalen Zellen enthalten. Die dargestellten Ergebnisse lassen aber diesen Antikörper für die Darstellung des Zytokeratin 18 aufgrund seiner unregelmäßigen Markierung als nicht verlässlich erscheinen. Jedoch sprechen die Ergebnisse in dieser Studie für einen sicheren Nachweis des Zytokeratins 5 in den basalen/myoepithelialen Zellen der caninen Mamma durch diesen Antikörper.

#### **4.3.2.2. Die myoepithelialen Marker: CK14, HHF35 und p63**

Zur Identifizierung, Differenzierung und Darstellung der Morphologie basaler/myoepithelialer Zellen kamen drei Antikörper mit unterschiedlichen antigenen Angriffspunkten zum Einsatz: Die beiden zytoplasmatischen Marker CK14 (mit Angriffspunkt am Zytoskelett) zur Darstellung des epithelialen Phänotyps und HHF35 (die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Aktin-Isoformen markierend) zur Darstellung des kontraktiven Phänotyps. Zusätzlich wurde der Zellkernproteinmarker p63 für die Färbungen verwendet.

Der Muskelaktinantikörper HHF35 zeigt eine Spezifität für die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Isoformen des Aktins (TSUKADA et al. 1987) und färbt nach GOTTLIEB (1990) die Myoepithelschichten der Milchgänge und -drüsen. Das Wissen, dass er ebenfalls stromale Myofibroblasten darstellt, lässt ihn im Vergleich der Spezifität der hier angewandten myoepithelialen Marker bereits an letzte Stelle treten. Die Intention für den Einsatz von HHF35 war neben der morphologischen Darstellung des kontraktiven Phänotyps die Möglichkeit, einen Differenzierungsverlust neoplastischer Zellen an ihrer herabgesetzten oder fehlenden Aktinexpression beurteilen zu können.

Nach den Ergebnissen vorliegender Studie erscheint HHF35 für die Darstellung der basalen/myoepithelialen Zellen der caninen Mamma als nicht geeignet. Trotz mehrmalig wiederholter Färbungen veränderten sich die Resultate nicht. In nur drei Fällen konnte das Zytoplasma flacher Myoepithelien dargestellt werden und bei Betrachtung des pathologisch unveränderten Mammagewebes in der Peripherie der mammären Veränderungen war nur in 2 von 12 Fällen flaches Myoepithel um Gänge und Alveolen nachzuweisen, und in einem weiteren Fall erfolgte eine unregelmäßige, wenig homogene Färbung der myoepithelialen Zellen.

Diese Beobachtungen der negativen Immunreaktivität im physiologischen, also unveränderten Mammagewebe zeigen die dem Antikörper fehlende Spezifität zur Darstellung caniner Myoepithelzellen. Die Überlegung, die negativen Resultate als eine herabgesetzte Aktinexpression der neoplastischen Zellen zu deuten, erscheint nicht begründet.

Im Gegensatz dazu stellte der Antikörper HHF35 einerseits in allen untersuchten Gewebeproben die enthaltenen Blutgefäße durch Darstellung ihrer glatten Muskelzellen exzellent dar, sowie in 7 Fällen die in Stroma und Tumorkapseln enthaltenen Myofibroblasten, welche mit CK14 und p63 negativ reagierten. Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den Ergebnissen von GRIFFEY et al. (1993) an caninem hyperplastischen und neoplastischen Mammagewebe. Sie beobachteten variable Reaktion in Form von inkonsistenten Reaktivitäten mit dem Antikörper HHF35 an den mammären Hyperplasien und Adenomen. Bei den Adenokarzinomen reagierte nur ein sechstel ihrer Fälle mit dem Aktinmarker, wobei in allen untersuchten Proben analog der vorliegenden Studie immer die Muskelzellen der Blutgefäße positiv reagierten. Während in der Humanmedizin der Muskelaktinmarker (clone HHF35) neben dem  $\alpha$ -smooth muscle actin (clone 1A4) den populärsten Marker darstellt (YAZIJI et al. 2000), scheint ihm hingegen für die Darstellung des caninen Myoepithels die notwendige Sensitivität und Spezifität zu fehlen.

Die mit Hilfe des Antikörpers dargestellten Myofibroblasten konnten in verschiedenen Tumortypen unterschiedlicher Dignität gezeigt werden, was die Aussagen von SAPINO et al. (1991) zu bestätigen scheint, dass diese Zellen in die desmoplastische Antwort des Stromas auf Neoplasien involviert sind. Auch die These von WARGOTZ et al. (1987), die das Erscheinen dieser Zellen in verschiedenen neoplastischen und nicht-neoplastischen Veränderungen als unterstützende Reaktion der Stromalen Komponente sehen, wird unterstützt.

Im Vergleich zum Muskelaktinmarker (clone HHF35) zeigt der Zytokeratinantikörper CK14 hingegen die notwendige Spezifität zur Darstellung der myoepithelialen/basalen Zellen, jedoch scheint er, die Intensität der Anfärbung betrachtend, nicht über eine hohe Sensitivität gegenüber dieser Zellart im caninem Mammaparenchym zu verfügen, da in 15 von 22 Fällen, trotz wiederholter Färbungen, nur eine schwache Anfärbung zu verzeichnen ist. Dies deckt sich mit der Meinung von GOTTLIEB et al. (1990); HEATLEY et al. (1995) und JOSHI et al. (1996), die ebenfalls den Nachteil dieses Markers in seiner schwachen Sensitivität sehen. Neben der Identifizierung der Zellart gibt er weiterhin auch Aufschluss über eine veränderte Zytokeratinexpression neoplastischer Zellen. So ist im Fall 10 und 12 eine Neoexpression des Zytokeratins 14 neoplastischer epithelialer Zellen der multiplen soliden Karzinome (vom einfachen Typ) und ihrer frühen Entwicklungsstufen zu beobachten. Ein ähnliches Ergebnis sahen auch VOS et al. (1993b) in ihren Untersuchungen maligner Mammatumore: fünf Adenokarzinome, vier vom einfachen und eins vom komplexen Typ, sowie die soliden Anteile eines Karzinosarkoms zeigten eine homogen Anfärbung mit einem Zytokeratin 14 markierenden Antikörper und negative Ergebnisse mit dem Antikörper  $\alpha$ -SMA. Auch in der Humanmedizin wurden bei einigen Karzinomen Tumorzellen mit einem basal/myoepithelialen Keratinphänotyp beobachtet, die das Zytokeratin 14 exprimierten (GOULD et al. 1990; SENEZAKI et al. 1992; TSUBURA et al. 1991; WETZELS et al. 1989, 1991). Im Allgemeinen ist eine Neoexpression von Intermediärfilamenten bei malignen Transformationen öfter der Fall als Expressionsverluste. Denkbar ist ein Anschalten bestimmter Onkogene, die zu einer Aktivierung der Zytokeratinexpression führen.

Vos et al. (1993) warfen die Frage auf, inwiefern dieses Phänomen der CK14-Expression maligner neoplastischer epithelialer Karzinomzellen als Indikator für eine bestehende Malignität wertvoll ist. Eine weitere Beobachtung, den Untersuchungen VOS et al. (1993b) ebenfalls entnehmbar, erscheint jedoch vom diagnostisch höheren Wert: Ein Verlust der myoepithelialen Schicht geht mit infiltrativem Wachstum einher (BUSSOLATI et al. 1980; GOTTLIEB et al. 1990; WETZELS et al. 1991). In der heutigen Zeit hat sich diese Feststellung bewahrheitet und in der pathologischen Diagnostik der Humanmediziner etabliert: die Identifikation der myoepithelialen Schicht ist von größtem Wert, um maligne von nicht invasiven in situ Karzinomen sowie benignen Veränderungen abgrenzen zu können (BARBARESCHI et al. 2001). Auch die invasiven Karzinome lassen sich so vom duktalem Karzinoma in situ unterscheiden, welches seine myoepitheliale Schicht noch besitzt (YAZIJI et al. 2000). Für diese Fragestellung, die auch in der Veterinärmedizin für prognostische Aussagen wichtig ist, hat sich die Eigenschaft des Antikörpers p63, die Kerne der myoepithelialen/basalen Zellen zu markieren, von außerordentlichem Vorteil gezeigt. In den in dieser Studie untersuchten multiplen basaloiden Veränderungen ist die Beurteilung der periphersten, myoepithelialen/basalen Schicht durch die zytoplasmatische Färbung mittels des Antikörpers CK14 schwierig. Eindeutige Aussagen über ihre Vollständigkeit können nicht sicher getroffen werden, da lang gezogene Zytoplasmaausläufer der spindelförmigen Zellen gefärbt und noch schnittbedingt unterschiedlich getroffen werden. Durch die Kernfärbung des Kernproteinmarkers p63 sieht man jedoch bei vorhandener myoepithelialer

Zellschicht die Kerne perlenschnurartig in einer Ebene liegen, lokalisierte Verluste oder ihr Fehlen ist mit größerer Sicherheit zu befunden.

Des Weiteren ist die Beobachtung erwähnenswert, dass in vorliegender Studie in der HHF35-Färbung in 2 Fällen (01; 06) und in der CK14 Färbung in 5 der untersuchten Fälle (01, 06, 19, 20, 21) positive Reaktionen der keratinisierten Zellen zu beobachten sind, was die These von ENGHARD und HALE (1989) zu betätigen scheint, dass Myoepithelzellen die Kapazität besitzen, squamös zu differenzieren.

Die Ergebnisse der in dieser Studie durchgeführten immunhistochemischen Färbungen der mammären basaloiden Proliferationen und Neoplasien mittels des Antikörpers p63 stellen, wie auch schon seine Testergebnisse demonstrierten, diesen Marker als einen sensitiven, hoch spezifischen Antikörper dar.

#### **4.3.2.3. Grenzen der Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie ist eine wichtige Hilfsdiagnostik mit dem Ziel der Tumoridentifizierung (CULLEN et al. 2002). Antikörper, die gegen Zytokeratine und Vimentin gerichtet sind, werden zur Basisdiagnostik oft genutzt, um herauszufinden, ob eine in der HE-Färbung nicht einzuordnende Neoplasie/Metastase epithelialen oder mesenchymalen Ursprungs ist. Bei schlecht differenzierten Neoplasien werden zunächst panepitheliale Zytokeratinmarker eingesetzt. Eine präzisere Identifikation eines speziellen Zelltyps kann mit individuellen monoclonalen Antikörpern, die spezifische Zytokeratine markieren, getroffen werden, die für den Zelltyp oder seinen Differenzierungsgrad spezifisch sind (OSBORN und WEBER 1982; FRITSCHKE et al. 1991; Krüger 1996). Die Theorie der Immunhistochemie erscheint einfach und verständlich, kann jedoch, wie CULLEN et al. (2002) anmerken, herausfordernd sein.

Während normales, pathologisch unverändertes Gewebe relativ konstante Muster in seinen Färbungen (d.h. konstante Expressionsmuster) zeigt, können durch die neoplastische Transformation von Tumorzellen in Neoplasien heterogene Muster in den immunhistochemischen Färbungen beobachtet werden. Es kann zu Expressionsverlusten und Neoexpressionen kommen. So zeigen Tumorzellen in pleuralen und abdominalen Transsudaten (RAEMAEEKERS et al. 1983a), in Mesotheliomen und Synovialzellsarkomen (CULLEN et al. 2002) und allgemein in Epithelien bei Zellschädigungen (GRÖNE et al. 1987; MOLL et al. THOENES 1991) eine Neoexpression von Vimentin. Des Weiteren ist oft eine Variation in der Anzahl der gefärbten Tumorzellen zu beobachten, auch bei Optimierung der verschiedenen Parameter (wie Fixationszeit des zu untersuchenden Gewebes) und Techniken im Ablauf der Immunfärbung (wie Art der Vorbehandlung und Inkubationszeiten). Ist eine geringe Anzahl von Zellen gefärbt, die eindeutig als neoplastische Zellen zu identifizieren sind, ist das Resultat der Färbung als positiv zu werten (CULLEN et al. 2002). Letztgenannte Autoren empfehlen, zum Schutz vor Fehlinterpretationen nicht nur einen, sondern mehrere Antikörper einzusetzen. Ein Beispiel für eine Fehldiagnose bei Verwendung nur eines

Antikörpers ist in vorliegender Studie anhand des Falles 12 demonstrierbar: bei alleiniger Verwendung des Zytokeratinantikörpers CK14 hätte die durchweg positive Reaktion aller neoplastischen Zellen zu der Diagnose des Vorliegens eines Myoepithelkarzinoms führen können. Unter ebenfalls erfolgter p63-Färbung konnte die Neoexpression von Zytokeratin 14 der maligne transformierten Drüsenepithelzellen gezeigt werden.

In vorliegender Studie wird die eindeutige histogenetische Interpretation durch die zu beobachtende Spezifität zweier Antikörper eingeschränkt. Der Zytokeratinantikörper CK14 und der Kernproteinmarkers p63 besitzen beide die bemerkenswerte Eigenschaft, myoepitheliale Zellen im Mammaparenchym und Basalzellen der Haut positiv darzustellen. Zum einen schränkt diese Beobachtung in einigen Fällen die Möglichkeit ein, mittels immunhistochemischer Untersuchungen Differentialdiagnosen von einander abgrenzen zu können ein, jedoch gibt sie auch zu einigen interessanten Überlegungen Anlass.

Die erwähnte Einschränkung in der Diagnostik ist in den unter Punkt 4.3.4.4. als Grenzfälle bezeichneten Neoplasien gegeben und ist durch den für canines Mammagewebe nicht geeignet scheinenden Antikörper HHF35 mitbedingt. Da dieser Antikörper den kontraktile Phänotyp caniner myoepithelialer Zellen nicht darzustellen vermag, entfällt ein wichtiges Kriterium zur erforderlichen Abgrenzung der möglichen Diagnosen.

Die Befundung der basaloiden Proliferationen und Neoplasien erfolgte in dieser Arbeit einerseits unter genauer Differenzierung der histologischen und zellmorphologischen Kriterien und Strukturen in der HE-Färbung, sowie andererseits unter anschließender Miteinbeziehung der Beurteilung der immunhistologischen Reaktionen der neoplastischen Zellen.

### **4.3.3. Bewertung der PAS-Färbung und Einschränkungen in der diagnostischen Aussagekraft**

Als zusätzliche histochemische Färbung wurde die PAS-Reaktion angewendet, da anhand ihrer die Basalmembranen darstellbar sind, welche das mammäre Parenchym (Drüsen-, Gang- und Myoepithelien) vom Stroma abgrenzen. Die Anfärbung dieser Basalmembranen wurde zur Orientierung genutzt, um die Zelllokalisierung beurteilen und die Ausrichtung der palisadenartig angeordneten Zellen darstellen zu können.

An Stellen infiltrativen Wachstums zeigten sich Diskontinuitäten (in 10 der Fälle) und in aggressiv infiltrativ wachsenden Neoplasien konnte das weitgehende Fehlen der Basalmembranen beobachtet werden (Fall 04 und 12). Zum Nachweis einer stromal-invasiven, bzw. nicht invasiven mammären Veränderung sollte die Darstellung der Basalmembran, durch die PAS-Färbung oder auch durch den Einsatz von Antikörpern gegen Kollagen Typ IV oder Laminin, jedoch nicht genutzt werden. Zwar scheint die Produktion des Basalmembranmaterials in benignen und in situ Läsionen quantitativ höher zu sein (PRASAD et al. 1998), es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass invasive Karzinome noch zu einer

ausreichender Synthese von Basalmembranproteinen in der Lage sind, so dass diese um invasive Zellnester herum nachweisbar sind (RAYMOND et al. 1991; WILLBRAND et al. 1986) und so zu Fehldiagnosen geleiten können.

#### **4.3.4. Fallbesprechung unter Berücksichtigung der in der HE-, PAS- und Immunfärbungen erhobenen Befunde**

Die folgend aufgeführte Besprechung und Bewertung der Einzelfälle bzw. Fallgruppen erfolgt nach den in der HE-Färbung befundeten Diagnosen, um die einzelnen Tumortypen eingehend vergleichen und besprechen zu können.

##### **4.3.4.1. Benigne Tumoren basaloider Morphologie**

###### **4.3.4.1.1. Basaloide Adenome**

Anhand ihres morphologischen Erscheinungsbildes in der HE-Färbung wurden 2 Fälle als basaloide Adenome klassifiziert. Fall 11 ist ein Tumorexzidat einer elfjährigen Beagle-Mischlinghündin, während die Gewebeprobe des Falls 20 einer sechsjährigen Boxerhündin entnommen wurde. In den wenigen Untersuchungen von basaloiden Adenomen, die bis jetzt vorliegen, ist noch kein solch hohes Alter von elf Jahren beobachtet worden. Die 2 von ESPLIN (1984) untersuchten Fälle wiesen beide ein Alter von 6 und die 4 von DE LAS MULAS (2002) untersuchten Fälle zeigten ein Durchschnittsalter von 6,75 Jahren. Sehr abweichend repräsentieren sich die mit kontrazeptiven Steroiden behandelten Hündinnen in der Studie von KWAPIEN et al. (1977), die in einem Durchschnittsalter von 2,5-3,5 Jahren erkrankten.

Eine Angabe zur genauen Vorkommenshäufigkeit dieses Tumortyps ist der WHO-Klassifikation nicht zu entnehmen. DE LAS MULAS et al. (2002) gibt sie, bezogen auf 354 von ihnen untersuchten Mammatumoren in den Jahren 1998-2002, mit 1% an. KWAPIEN et al. (1977) stellten fest, dass 10% der Tumore, die die Hunde in ihrer Studie entwickelten, basaloide Adenome sind. Jedoch sind aufgrund der toxikologischen Studie, der die Hunde unterzogen wurden, diese Daten nicht repräsentativ. So weisen die von KWAPIEN et al. (1977) untersuchten Tiere auch ein wesentlich früheres Erkrankungsalter auf. Die in der vorliegenden Studie untersuchten Fälle entstammen den eingesandten Tumorproben an die Veterinär-Pathologie der FU-Berlin der Jahre 1994 bis 2004, d.h. der letzten 11 Jahre. Diese Relationen erwecken den Anschein des ebenfalls seltenen Vorkommens dieses Tumortyps, jedoch kann diese Aussage nicht mit Sicherheit getroffen werden, da mit großer Wahrscheinlichkeit nicht alle chirurgisch entfernten Tumoren zur Einsendung gelangten. Einige Tierärzte sind fälschlicherweise der Überzeugung, von klinisch erhobenen Befunden die Dignität des Tumors abschätzen zu können, weshalb sie viele ihnen benigne erscheinende Tumoren nicht histopathologisch untersuchen lassen. Die in der Literatur beschriebenen klinischen Befunde der basaloiden Adenome, als kleine diskrete und palpatorisch vom

umliegenden Gewebe gut abgesetzte Tumoren, ließe sie in diese Kategorie der oft nicht eingesandten Tumoren fallen. Lediglich ein Fall von DE LAS MULAS (2002) fiel durch seine abweichende Größe sowie durch oberflächliche Ulzerationen auf. Aus den Vorberichten der hier untersuchten Fälle erfolgte leider nur im Fall 20 eine anamnestiche Beschreibung, dass es sich um eine im Durchmesser ca. 2,5 mm große Zubildungen handelt.

In beiden Fällen stellte das basaloide Adenom nicht die einzige zu diagnostizierende Neoplasie dar: im Fall 11 wurde ebenfalls ein kleines squamöses Karzinom, im Fall 20 ein adenosquamöses Karzinom gleicher Größe (ebenfalls eine Durchmesser von ca. 2,5 mm aufweisend) befundet. In ihren Untersuchungen stellten DE LAS MULAS (2002) in zwei ihrer 4 untersuchten Fälle ebenfalls maligne Tumoren fest: solide Karzinome in einem und im anderen Fall ein komplexes Karzinom sowie ein komplexes Adenom.

Das mikroskopische Bild zeigt in beiden Fällen eine Kapselbildung, die im Fall 11 schwach ausgeprägt ist, sich im Fall 20 jedoch prominent darstellt, wie es ebenfalls in den Untersuchungsergebnissen von DE LAS MULAS et al. (2002) und ESPLIN (1984) beschrieben wurde. Beide Tumoren besitzen wenig Stroma. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von DE LAS MULAS (2002) und KWAPIEN et al. (1977). Die von ihnen beobachteten Spaltbildungen im Stroma sind hier jedoch nicht ausgebildet.

Das histologische Bild der Neoplasie im Fall 11 zeigt in der HE-Färbung in allen Bereichen eine Drüsendifferenzierung der zentralen basaloiden monomorphen Zellen, während die peripheren basaloiden Zellen palisadenartig gegen eine dünne, in der PAS-Färbung deutlich erkennbare, Basallamina angeordnet sind. Der Fall 20 zeigt uniforme basaloide Zellen von denen die zentralen drüsige aber auch keratotische Differenzierungen aufweisen, während die peripheren Zellen perpendikulär stehen und ebenfalls palisadenartig gegen eine, in der PAS-Färbung dargestellte, Basallamina angeordnet sind. Dies deckt sich mit den Untersuchungen von DE LAS MULAS (2002), die ebenfalls die Lokalisation der Basalmembran an der Basis der peripheren palisadenartig angeordneten Zellen zeigten. Die keratotischen Herde bestehen aus teils spiralförmig geschichteten Keratinlamellen und erwecken den Eindruck einer abrupten Keratinisierung, wie sie auch von KWAPIEN et al. (1977) beschrieben wird.

Das histomorphologische Erscheinungsbild des Zelltyps und der histologischen Struktur des Tumors gleicht im Fall 11 dem Hidradenom des Menschen, welches als eine gutartige epitheliale Fehlbildung der apo- und ekkrinen Schweißdrüsen, bzw. ein von Resten akzessorischen Mammagewebes im Bereich der Milchleiste gebildetes Adenom definiert ist, und erinnert im Fall 20 an die ehemals als keratotische Basalzellentumoren bezeichneten Neoplasien der Haut. Derartige Analogien zeigten ESPLIN (1984), KWAPIEN et al. (1977) und DE LAS MULAS et al. (2002) ebenfalls auf. Letztgenannte Autoren beschrieben ebenfalls Parallelen zu dem selten vorkommenden Basalzelladenom der Speicheldrüsen des Menschen. Vergleiche dieser Art zwischen caninen mammären Neoplasien und Tumoren der Speicheldrüsen des Menschen sind in der Literatur vielfach vorhanden und sind insofern

interessant, da beide exokrinen Drüsen ektodermalen Ursprungs sind, ähnliche Entwicklungsmodi aufweisen und sich ihre Strukturelemente und der histologische Aufbau gleichen.

Die immunhistologischen Befunde zeigen sich in beiden Fällen als weitgehend übereinstimmend. Der epitheliale Ursprung bestätigt sich in der positiven Reaktion der basaloiden Tumorzellen mit den Antikörper AE1, welcher in beiden Fällen alle neoplastischen Zellen, d.h. die basalen suprabasalen und luminalen markiert. Den Erwartungen entsprechend reagierten die den Tumor bildenden Zellen mit dem Antikörper LP34 in der Form, dass die basal lokalisierten Zellen in beiden Fällen positiv waren. Zusätzlich stellten sich die suprabasalen und luminalen Zellen im Fall 20 positiv dar. Der von DE LAS MULAS et al. (2002) anhand seiner Untersuchungsergebnisse an 4 basaloiden Adenomen postulierte basalzellenspezifische Phänotyp der neoplastischen Zellen der basaloiden Adenome zeigt sich in den Immunfärbungen der in der vorliegenden Studie untersuchten basaloiden Adenome nicht. Das Färbeprofil der basaloiden Adenome mit den Markern CK14 und p63 zeigt positiv reagierende basale Zellen, im Fall 11 sind die dargestellten basalen/myoepithelialen Zellen von flacher spindelförmiger Gestalt, im Fall 20 zeigen sie sich als basaloid und es sind zusätzlich vereinzelt positive fokale Herde zu beobachten. Diese fokalen Herde könnten auf eine assoziierte Hyperplasie der basalen/myoepithelialen Zellen hinweisen, sind jedoch eher durch einen Tangentialanschnitt erklärbar. Die Befunde der positiv dargestellten peripheren Zellen der basaloiden Adenome und negativ reagierenden zentralen Zellen decken sich mit dem Untersuchungsergebnis von GAMA et al. (2003), die einen Fall eines basaloiden Adenoms mittels des p63 Antikörpers untersuchten und eine positive Immunreaktivität der basalen, peripheren Zellen feststellten. Zu erwähnen ist, dass der Fall 11 einen der wenigen 3 Fälle darstellt, in denen der Antikörper HHF35, abgesehen von den im Gewebeschnitt enthaltenen Blutgefäßen, auch positive Resultate im umgebenen Mammaparenchym und am basaloiden Adenom in der Form zeigte, dass die basalen/myoepithelialen Zellen durch ihr rot gefärbtes Zytoplasma exzellent zu identifizieren waren.

Auf der Grundlage der dargestellten immunhistochemischen Ergebnisse stellen sich die in dieser Studie untersuchten caninen basaloiden Adenome als Adenome vom einfachen Typ dar, die nachweislich nur aus entartetem Drüsenepithel bestehen. Diese Tatsache sowie ihre charakteristische histologische Struktur und im Fall 20 die Eigenschaft, keratotische Differenzierung auszubilden, unterscheidet sie von den in der WHO-Klassifikation definierten einfachen Adenomen.

Es wäre sinnvoll in der WHO-Klassifikation eine Unterteilung der einfachen Adenome vorzunehmen. Es bieten sich zwei Möglichkeiten. Einerseits könnten 3 Subtypen unterschieden werden, die Drüsenepitheliome, die Myoepitheliome und die basaloiden Adenome. So wird dem speziellen Erscheinungsbild der basaloiden Adenome Rechnung getragen. Andererseits ist eine Unterteilung in 2 Subtypen (1. Drüsenepitheliome, 2.

Myoepitheliome) denkbar. Hierbei ist eine Einordnung der basaloiden Adenome in die erste Kategorie erforderlich, in der sie als spezielle Variante geführt werden können.

#### **4.3.4.1.2. Einfaches Adenom**

Fall 22 zeigt ein durch eine zarte Kapsel begrenztes multifokales Adenom, welches durch unterschiedlich stark ausgeprägte bindegewebige Septen kompartiert ist und sich aus basaloiden, monomorphen Zellen zusammensetzt. Vom Zelltyp und seiner histologischen Struktur ist der Tumor sehr interessant. Areale erinnern in ihrem Charakter an ein basaloides Adenom, da die peripheren Zellen palisadenartig, perpendikulär zu den übrigen Zellen stehend, angeordnet sind und die zentralen Zellen zum Teil eine Drüsendifferenzierung aufweisen. In anderen Teilen der Neoplasie sind zum einen syringähnliche Differenzierungen zu beobachten sowie lumenfüllende solide Proliferationen, wobei die neoplastischen Zellen sich durch ihre Uniformität auszeichnen, euchromatische Nuklei und keine Mitosen aufweisen. In der HE-Färbung ist die Neoplasie als einfaches Adenom zu befunden.

Die PAS-Färbung zeigt keine Diskontinuitäten der Basalmembranen in der mammären Gewebeveränderung.

Die positive Immunreaktivität aller neoplastischen Zellen mit den Antikörpern AE1 und LP34 bestätigt die epitheliale Herkunft der Neoplasie. Die immunhistologischen Befunde der CK14 und besonders der p63-Färbungen zeigen allerdings ein sehr außergewöhnliches Bild: Nicht nur die peripheren, basalen Zellen, sondern auch fast alle lumenauskleidenden Zellen stellen sich als einheitlich positiv in ihrer Reaktion dar. Dazwischen liegen mehrere Schichten negativ reagierender Drüsenepithelien, wobei in einigen Veränderungen die suprabasale Zellschicht ebenfalls positive Reaktionen zeigt. In der p63 Färbung stellt sich das Ergebnis auf Grund des nukleären Färbemusters optisch deutlicher da. Es sind zusätzlich fokale positive Herde und in einem Areal mehrere solide Proliferationen in ihrer Gesamtheit positiv gefärbt. In vielen Fällen ist zwischen den äußeren basalen und den inneren luminalen Zellen eine „Brücke“ positiver Zellen. Vereinzelt sind in den negativ reagierenden suprabasalen neoplastischen Drüsenepithelschichten Einzelzellen positiv, aber die Intensität ihrer Anfärbung ist schwächer.

Die dargestellten Befunde lassen verschiedene Interpretationsansätze zu:

Vom heutigen wissenschaftlichen Kenntnisstand ausgehend, dass CK14 und p63 im Mammaparenchym myoepitheliale Zellen identifizieren, ist der Tumor als ein komplexes Adenom zu klassifizieren, da er nachgewiesenerweise aus neoplastischen Drüsenepithelzellen (AE1 und LP34: positiv) sowie neoplastischen Myoepithelzellen (CK14 und p63: positiv) besteht. Allerdings verwundert die histologische Struktur des Adenoms.

Die spezielle histologische Anordnung könnte durch eine Konfluenz benachbarter, expansiv wachsender Drüsenepithelien unter Mitbeteiligung des neoplastisch proliferierenden Myoepithels entstehen.

Ebenfalls denkbar ist eine intraluminale neoplastische Proliferation der myoepithelialen Zellen, eine These, welche anhand der in der Spezialfärbung an einigen Strukturen zu beobachtenden gebildeten „Zellbrücken“ zwischen der basalen und lumenauskleidenden Schicht unterstützt wird. Die Tatsache, dass in einigen Teilen leere Lumina durch myoepitheliale Zellen ausgekleidet sind, ist ungewöhnlich, aber als ein frühes Stadium der Proliferation interpretierbar, in der sich die Zellen anhand der vorgegebenen Strukturen ausbreiten.

Überlegungen anderer Art betreffen die Heterogenität von Färbeprofilen in neoplastisch verändertem Gewebe. Eine Neoexpression von Intermediärfilamenten in maligne entarteten Zellen ist bekannt (HOLCK et al. 1998) und ist natürlich auch bei benignen Neoplasien grundsätzlich nicht auszuschließen. Allerdings ist anhand dieser Spekulation das immunhistochemische Färbeprofil des Antikörpers p63 nicht erklärbar.

Interessant ist die von HELLMÉN und LINDGREN (1989) aufgestellte These, dass es in der Mamma Stammzellen geben könnte, die sich während der Tumorgenese in verschiedene Phänotypen entwickeln. Aufgrund ihrer Resultate einer heterogenen Intermediärfilamentexpression in verschiedenen caninen Mammatumoren bekräftigte HELLMÉN (1992) ihre These durch die aus caninen Karzinomen und einem benignen Misch tumor etablierten Zelllinien, mit denen sie anhand ultrastruktureller Untersuchungen epitheliale und intermediäre Zelltypen (zwischen epitheliale und myoepitheliale Typ) nachwies. Ihrer Meinung nach sind Stammzellen in der Mamma, welche zu epithelialen oder myoepithelialen Zellen differenzieren können, wahrscheinlich, und es scheint, dass verschiedene bis jetzt noch nicht identifizierte Zelltypen in der Mamma und in ihren Tumoren vorkommen, die sich in verschiedenen Zuständen der Differenzierung befinden und somit variierende Phänotypen zeigen.

Im vorliegenden Fall könnten die zu beobachtenden Färbeprofile auf sich differenzierende Stamm-/Vorläuferzellen zurückzuführen sein. Da HELLMÉN (1992) die Stammzellen im Epithel lokalisiert vermutet, breiten sich die entarteten Stamm/Vorläuferzellen (unter Gesichtspunkten ihrer Überlegungen) von lumenseits gelegenen Strukturen aus. So werden durch den Antikörper p63 einerseits die benigne entarteten, Lumina strukturierenden Zellen dargestellt, aber andererseits auch die Tumorzellen, die durch ein zur Basis der alveolären und dukta len Strukturen gerichtetes neoplastisches Wachstum entweder im Anschnitt getroffenen wurden - sich also im histologischen Schnitt zwischen Lumen und Peripherie gelegen präsentieren - oder nun an der Basis lokalisierte entartete Zellen sind. Negativ reagierende Tumorzellen befinden sich in einem vorangeschrittenen Differenzierungsstadium zu Zellen, die im Phänotyp den Drüsenepithelien gleichen.

Hinsichtlich der Anschauungen von HELLMÉN (1992), die Histo- bzw. Tumorgenese der caninen Mammatumoren betreffend und der biologischen Relevanz des p63-Proteins sowie der Rolle der Myoepithelzellen in Bezug auf die mammären Stamm-/Vorläuferzellen stellen sich neue Erkenntnisse durch weitergehende Untersuchungen als äußerst interessant und

erstrebenswert dar. Zu betonen bleibt, dass die Beobachtung des Nachweises des p63-Proteins in den zurzeit als Myoepithel bezeichneten Zellen eine Analogie ihrer physiologischen Funktion dieser zu den Vorläuferzellen anderer Epithelien zu implizieren vermag. Inwieweit diese Feststellung jedoch zur weiteren Klärung der Existenz der mammären Stamm-/Vorläuferzellen beiträgt, erscheint zurzeit noch fragwürdig.

#### **4.3.4.2. Maligne Tumoren basaloider Morphologie**

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

Fall 15 zeigt in der HE-Färbung in der Peripherie einer umfangreichen Geschwulst, welche sich aus mehreren Adenokarzinomen zusammensetzt, als Karzinoma in situ Stadien zu diagnostizierende Neoplasien mit basaloider Zellmorphologie. Die intraluminalen neoplastischen Proliferationen sind von solider Struktur, weisen jedoch Spaltbildungen und bandartige Formationen durch doppelreihig palisadenartig angeordnete Tumorzellen auf, die Charakteristika maligner Zellen zeigen. Es sind Anisonukleosen, Hyper- und Hypochromatosen, prominente und multiple Nukleoli sowie Anisozytosen zu beobachten. In den immunhistochemischen Untersuchungen mit den Antikörpern AE1 und LP34 bestätigt sich - durch die positiven Reaktionen - der epitheliale Ursprung der basaloiden neoplastischen Zellen. Die Befundung eines nicht infiltrierenden Karzinoms wird durch die Darstellung einer in ihrer Kontinuität vollständig ausgebildeten Myoepithelschicht an den Veränderungen durch den Einsatz der Antikörper CK14, p63 und sogar HNF35 verifiziert. Ebenfalls kann in der PAS-Färbung die Kontinuität der Basalmembranen gezeigt werden. Eine Voraussage, welcher Prozentsatz dieser Karzinoma in situ Stadien sich progressiv zu invasiven Karzinomen weiterentwickelt, in diesem Stadium verbleibt oder wieder verschwindet, kann nicht getroffen werden (MISDORP 2002).

In den Fällen 17 und 18 sind neben den epithelialen und duktalem Hyperplasien und im Fall 12 neben den soliden Adenokarzinomen ebenfalls Karzinoma in situ Stadien in der HE-Färbung zu befunden. Einheitlich sind die den epithelialen Ursprung bestätigenden positiven Reaktionen der Tumorzellen aller drei Fälle mit den Antikörpern AE1 und LP34. Während im Fall 17 und 18 in den immunhistochemischen Färbungen mittels der Marker CK14 und p63 jeweils eine vollständig ausgebildete myoepitheliale Schicht darzustellen ist, zeigt sich diese Myoepithelschicht an den neoplastischen Veränderungen in der Gewebeprobe des Falls 12 als fehlend. Somit verifiziert die Immunhistochemie im Fall 17 und 18 die in der HE-Färbung erhobene Diagnose des Karzinoma in situ und zeigt im Fall 12, dass es sich bei den vorliegenden neoplastischen Veränderungen bereits um invasive Karzinome handelt, die aufgrund ihrer höheren Malignität mit einer schlechteren Prognose behaftet sind (s. auch Punkt 4.3.4.2.3. für den Fall 12).

#### 4.3.4.2.2. Tubulopapilläre Karzinome

Fall 09 zeigt die spezielle Variante eines papillär-zystischen Karzinoms. Unerwartete Metastasierung von hoch differenzierten papillär-zystischen Karzinomen wurde von MISDORP et al. (1974) berichtet. Im vorliegenden Fall 09 waren zwei Lymphknoten zur Untersuchung mit eingesandt. In der HE-Färbung zeigten sie sich als hyperplastisch, wiesen eine Sinuszellproliferation mit Erythrophagozytose und Hämosiderose auf, jedoch keine Metastasenbildung. Mit Hilfe der Immunfärbungen konnten ebenfalls keine neoplastischen Zellen in den Lymphknoten detektiert werden. Die immunhistochemischen Untersuchungen des Karzinoms bestätigten einerseits den epithelialen Ursprung der Neoplasie (AE1 und LP34: positiv) und verifizierten andererseits die in der WHO-Klassifikation erfolgte Zuordnung der papillär-zystischen Karzinome zu den einfachen Karzinomen.

Die Gewebeveränderung im Fall 07 ist durch eine zarte Kapsel begrenzt und muss aufgrund ihres lokal invasiven Wachstums und die in kleinen Arealen zu beobachtenden Zellpleomorphien in ihrer Gesamtheit als tubuläres Adenokarzinom befundet werden. Interessanterweise setzt sich der Tumor jedoch aus drei fließend ineinander übergehenden Arealen zusammen, welche einerseits reine Drüsenhyperplasien, andererseits karzinomatöse Strukturen mit überwiegender Ausbildung von tubulären Formationen, aber auch soliden Anteilen zeigen. Ein weiterer Bezirk zwischen diesen Arealen weist Charakteristika auf, die an die der basaloiden Adenome erinnern. Die Immunfärbungen zeigen den epithelialen Ursprung der Neoplasie und ihre Einordnung zu den einfachen Karzinomen. Eine Aussage zur Frage, ob es sich in diesem Fall um eine maligne Transition oder eine Koexistenz der verschiedenen Gewebeveränderungen handelt, können nur spekulativ getroffen werden. In diesem Fall könnte eine Transition vermutet werden.

Die Neoplasie des Falls 04 zeigt in der HE-Färbung ein außergewöhnliches Bild: diffus vermehrte basaloide Zellen beherrschen das gesamte Bild, vereinzelt sind adenoide Strukturen erkennbar. Der Stromaanteil zeigt sich als gering. Die neoplastischen Zellen sind uniform, weisen keine Mitosen auf, scheinen aber invasiv die Drüsenendstücke auseinander zu drängen.

In der PAS-Färbung wird der Verdacht des infiltrativen Wachstums bestätigt. Im überwiegenden Anteil der Neoplasie fehlen Basalmembranen, nur in vereinzelt Bereichen können Reste von ihnen dargestellt werden.

Die immunhistochemischen Ergebnisse der Antikörper AE1 und LP34 zeigen den epithelialen Ursprung der Neoplasie durch die positive Reaktion aller neoplastischen Zellen. An den drüsig differenzierten Strukturen ist in der AE1-Färbung eine Anfärbung stärkerer Intensität zu beobachten, wodurch die vereinzelt fokal zu beobachtenden hyperplastischen Drüsenepithelien erkennbar werden, die in der HE-Färbung nicht deutlich zu differenzieren sind. Die den größten Anteil der Neoplasie darstellenden dominierenden basaloiden, epitheloiden Zellen reagierten mit den Antikörpern CK14 und p63 positiv. In diesen Spezialfärbungen wird ihre Lokalisation, dem Drüsenepithel direkt anliegend, dargestellt.

Von hier aus breiten sich diese neoplastischen Zellen, die Drüsenendstücke auseinanderdrängend, aus. Der in der Routinediagnostik erhobene Befund eines in das Mammaparenchym eingewachsenen Basalzellentumors der Haut ist deutlich widerlegt. Es handelt sich um ein Myoepithelkarzinom, welches entartete Myoepithelzellen mit basaloider epitheloider Morphologie aufweist.

Das in der HE-Färbung zu beobachtende und anhand der Immunfärbungen deutlich dargestellte stark infiltrative Wachstum des Myoepithelkarzinoms scheint die von GRIFFEY et al. (1993) geäußerte Vermutung zu bestätigen, dass canine Myoepithelkarzinome, analog denen des Menschen, mit einer schlechten Prognose einhergehen.

#### **4.3.4.2.3. Solides Karzinom**

Eine ausgeprägte primäre Multiplizität ist im Fall 12 zu beobachten. Multifokal sind solide Karzinome unterschiedlicher Größen ausgebildet, von denen die größeren Tumoren bereits zentrale Nekrosen aufgrund ihrer Diffusionsinsuffizienz zeigen und als Komedokarzinome zu bezeichnen sind. Im umgebenden Mammagewebe zeigen sich außerordentlich viele Stadien der Neoplasieentwicklung, teils mit Konfluationstendenzen, teils als Karzinoma in situ Stadien. Auffällig ist die basaloide Zellmorphologie, die allen Gewebeeränderungen zu eigen ist. Anisonukleosen, prominente und auch multiple Nukleoli, sowie Hyper- und Hypochromatosen sind in einigen Bereichen zu beobachten. Die in der HE-Färbung vermutete Invasivität stellt sich in der PAS gefärbten Gewebeprobe durch diskontinuierlich ausgebildete bzw. fehlende Basalmembranen dar. Ebenso bestätigend zeigen sich die Resultate der p63 Immunfärbung: nur an sehr wenigen, kleinen Neoplasien und sehr selten an den größeren Tumoren sind vereinzelte Myoepithelzellen darstellbar. Anhand der p63 Diagnostik sind somit infiltrierende Karzinome zu befunden, wobei die mikroskopisch kleineren Karzinome das Karzinoma in situ-Stadium bereits hinter sich gelassen haben. Zudem verifiziert sie die in der CK14 Färbung sich darstellende Neoexpression des Zytokeratins CK14 der entarteten Drüsenepithelien. Alle neoplastischen Zellen zeigen mit diesem Antikörper eine ausgeprägte positive Immunreaktion, ein Phänomen, welches, wie schon unter Punkt 4.3.2.2. aufgeführt, in der Veterinärmedizin und auch in der Humanmedizin bereits beobachtet wurde. Erklärungen werden zum einen in einem „Neuerwerb“ der basal/myoepithelial-typischer Zytokeratine durch die luminalen, sekretorischen Zellen (GUSTERSON et al. 1982) oder zum anderen als Resultat der Selektion eines spezifischen Zelltyps gesehen (MOLL et al. 1983). Da im vorliegenden Fall mittels der p63 Färbung myoepitheliale Zellen von den neoplastischen Zellen differenziert werden können, scheint es sich um eine Neoexpression zu handeln. Ob eine Neoexpression des Zytokeratins CK14 epithelialer Karzinomzellen als Indikator eines Malignitätsgrades verwendbar ist (eine Spekulation, die von VOS et al. (1993b) aufgeworfen wurde) bedarf weiterer Untersuchungen. In der Humanmedizin wurde bereits darauf hingewiesen, dass die Malignität bestimmter Neoplasien mit dem Auftauchen bestimmter Zytokeratine korreliert: Die Expression einfacher Zytokeratine scheint zu verstärkter Zellbewegung und Gefäßeinbrüchen zu führen (CHU et al. 1993).

#### 4.3.4.2.4. Squamöse Karzinome (Plattenepithelkarzinome)

In der vorliegenden Studie waren in der HE-Diagnostik 5 Fälle (01, 05, 06, 19 und 21) als adenosquamöse Karzinome sowie ein weiterer als squamöses Karzinom (Fall 10) zu befunden. Die von MISDORP et al. (1973) erwähnte, entweder in einer Neoplasie oder in verschiedenen Plattenepithelkarzinomen vergleichend auftretende, beträchtliche Variation des histologischen Bildes zeigte sich ebenfalls in vorliegend untersuchter Gruppe.

Fall 01, 05 und 19 erinnern in ihren histologischen Charakteristika, mit Ausnahme des infiltrativen Wachstums und der in kleinen Arealen ausgeprägten Differenzierungsabnahme, an die der basaloide Adenome: im Fall 01 und 19 an den Typ des basaloiden Adenoms welche die auch von nach KWAPIEN et al (1977), ESPLIN (1984) und DE LAS MULAS et al. (2002) angesprochenen Analogien in ihrer histomorphologischen Erscheinung zu den ehemals als Basalzelltumoren der Haut bezeichneten Neoplasien aufweisen, während der Fall 05 an die basaloiden Adenome denken lässt, die in ihrer histologischen Struktur den Syringadenome des Menschen ähneln.

Im Fall 06 sind überwiegend solide Strukturen ausgebildet und nur fokal sind tubuläre Differenzierungen zu beobachten. Auffällig sind die großen, zystisch erweiterten, mit Keratin gefüllten Hohlräume. In seinem Gesamtbild ähnelt er den nach SANDERSLEBEN (1989) bezeichneten keratotischen Basalzelltumoren. Fall 11 zeichnet sich durch solide Formationen mit kleinen fokalen keratotischen Herden aus.

Auffällige bandartige Strukturen, aus meist zwei Zellschichten palisadenartig angeordnetetn basaloiden Zellen prägen im Fall 21 in weiten Teilen das Gesamtbild der multilobulären Neoplasie. In Arealen sind ebenfalls fokal drüsige Differenzierungen und auch squamöse Metaplasien zu beobachten, sowie solide Formationen, die durch lumenfüllende Proliferationen entstanden sind.

In allen diesen Fällen erscheint die Keratinisierung abrupt, eine Schicht Keratohyalin granula enthaltener Zellen ist nicht festzustellen. Dies deckt sich mit den Untersuchungen von HAMPE und MISDORP (1974). In wenigen Fällen sind deutliche Keratinlamellen ausgebildet, in anderen nur angedeutet. Fall 21 zeigt in einigen keratotischen Bezirken Schattenzellen sowie eine Kalzifizierungsneigung. Die keratotischen Herde konnten in allen Fällen durch die CK14 Färbung in unterschiedlicher Intensität der Anfärbung und in 2 Fällen auch durch den Antikörper HHF35 dargestellt werden. Reichlich ausgebildetes Stroma, wie von MISDORP et al. (1973) in einigen untersuchten Karzinomen beobachtet wurde, zeigte nur der Fall 06. Das infiltrative Wachstum in die sie umgebende Kapsel, das mit Diskontinuitäten der durch die PAS-Färbung dargestellten Basalmembran einhergehen kann, zeigen die Fälle 01, 05, 10 und 19, während Fall 06 und 21 durch eine auffälligere Invasivität auffallen und so mit stärker ausgeprägten Diskontinuitäten einhergehen. Abgesehen von Zellpleomorphien, die meist fokal auf Areale des Tumors beschränkt sind, ist allen Neoplasien ein auffälliges basaloides Zellbild gemeinsam. Von Plattenepithelkarzinomen der Haut und ihrer Adenexe sowie einer Metaplasie des den Zitzenkanals auskleidenden Epithels sind sie eindeutig abzugrenzen.

Die immunhistochemischen Ergebnisse der Antikörper AE1 und LP34 verifizieren den epithelialen Ursprung der Plattenepithelkarzinome. Aufgrund der Resultate der Spezialfärbungen mittels der Antikörper CK14 und p63 sind drei adenosquamöse Karzinome (Fall 01, 05 und 19), sowie ein squamöses Karzinom vom einfachen Typ zu diagnostizieren. Die Fälle 06 und 21 stellen sich erstaunlicherweise als komplexe adenosquamöse Karzinome dar, zeigen den in der HE-Färbung nicht zu vermutenden, basaloiden Phänotyp myoepithelialer Zellen und können so die Vermutung von HAMPE und MISDORP (1974) bestätigen, dass Plattenepithelkarzinome nicht wie in der Literatur beschrieben nur vom einfachen Typ, sondern auch als komplexe Neoplasien vorkommen können.

Zudem sind durch die Resultate der p63-Färbung im Fall 01 eine assoziierte Hyperplasie des Myoepithels, sowie im Fall 10 eine Neoexpression des Zytokeratins 14 von einigen verstreut im Tumor lokalisierten neoplastisch entarteten Drüsenepithelien zu befunden. Die im Fall 19 in dieser Färbung zu beobachtenden vereinzelt fokalen positiven Herde sind eher als Tangentialschnitte, denn als eine assoziierte myoepitheliale Hyperplasie zu bewerten.

Der mit eingesandte Lymphknoten im Fall 05 zeigt sich auch in den immunhistochemischen Untersuchungen als metastasenfrei.

Besonderes Augenmerk ist auf den Fall 01 und auch 19 zu richten, da sie eine weitere Variante zeigen, über die MISDORP (2002) bereits berichtete: ein Karzinom, welches in weiten Teilen einem basaloiden Adenom ähnelt, jedoch invasive Eigenschaften aufweist.

#### **4.3.4.3. Mammäre Hyperplasien basaloider Morphologie**

In die Untersuchungen wurden 6 Fälle miteinbezogen, die in der HE-Färbung multifokal reguläre epitheliale und duktale Hyperplasien von basaloider Zellmorphologie aufweisen.

In allen Fällen (02, 13, 14, 16, 17 und 18) sind sowohl multifokal reguläre epitheliale, als auch duktale Hyperplasien im HE-Bild zu befunden, welche aufgrund ihrer Wuchsform als Epitheliosis zu bezeichnen sind. Auffällig ist die Uniformität der basaloiden Zellen, die weder Zell- oder Zellkernatypien, noch Mitosen aufweisen, sowie die oftmals zu beobachtende histologische Struktur der Hyperplasien, welche im Gesamtbild als solide zu beurteilen ist, aber durch palisadenartige, doppelreihige Anordnung der basaloiden Zellen bandartige Strukturen mit Spaltbildungen ausbildet. Lobuläre Hyperplasien zeigen oft eine palisadenartige Ausrichtung der peripheren Zellen.

Abweichend von dem beherrschenden monomorphen Zellbild zeigt Fall 17 an einigen Gewebeveränderungen in kleinen Arealen hyperchromatische Nuklei mit prominenten Nukleoli, und im Fall 18 sind in einzelnen dukталen Hyperplasien sehr vereinzelt Zellpleomorphien zu beobachten. Da sich jedoch die überwiegende Anzahl der hyperplastischen Zellen durch ihre Uniformität eines basaloiden Zellbildes, mit ovoiden

Zellkernen, umgeben von wenig Zytoplasma auszeichnet, ist von der Diagnose einer atypischen duktaalen Hyperplasie Abstand zu nehmen.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie betrachtend, zeigt sich in allen Fällen die epitheliale Natur der hyperplastischen Zellen durch ihre positive Immunreaktivität mit den Antikörpern AE1 und LP34.

Es ist anzumerken, dass mit Ausnahme des Falls 14 die beschriebenen Gewebeveränderungen in allen Fällen in Vergesellschaftung mit Adenokarzinomen vorkommen: im Fall 16 und 18 sind multifokal in der Peripherie gut abgegrenzte Adenokarzinome zu finden, welche Knorpelgewebestrukturen aufweisen. Zudem sind im Fall 18 Karzinoma in situ Stadien diagnostizierbar. In den Fällen 02, 13 und 17 zeigen sich mehrere, aber auf ein Areal beschränkte Adenokarzinome mit Knorpelgewebsstrukturen. Eine generelle Proliferations-tendenz ist durch das multifokale Auftreten festzustellen. Inwiefern hormonelle Stimuli im Rahmen des normalen Sexualzyklus für die zu beobachtenden Hyperplasien eine Rolle spielten, ist aufgrund der fehlenden Kenntnis des Zyklusstand, bzw. erfolgter Kastrationen bei den untersuchten Hündinnen leider nicht zu ermitteln und zu beurteilen.

Während mittels der CK14, jedoch vor allem der p63 Färbung, in 4 Fällen (13, 14, 16, 18) in ihrer Kontinuität vollständige myoepitheliale Schichten an den basaloiden Hyperplasien darstellbar sind, zeigen 2 Fälle (02, 17) einerseits fehlende myoepitheliale Schichten an den lobulären und teils auch duktaalen Hyperplasien, sowie andererseits nur abschnittsweise ausgebildete Myoepithelschichten, so dass über größere Bereiche die Epithelien direkt an das Stroma grenzen. Die Ansicht, dass die myoepitheliale Schicht in benignen proliferativen mammären Veränderungen und im Karzinoma in situ intakt erhalten bleibt, ist, wie unter Punkt 4.2 bereits beschrieben, weit verbreitet (AHMED 1974; BUSSOLATI 1980, 1981; GOULD et al. 1980; GUSTERSON et al. 1982; VOS et al. 1993b). Die Abwesenheit der myoepithelialen Schicht wird von YZIJII et al. (2000) als Kennzeichen invasiver Karzinome beschrieben. Auch MISDORP (2002) sieht in einer sichtbaren Myoepithelschicht an mammären Hyperplasien ein Kennzeichen der Benignität der Gewebeveränderung. Somit ist in den hier untersuchten Fällen (02, 17) die Möglichkeit einer Invasivität dieser, in ihrer Zellmorphologie eigentlich benigne Charakteristika aufweisenden, basaloiden Gewebeveränderungen vermutbar.

#### **4.3.4.4. Grenzfälle**

Die unter diesem Punkt als „Grenzfälle“ aufgeführten untersuchten Gewebeproben betreffen die in der HE-Färbung als Basalzellkarzinome befundeten Neoplasien. Sie sind aufgrund der immunhistochemischen Befunde Grenzfälle, d.h. nicht eindeutig anhand der immunhistochemischen Untersuchungen histogenetisch zuordnungsbar Neoplasien basaloider Zellmorphologie.

Der Fall 08 stellt sich in der HE-Färbung als ein nach der novellierten WHO-Klassifikation von GOLDSCHMIDT et al. (1998) im Mammagewebe lokalisiertes Basalzellkarzinom vom Clear-Cell-Typ dar, welches von einer unterschiedlich stark ausgeprägten Kapsel vom

Mammaparenchym und der darüber liegenden Haut abgegrenzt ist. Ein infiltratives Wachstum in die Kapsel ist an einigen Lokalisationen ersichtlich. Eine Verbindung zur darüber liegenden Haut ist im Gewebeschnitt nicht kenntlich. Dies deckt sich mit der Beschreibung der Autoren der Klassifikation, dass im Gegensatz zum infiltrativem Typ meist keine Assoziation mit der Epidermis beim Clear-Cell-Typ nachzuweisen ist. In weiten Abschnitten ist zwischen der Neoplasie und der Epidermis mammäres Parenchym zu beobachten. Der Bindegewebsanteil innerhalb der Neoplasie zeigt sich als deutlich vermehrt, ein nach GOLDSCHMIDT et al. (1998) oft zu beobachtendes histologisches Merkmal dieses Karzinomtyps. Die Immunfärbungen mittels der Antikörper AE1 und LP34 zeigen aufgrund ihrer positiven Resultate aller neoplastischen Zellen den epithelialen Ursprung dieses Karzinoms. Mit den Antikörpern CK14 und p63 reagieren die den Tumor bildenden Zellen ebenfalls einheitlich positiv. Somit könnten die Resultate der Immunfärbungen die in der HE-Färbung gestellte Diagnose eines Basalzellkarzinoms untermauern. Es muss jedoch der Antikörperspezifität der Marker CK14 und p63 gedacht werden, die nicht nur Basalzellen der Epidermis, sondern auch die myoepithelialen Zellen des Mammaparenchyms darstellen.

Die Möglichkeit des Vorliegens eines Myoepithelkarzinoms im Fall 08 wäre aufgrund der Resultate aller Immunfärbungen gegeben. Die Zellmorphologie des Myoepithels wird in der Literatur als vielgestaltig beschrieben (GUTBERLET et al. 1998) und zeigt sich auch in den in dieser Studie untersuchten Fällen als durchaus variabel. Die Möglichkeit, dass neoplastisch entartete Myoepithelzellen im histologischen Bild den zu beobachtenden Phänotyp zeigen können und auch die resultierende histologische Struktur aufweisen, ist somit nicht auszuschließen.

In diesem Fall kann aufgrund des vorliegenden, nicht verlässlichen, negativen Färbeergebnisses des Antikörpers HHF35 keine sichere Befundung der Neoplasie getroffen werden. Aufgrund der negativen Immunreaktivität des HHF35 Markers in drei Viertel der 12 ausgewerteten Proben des pathologisch unveränderten Mammagewebes muss seine Spezifität in Bezug auf canine basale/myoepitheliale Zellen in Frage gestellt werden, und die Ergebnisse der Immunfärbungen werden daher in den Fällen 03 und 08 zur Diagnostik nicht herangezogen.

Anhand eines den kontraktile Phänotyp des caninen Myoepithels verlässlich darstellenden Antikörpers wäre eine Differenzierung bei positiver Immunreaktivität der neoplastischen Zellen als Myoepithelkarzinom und beim Vorliegen negativer Resultate als Basalzellkarzinom möglich. Leider scheint dem hier verwendeten Antikörper HHF 35, wie unter Punkt 4.3.2.2. dargestellt, die notwendige Spezifität zu fehlen.

Eine Abgrenzung der beiden möglichen Diagnosen ist aufgrund ihrer stark divergierenden Prognosen von Relevanz. Während das Basalzellkarzinom als ein geringgradig maligner Tumor eingestuft wird und Fälle von Metastasierung bis heute nur bei der Katze in wenigen Fällen beobachtet wurden (GOLDSCHMIDT 2002), ist das Myoepithelkarzinom mit einer weitaus schlechteren Prognose behaftet. In der follow up Studie von GRIFFEY et al. (1993) zeigten die 4 untersuchten Fälle innerhalb von 2 Wochen bis 6 Monaten lokale Rezidive oder Fernmetastasen und die Autoren vermuten, auf die Studien von DAIRKEE et al. (1987)

verweisend, eine ähnlich schlechte Prognose des caninen Myoepithelkarzinoms, wie sie für den Menschen besteht.

In der HE-gefärbten Gewebeprobe des Falles 03 ist das typische Bild eines Basalzellkarzinoms vom infiltrativen Typ zu beobachten, welches in das Mammaparenchym einzuwachsen scheint. Eine deutliche Bindegewebshyperplasie als Antwort auf das invasive Wachstum der Neoplasie ist zu beobachten. Die immunhistochemischen Ergebnisse stimmen mit den Resultaten des Falles 08 weitestgehend überein.

Von den Aspekten der Resultate der Immunfärbungen ausgehend, bietet sich auch in diesem Fall die Möglichkeit, ein Basalzellkarzinom oder ein Myoepithelkarzinom zu befunden, da auch in diesem Fall das dritte Färbeergebnis, die Myoepithelzelle spezifizierend, bzw. Basalzelle verifizierend, nicht verlässlich ist. Unter Einbeziehung der in der HE-Färbung zu beobachtenden histologischen Struktur, Lokalisation des Tumors sowie dessen beginnender Infiltration ins Mammaparenchym erscheint jedoch die Diagnose des Basalzellkarzinoms für diese Neoplasie auch bei dargestellten Problemen der Bewertung der immunhistochemischen Ergebnisse als nahe liegend.

#### **4.4.5. Abschließende Bewertung und Ausblick**

In der vorliegenden Studie konnte in mehr als der Hälfte der Fälle mittels der immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern CK14 und p63 der in der HE-Färbung nicht zu vermutende basaloide, epitheloide Phänotyp myoepithelialer Zellen gezeigt werden. Diese Erscheinungsform ist bis jetzt in der Literatur noch nicht explizit beschrieben worden. Da in der Routinediagnostik weitgehend herkömmliche HE-Färbungen der zu untersuchenden Gewebeprobe angefertigt und ausgewertet werden, bedarf es einer genauen Kenntnis der möglichen Phänotypen eines Zelltyps. Die Myoepithelien wurden von PULLEY (1973) als lichtmikroskopisch in der HE-Färbung nicht immer sicher identifizierbar beschrieben und GUTBERLET et al. (1998) sehen die Schwierigkeit der Beurteilung dieser Zellart in ihrer Vielgestaltigkeit und schweren Abgrenzbarkeit zu Fibroblasten und Fibrozyten. Bei epithelzellähnlicher Morphologie dieser Zellart, wie es in den Untersuchungen gezeigt werden konnte, besteht jedoch in der HE-Färbung die Gefahr ihrer falschen Zuordnung als den Drüsenepithelien zugehörend, welches in einer Fehldiagnose der vorliegenden Neoplasie resultiert. Für die Klassifizierung von Tumoren ist die Kenntnis ihrer Histogenese entscheidend, um den Tumortyp der vorliegenden Neoplasie ermitteln zu können, der nach KURZMANN et al. (1986) als Schlüsselkennzeichen für prognostische Evaluierungen anzusehen ist.

Weitere Untersuchungen zum besseren abschätzen der Häufigkeit des Vorkommens dieses epithelzellähnlichen, basaloiden Phänotyps des Myoepithels sind erforderlich, um seine Bedeutung für eine Fehldiagnostik in der Befundung in der HE-Färbung beurteilen zu können.

Die in dieser Studie dargestellten Untersuchungen sind in ihrem Wesen qualitativer Art und beschränken sich auf eine definierte Anzahl von Fällen, anhand welcher keine statistische Aussagen getroffen werden können. Die untersuchten Fälle wurden anhand ihres histomorphologischen Erscheinungsbildes ausgesucht, und die interessante in verschiedenen Tumortypen und Hyperplasien zu beobachtende Gemeinsamkeit liegt in der auffälligen basaloiden Zellmorphologie sowie ihrer histologischen Struktur, die sich in palisadenartigen oder bandartigen Formationen zeigt.

Die vergleichende Betrachtung der Diagnostik der HE-gefärbten Gewebeproben und der immunhistochemischen Resultate lässt eine genauere Klassifizierung aufgrund der gewonnen histogenetischen Erkenntnisse zu. Die Identifizierung des Myoepithels ist nicht nur allein für die reine Klassifizierbarkeit von Bedeutung, sondern für die mit dieser einhergehenden Abschätzbarkeit prognostischer und therapeutischer Aussagen. So kann man grundsätzlich sagen, dass komplexe epitheliale Mammatumoren weniger häufig malignes Verhalten zeigen als die einfachen (DAHME und WEISS 1999). Dies betrifft die in dieser Studie ermittelten komplexen Typen der Tumoren, der adenosquamösen Karzinome, Fall 06 und 21 und das Adenom, Fall 22, welches nun nicht mehr in die von MOULTON (1990) beschriebene Kategorie der einfachen Adenome einzuordnen ist, die nach Auffassung des genannten Autors ein präkanzeröses Stadium darstellen könnten. Ebenfalls konnte im Fall 01 mittels der Immunfärbung eine, in der HE-Färbung aufgrund der einheitlichen Morphologie der neoplastischen Zellen nicht zu vermutende, assoziierte Hyperplasie myoepithelialer Zellen gezeigt werden, welche sich nach GUTBERLET et al. (1998) ebenfalls günstig auf die Prognose auswirken soll.

Im Gegensatz dazu erscheinen maligne Neoplasien des Myoepithels (Myoepithelkarzinome) im Vergleich zu Karzinomen des Drüsenepithels mit einer signifikant schlechteren Prognose einherzugehen (GRIFFEY et al. 1993). In der vorliegenden Studie betrifft dies den Fall 04, der sich in der HE-Färbung als ein tubuläres Adenokarzinom zeigte. Die Immunhistochemie verifiziert jedoch auch in diesem Fall das Vorliegen entarteter Myoepithelzellen mit basaloider, epithelzellähnlicher Gestalt. Die weiteren Fälle (08 und 03), die sich in den Spezialfärbungen ebenfalls durch einheitlich p63- und CK14-positiv reagierende neoplastische Zellen auszeichnen, sind aufgrund des am caninen Gewebe nicht verlässlich Myoepithelzellen markierenden Markers HHF35 nicht differenziert zu diagnostizieren. Aufgrund der dualen Spezifität der genannten Antikörper kommt die Diagnose eines in Mammagewebe gewachsenen Basalzellkarzinoms, jedoch auch die eines Myoepithelkarzinoms in Betracht. Im Gegensatz zum Fall 04, in dem der Ursprung der Neoplasie im histologischen Bild eindeutig im Mammaparenchym zu verifizieren ist, bergen diese Fälle Schwierigkeiten in der Zuordnung anhand deskriptiver histologischer Kriterien. Konträr zum Fall 03, bei dem ein Einwachsen des Tumors von der Epidermis her vermutet werden kann, da im histologischen Bild weite Teile des Tumors (ohne Verbindung) unter der Haut lokalisiert sind, und die beginnende Infiltration des Tumors ins daruntergelegende Mammaparenchym zu beobachten ist, ist die Neoplasie im Fall 08 inmitten des Mammagewebes lokalisiert, und zwischen ihr und der darüberliegenden Haut befinden sich noch weite Areale des Parenchyms

der Mamma. Dies kann rein schnittbedingt sein und ist für die Interpretationen nicht heranzuziehen. Der Einsatz eines den kontraktilen Phänotyp der caninen Myoepithelzellen verlässlich darstellenden Antikörpers würde bei positiver Reaktion eine sichere Diagnose eines Myoepithelkarzinoms gewährleisten. Bei negativer Immunreaktivität wäre die Neoplasie nach heutigem Wissensstand als Basalzellkarzinom zu diagnostizieren.

Überlegungen bezüglich des Vorliegens eines Stammzelltumors könnten aufgrund der durchweg positiven Immunreaktivität der neoplastischen Zellen mit dem Antikörper p63 spekulativ getroffen werden. Die p63-Immunreaktivität ist in adulten Epithelien normalerweise auf Vorläuferzellen beschränkt, so dass der Nachweis des nukleären p63-Proteins im Zellkern der Myoepithelzellen ähnliche Funktionen dieses Zelltyps suggeriert. Wie unter Punkt 4.3.2. bereits dargestellt, vermuten auch BARBARESCHI et al. (2001), dass das myoepitheliale Kompartiment Stamm- bzw. Vorläuferzellen, welche eine analoge Rolle wie die Basalzellen der Haut, Prostata und anderer Organe spielen, enthält. Nach BOECKER und BURGER (2003) ist die Existenz von adulten Stamm- oder Vorläuferzellen in der Humanmedizin bereits durch experimentelle Daten bestätigt, und das Bestreben besteht darin, die Charakteristika dieser Zellen genauer zu differenzieren. Spekulativ, unter der Annahme einer den Reservezellen der Epidermis gleichenden Zellmorphologie der mammären Stammzellen könnten diese Vorläuferzellen der Mamma bei neoplastischer Entartung ein dem Basalzelltumor bzw. Basalzellkarzinom der Haut gleichendes histologisches Bild präsentieren. Diese hypothetischen Überlegungen werden durch das Wissen gestützt, dass die Milchdrüse zum einen ektodermalen Ursprungs ist und eine modifizierte Schweißdrüse darstellt.

Im Gegensatz zu der vorab dargestellten Spekulation, dass unter der Annahme der Existenz caniner mammärer Stammzellen diese bei Entartung Neoplasien analog denen der entarteten Reservezellen der Haut ausbilden, stehen die Überlegungen und die Forschung von HELLMÉN (1992), welche sich im Kernpunkt mit der Rolle der Stammzellen in der Tumorgenese verschiedener caniner Tumortypen beschäftigt, da sie einen Stammzellursprung für die meisten caninen Mammatumoren vermutet. Die Resultate der Charakterisierung der von ihr in vitro etablierten Zelllinien von caninen Mammtumoren (HELLMÉN 1992; HELLMÉN et al. 2000) indizieren ihrer Meinung nach die Existenz von Stammzellen der caninen Mamma, die im Epithel lokalisiert sein sollen und in epitheliale und myoepitheliale Zellen differenzieren können, bzw. die sich in der Tumorgenese in verschiedene Phänotypen entwickeln. Im Falle 22 der vorliegenden Studie erscheinen diese von HELLMÉN (1992) aufgestellten Vermutungen eine Möglichkeit des Erklärungsansatzes für die sich in der p63-Färbung zeigende außergewöhnliche histologische Struktur des Adenoms zu sein.

MISDORP (2002) sieht eine Möglichkeit, sich auf HELLMÉN (1992) und IVANYI et al. (1993) beziehend, dass sowohl canine als auch feline und auch Karzinome des Menschen sich in ihrem Ursprung auf Stammzellen zurückführen lassen, welche er allerdings in den sogenannten „terminalen ductulobulären Einheiten“ lokalisiert sieht. Ähnliche Aussagen, den Ursprung der mammären Dysplasien und tumorösen Veränderungen der Mamma von den Stammzellen in diesen terminalen ductulobulären Einheiten ausgehend betreffend,

beschrieben MISDORP et al. bereits im Jahr 1999 im Rahmen der WHO-Klassifikation. Zur Verifizierung dieser These sind weitergehende Untersuchungen wünschenswert, da sie zur Klärung entscheidender Fragen beitragen würden. So wird die Herkunft des Knochen- und Knorpelgewebes in caninen Mammatumoren diskutiert, für die Metaplasien des Epithels (MONLUX et al. 1977), der mesenchymalen Zellen (DESTEXHE et al. 1993) und der Myoepithelzellen (PULLEY 1973; TATEYAMA und COTCHIN 1977) verantwortlich gemacht werden. MISDORP (2002) hält einen Ursprung von mammären Stammzellen ebenfalls für möglich. Der Nachweis, dass verschiedene Mammatumoren aus entarteten Stammzellen bestehen, würde das jetzige histogenetische Denken revolutionieren, da so zum Beispiel in einem komplexen Tumor der myoepitheliale Anteil nicht entartete Myoepithelzellen darstellt, sondern entartete Stammzellen, die sich während der Tumorgenese zum Phänotyp der myoepithelialen Zelle entwickelt haben.

Das Vorliegen einer Stammzellproliferation vermuteten DE LAS MULAS et al. (2002) für die von ihnen immunhistochemisch untersuchten Fälle vierer basaloider Adenome, deren Zellen eine einheitliche positive Reaktion mit dem Antikörper CK14 zeigten. Diese Resultate stehen nicht im Einklang mit den in dieser Studie zu erhebenden Befunde. Die basaloiden Adenome der Fälle 11 und 20 konnten aufgrund der Resultate der Immunfärbungen den einfachen Adenomen zugeordnet werden, da ihre neoplastischen Zellen als entartete Drüsenepithelien zu differenzieren sind. Die basaloiden Adenome sind zurzeit aufgrund ihres spezifischen histomorphologischen Erscheinungsbildes in der HE-Färbung als betont vorläufig in der WHO-Klassifikation in einer dritten Rubrik der Adenome geführt. Sie unterscheiden sich von den in der WHO-Klassifikation beschriebenen einfachen Adenomen durch ihre spezielle histologische Struktur der palisadenartigen Anordnung peripherer Zellen, durch ihre Eigenschaft keratotische Differenzierungen zu zeigen und durch die in dieser Studie ermittelte Histogenese, die ausschließlich auf Drüsenepithelien zurückzuführen zu sein scheint. Die einfachen Adenome sollten in der WHO-Klassifikation spezifisch unterteilt werden. Erfolgt eine Unterteilung der einfachen Adenome anhand histogenetischer Kriterien, sollten 2 Typen, die Drüsenepitheliome und die Myoepitheliome aufgeführt werden. Die basaloiden Adenome gehören aufgrund der ermittelten Histogenese der ersten Kategorie an, und sollten bei dieser Einteilung als spezielle Variante in dieser Rubrik geführt werden.

Werden sowohl die histogenetische als auch die deskriptiven histologischen Merkmale berücksichtigt bietet sich eine Einteilung in drei Subtypen an: 1. Drüsenepitheliome, 2. Myoepitheliome und 3. die basaloiden Adenome. Diese Klassifizierung würde die spezielle Morphologie zum Ausdruck bringen. Zudem bleibt anzumerken, dass die Autoren der WHO-Klassifikation in ihrer Beschreibung dieses Adenomtyps (des basaloiden Adenoms) erwähnen, dass in seltenen Fällen eine Metastasierung beobachtet wurde. Diese Tumoren kategorisiert MISDORP et al. (2002) als Karzinome mit squamöser Differenzierung.

Die Beurteilung bzw. der Nachweis, dass sich eine maligne Transformation vollzogen hat, bzw. die Bewertung einer Gewebeveränderung als präkanzeröses Stadium, ist schwierig und erfordert weitgreifende und umfassende evaluierende Studien.

Die in dieser Studie untersuchten basaloiden Gewebeveränderungen repräsentieren ein breites Spektrum an unterschiedlichen Tumortypen verschiedener Dignität, die anhand ihres histologischen Bildes in der HE-Färbung und anhand ihrer Immunreaktivität mit den verschiedenen Antikörpern aufgrund der so ermittelten deskriptiven histologischen sowie der ermittelten histogenetischen Ergebnisse klassifiziert werden konnten.

Da die histologische Untersuchung die Beschreibung des Momentanzustandes repräsentiert, können Aussagen über erfolgte maligne Transformationen oder des Vorliegens einer Transition in den Veränderungen in dieser Studie nicht getroffen, sondern nur in der Form aufgezeigt werden, dass einige folgend dargestellte interessante Beobachtungen die Forderung von MISDORP (2002) nach weiteren Untersuchungen der basaloiden Gewebeveränderungen stark bekräftigen.

Augenmerk ist zum einen auf die aus einer Gewebeprobe stammenden Fälle 19 und 20 zu richten, in welcher beide Tumoren aus uniformen basaloiden Zellen bestehen, die zentral drüsige und keratotische Differenzierungen und in der Peripherie eine palisadenartige Anordnung zeigen, sich jedoch durch das im Fall 19 zu beobachtende infiltrative Wachstum und die ebenfalls in diesem Fall festzustellenden Areale mit Differenzierungsabnahmen unterscheiden. Ist eine maligne Entartung der basaloiden Adenome zu squamösen (Adeno)karzinomen möglich, oder liegt im Fall 19 eine Koexistenz vor? HELLMÉN (1992) berichtet, sich auf eigene Beobachtungen beziehend, dass viele benigne canine Mammatumoren oft klinisch ruhig erscheinen, aber plötzlich klinische Zeichen der Malignität, wie schnelles Wachstum und Metastasierung zeigen. Als Ursache dieses Phänomens vermutet sie zugrunde liegende Genomveränderungen, die die ehemals benigne entarteten Zellen in die Malignität führen.

Ebenso zeigt sich der Tumor des Falls 01 im Gesamtbild in großen Arealen von gut differenzierter tubulärer Struktur mit palisadenartig angeordneten peripheren Zellen und zeichnet sich durch ein uniformes basaloides Erscheinungsbild seiner neoplastischen Zellen, die keine Mitosen aufweisen, aus. Zelltypen sind nur in einigen kleinen Arealen zu beobachten, die auch solide Strukturen formieren. Angrenzend zu diesen fokalen, Zellpleomorphien aufweisenden Arealen, ist das infiltrative Wachstum in die Kapsel zu beobachten. Auch hier bleibt die Frage des Vorliegens einer Transition oder Koexistenz vorerst offen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Im Fall 07 erscheint die Vermutung des Vorliegens einer Transition wahrscheinlich, da sich die Gewebeveränderung, durch eine zarte Kapsel begrenzt, aus drei fließend ineinander übergangenen Arealen zusammensetzt, wobei ein Areal Drüsenhyperplasien, ein anderes Strukturen eines tubulären Adenokarzinoms aufweist, und das zwischen diesen beiden liegende Areal zeigt Strukturen, die an die Charakteristika der basaloiden Adenome erinnern.

Die in dieser Studie untersuchten, multifokal auftretenden, regulären lobulären und duktalem Hyperplasien basaloider Morphologie lassen aufgrund der Resultate in der Immunhistochemie begründetere Vermutungen ihr biologisches Verhalten betreffend, zu. Die Immunhistochemie zeigt die epitheliale Natur der Gewebeveränderungen, jedoch auch, dass in 2 der 6

untersuchten Fälle die Myoepithelschicht an den Läsionen unvollständig ist, bzw. fehlt. Somit erscheint die Möglichkeit einer Invasivität gegeben (AHMED 1974; BUSSOLATI 1980, 1981; GOULD et al. 1980; GUSTERSON et al. 1982; VOS et al. 1993b; DUMIANI et al. 1999; MISDORP 2002), welche bei Betrachtung ihres histomorphologischen Erscheinungsbildes stark verwundert. Der Prozeß der myoepithelialen Zell-Destruktion scheint ein wichtiger, der Invasion vorangehender Schritt zu sein (BUSSOLATI et al. 1980), da die myoepithelialen Zellen Anteile der Basalmembran, Kollagen Typ IV, synthetisieren (LIOTTA et al. 1979; NERLICH et al. 1998). Die selektive Destruktion der myoepithelialen Zellen in invasiven Karzinomen resultiert in einer erniedrigten Synthese der Komponenten der Basalmembran, die die Infiltration folgend ermöglicht (BUSOLLATI et al. 1980). Bisher wurden nur die duktales Hyperplasien, die eine moderate bis markante Atypie zeigten, als präkanzeröse Veränderungen in Erwägung gezogen und sollten mit einer größeren Chance assoziiert sein, sich zu invasiven Karzinomen zu entwickeln als duktales Hyperplasien mit normotypischen Zellen (GILBERTSON et al. 1983). Weitere vergleichbare Untersuchungen werden benötigt, um die Aussagekraft dieser Befunde zu erhöhen und um das von epithelialen und duktales Hyperplasien ausgehende Risiko des Übergangs in die Invasivität, und somit der Transition zu Karzinomen, abschätzen zu können. Inwieweit die Tatsache der Vergesellschaftung dieser multifokalen Veränderungen mit Adenokarzinomen relevant ist, in Form eines multizentrischen Geschehens, bedarf ebenso weiterführender Untersuchungen.

Abschließend können aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse folgende Vorschläge zur Modifizierung der WHO-Klassifikation der Mammatumoren des Hundes getätigt werden. Eine spezifische Unterteilung der einfachen Adenome sowie eine gleichzeitige Reklassifizierung der basaloide Adenome erscheint wie unter Punkt 4.3.4.1.1. erforderlich. Des Weiteren sollte der ermittelte basaloide, epithelzellähnliche Phänotyp der caninen myoepithelialen Zelle unbedingt in den Definitionen des Myoepithelioms und Myoepithelkarzinoms, aber auch in den komplexen Typen der Karzinome, Adenome und squamösen Adenokarzinome speziell erwähnt werden. Da der beiden letztgenannte Tumortyp in der WHO-Klassifikation zur Zeit nur als einfach vorkommende Neoplasien aufgeführt sind, sollte ihre Beschreibung ergänzt werden, da in dieser Studie das Vorkommen komplexer squamöser Adenokarzinome gezeigt werden konnte.

#### **4.4. Diskussion zur Bedeutung der immunhistochemischen Ergebnisse an den als Trichoblastome reklassifizierten Basalzelltumoren**

Einerseits werden die immunhistochemischen Ergebnisse der p63-Färbung an den nach WEISS und FRESE (1974) als Basalzelltumoren bezeichneten Neoplasien und andererseits die der AE1-Färbung an caniner Haut im Hinblick auf die Reklassifizierung dieser Neoplasien als Trichoblastome im Rahmen der Novellierung der WHO-Klassifikation von GOLDSCHMIDT et al. (1998) unter Einbeziehung der von SCHNEIDER (2002) dargestellten, der Reklassifizierung zugrunde liegenden, immunhistochemischen Befunde diskutiert.

#### 4.4.1. Diagnostik in der HE-Färbung

Für die Untersuchungen wurden 10 Fälle aus dem Archiv der Veterinär-Pathologie der FU-Berlin ausgesucht, die in der HE-Färbung nach der WHO-Klassifikation von 1974 eindeutig als Basalzelltumoren zu diagnostizieren sind. Diese wurden anhand ihres histomorphologischen Erscheinungsbildes in der HE-Färbung nach der von GOLDSCHMIDT et al. (1998) novellierten WHO-Klassifikation neu befundet. Die Autoren sprechen von einer Reklassifizierung der ehemals als Basalzelltumoren bezeichneten Neoplasien als Trichoblastome, die sie ausdrücklich als immer benigne betrachten. Neben diesen definieren sie die Kriterien zur Diagnostik des Basalzelltumors und des Basalzellkarzinoms sowie des basosquamösen Karzinoms neu.

Für die Diagnostik anhand der novellierten Klassifikation müssen jedoch die Definitionen der drei letztgenannten Tumoren ebenfalls für die ehemaligen Basalzelltumoren\* genutzt werden, da eine keratotische Variante des Trichoblastoms nicht definiert wurde, und weil die Ansprechung einer Neoplasie als benigne ein infiltratives Wachstum ausschließt, welches jedoch bei einigen der untersuchten Tumoren zu beobachten ist. Das lokal infiltrative Wachstum von Basalzelltumoren ist bekannt und kann soweit gehen, dass sogar Knochengewebe zerstört wird (RUDOLPH 1999). Auch WEISS und KARBE (1990) sprechen von einem invasiven Wachstum. SCHÄFER (1967), THEILEN und MADEWELL (1987) und MAIOLINO et al. (1996) unterscheiden zwischen der malignen histologischen Erscheinung und dem gutartigen klinischen Verhalten.

So wurden Tumoren mit Tumorinseln, bzw. bandartigen Formationen (im Fall 01 ebenfalls einigen und im Fall 05 vereinzelt medusoiden Formationen) und infiltrativem Wachstum als Basalzellkarzinome vom infiltrativen Typ, keratotische Varianten als basosquamöse Karzinome und Neoplasien mit medusoider Gewebetextur unter Anmerkung des infiltrativen Wachstums als Trichoblastome klassifiziert. Fall 09 wurde aufgrund seines infiltrativen Wachstums als Basalzellkarzinom vom Clear-Cell-Typ befundet.

#### 4.4.2. Bewertung der immunhistochemischen Ergebnisse

Die immunhistochemischen Färbungen der Basalzelltumoren\* mittels des nukleären Antikörpers p63 zeigen einheitlich eine positive Darstellung aller der den Tumor bildenden neoplastischen Zellen, lediglich die Intensität der Anfärbung variiert zwischen starker Färbung (in 6 Fällen), moderat und stark angefärbten Bereichen (in 2 Fällen) und einer moderaten Anfärbung (in 2 Fällen). Somit erweist sich der Antikörper p63 auch für den Nachweis neoplastisch entarteter Basalzellen als hoch spezifisch und sensitiv.

Gemäß den unter Punkt 4.2.2. dargestellten mittels des AK p63 durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen an caniner Haut, ist ein Ursprung dieser Neoplasien von den Basalzellen der Epidermis und den Haarfollikeln möglich, wie sie bereits von

---

\* bedeutet: Basalzelltumor nach der WHO-Klassifikation von WEISS und Frese (1974)

RUDOLPH (1999), NIELSON und COLE (1960), KRAL und SCHWARTZMAN (1964), STRAFUSS (1976), CONROY (1983), THEILEN und MADEWELL (1987) und SCOTT et al. (1995) vermutet wurde. Eine Differenzierung zwischen der epidermalen Basalzelle und der des Haarfollikels ist immunhistochemisch beim jetzigen Wissens- und Entwicklungsstand der Immunhistochemie nicht möglich. Die Färbungen berechtigen zur Aussage, dass es sich um maligne transformierte, ursprünglich noch differenzierungsfähige, bzw. noch nicht determinierte Basalzellen handelt.

Die der Novellierung der WHO-Klassifikation von GOLDSCHMIDT et al. zugrunde liegenden immunhistochemischen Untersuchungen sind der Dissertationsschrift von SCHNEIDER (2002), die unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Goldschmidt arbeitete, entnehmbar. Untersucht wurden 10 als Trichoblastome diagnostizierte Tumoren mit den Antikörpern AE1/3, AE1, AE3, CK 19, CAM5.2 (CK 8) und  $\alpha$ -SMA. Die Argumentation in der Beweisführung und die Interpretation der Ergebnisse dieser Studie scheinen unstimmt und für den Nachweis der Genese der Basalzelltumoren\* von primitiven Haarkeimzellen nicht beweisend, wie im Folgenden nach der Darstellung der Argumentation von SCHNEIDER (2002) erläutert wird.

Gestützt durch die Ergebnisse der Antikörper AE1/3 und AE1, welche beide alle Varianten der Trichoblastome in unterschiedlicher Weise markierten, wird der erste Beweis gesehen, dass diese Neoplasien sich nicht von den basalen Zellen der Epidermis ableiten lassen, da diese Antikörper in ihren Vorversuchen an caniner Haut keine Färbung der Zellschichten der Epidermis bewirkten. Untermauert werden soll diese These durch die erzielten Ergebnisse in der AE3-Färbung, die in den Vorversuchen an caniner Haut nahezu alle Schichten der Epidermis (mit Ausnahme des Stratum lucidum) markierte und, die Färbungen der Trichoblastome betrachtend, die bandartigen und medusoiden Varianten homogen, die trabekulären und granularzelligen Trichoblastome heterogen darstellte. Nach SCHNEIDER (2002) hätten insgesamt mehr Zellen angefärbt sein müssen, wenn es sich um Basalzellen der Epidermis handeln würde. Des Weiteren sieht SCHNEIDER (2002) ihre These durch die Ergebnisse der Färbungen des Antikörpers CK19 gestützt, welcher in den Vorversuchen die Epidermis nicht färbte, aber eine sehr schwache Anfärbung im untersten Abschnitt der äußeren Wurzelscheide zeigte, wobei sich diese auf die keratohyalinhaltigen Zellen beschränkte (SCHNEIDER 2002). Die trabekulären und granulären Formen zeichneten sich durch negative Reaktionen mit dem Antikörper CK19 aus, dem hingegen zeigten die bandartigen Subtypen geringgradige Anfärbungen einzelner Zellen und die medusoiden eine mittelgradige Anfärbung im Inneren ihrer kompakten Zellnester, während ihre girlandenartigen Ausläufer negativ reagierten. Zusammenfassend betrachtet stützt SCHNEIDER (2002) ihre Argumentation somit zum einen auf die Tatsache, dass die Antikörper AE1/3, AE1 und CK19 in ihren Vorversuchen an caniner Haut das Stratum basale der Epidermis nicht darzustellen vermochten und somit auch keine Anfärbung mittels dieser Antikörper bei den Färbungen der Trichoblastome zu verzeichnen sein dürfte, und zum

---

\* bedeutet: Basalzelltumor nach der WHO-Klassifikation von WEISS und Frese (1974)

anderen basiert sie auf den Ergebnissen des Antikörpers AE3, welcher die Basalzellen der Epidermis darstellte und ihres Erachtens zu wenig Zellen der Trichoblastome färbte.

Folgende Punkte müssen betrachtet werden:

### 1. Die Antikörperauswahl

Für die Untersuchungen wurden u. a. 3 Antikörper ausgewählt (AE1/3, AE1 und AE3), die als Breitspektrumantikörper zu betrachten sind, da sie mehrere Zytokeratine erkennen (AE1/3; CK1-19; AE1: 10, 13,14, 15,16 und 19; AE3: CK1-8) und daher allgemein zum Nachweis genutzt werden, ob eine Neoplasie/Metastase epithelialen oder mesenchymalen Ursprungs ist. Für einen Nachweis, dass sich Basalzelltumoren\* von primitiven Haarkeimzellen ableiten, erscheinen diese Antikörper nicht spezifisch genug. Zur Führung eines sicheren immunhistochemischen Nachweises empfiehlt sich die Erstellung des spezifischen Zytokeratinprofils der Haarfollikel und vergleichend das des Stratum basales unter der Verwendung von spezifischen Zytokeratinantikörpern neben panepithelialen Markern.

In den Untersuchungen von SCHNEIDER (2002) wurde neben den beiden Antikörpern CAM5.2. (CK8) und  $\alpha$ -SMA, die für die weiteren von ihr untersuchten Hautanhangstumoren von Bedeutung sind, ein das Zytokeratin 19 nachweisender Antikörper eingesetzt, der jedoch wie aus den Vorversuchen ersichtlich, nur sehr schwache Ergebnisse an den Haarfollikeln erbrachte. Somit stellt sich für diesen Antikörper die Frage, ob er für einen spezifischen, sicheren Nachweis geeignet ist, d.h. ob er die gewünschte Spezifität besitzt. Eine ausreichende Sensitivität scheint ihm, die Ergebnisse der Vorversuche betrachtend, zu fehlen.

### 2. Darstellung der Antikörperspezifität

Die Interpretation der immunhistochemischen Untersuchungen an den Trichoblastomen stützt sich auf die Ergebnisse, die SCHNEIDER (2002) in ihren Vorversuchen ermittelte. Von 6 Hunden wurden 3-4 Proben der Oberlippe, Rückenhaut und der Ballenregion entnommen und untersucht.

In vorliegender Arbeit wurden ebenfalls immunhistochemische Untersuchungen mittels des Antikörpers AE1 an caniner Haut vorgenommen, und es konnte, abweichend von den negativen Resultaten der Vorversuche von SCHNEIDER (2002), in allen der 12 untersuchten Gewebeproben das Stratum basale der Epidermis mit diesem Antikörper dargestellt werden. Bezieht man diese Ergebnisse in die Betrachtung der Untersuchung von SCHNEIDER (2002) mit ein, entfällt ein ihre These untermauernder immunhistochemischer Nachweis. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate zeigen, dass ein Ursprung dieser als Trichoblastome reklassifizierten Neoplasien sowohl von epidermalen Basalzellen, als auch von Strukturen der Haarfollikel möglich ist.

Die Schwierigkeit der Bestimmung allgemein gültiger Aussagen zur Spezifität der verschiedenen Antikörper im caninem Gewebe ergibt sich aus der Tatsache, dass für den Hund ein Zytokeratinkatalog, analog dem des humanen von MOLL (MOLL et al. 1982;

---

\* bedeutet: Basalzelltumor nach der WHO-Klassifikation von WEISS und FRESE (1974)

MOLL et al. 1990), der um polymorphe, individuelle Variationen ergänzt werden musste (CELIS et al. 1994; KORGE et al. 1992; LOBEK et al. 1989; MISCHKE und WILD 1987), in dieser Form noch nicht existiert. Weitere Untersuchungen und Methoden zur Erforschung der caninen Zytokeratinprofile der verschiedenen epithelialen Gewebe sind äußerst wünschenswert. Untersuchungen zur Abfassung eines caninen Zytokeratinkataloges wurden von WALTER (1998) in Rahmen seiner Habilitationsschrift unternommen, dies stellt jedoch, nach Meinung des Autors, zunächst einen ersten Schritt in diese Richtung dar, da in Anbetracht der Vielzahl der verschiedenen Rassen auch beim Hund ein CK-Polymorphismus angenommen werden muss.

### 3. Die Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse

Zunächst muss die Divergenz der Aussagen der Beschreibungen der Färbeergebnisse des Antikörpers AE3 und CK19 und ihrer Interpretation in der abschließenden Bewertung betont und betrachtet werden. Der Antikörper AE3 soll in den abschließenden Aussagen von SCHNEIDER (2002) insgesamt zu wenig Zellen positiv dargelegt haben, in der Auswertung der Färbeergebnisse beschreibt sie jedoch, dass er eine ausgeprägte immunhistochemische Reaktion in nahezu allen Formen der Trichoblastomen hervorrief.

Die Resultate der CK19 Färbung werden ebenfalls zur Begründung mit herangezogen. Da dieser Antikörper in den Vorversuchen die Schichten der Epidermis nicht färbt, dürfte dieser Antikörper, nach der Interpretation von SCHNEIDER (2002), wenn es sich um neoplastische epidermale Basalzellen handelt, keine positive Reaktion an den Zellen der Trichoblastome hervorrufen, welche aber ihrer Meinung nach zu verzeichnen sind. Betrachtet man ihre Auswertung der CK19-Färbung, so ist zu sehen, dass an 2 der untersuchten Tumorformen, dem trabekulären und granulären Subtyp der Trichoblastome, keinerlei positive Reaktionen feststellbar sind. An den bandartigen Tumorformen sind einzelne Zellen geringgradig, bei den medusoiden nur im Innern einzelne Zellnester mittelgradig angefärbt, während die girlandenartigen Ausläufer durchweg negative Reaktionen zeigten.

Aufgrund der Tatsache, dass Resultate immunhistochemischer Färbungen schwierig zu interpretieren sein können, da oft eine erhebliche Variation in der Anzahl der gefärbten Zellen zu verzeichnen ist, werden im allgemeinen, wie auch von CULLEN et al. (2002) beschrieben, die Resultate als positiv bezeichnet, wenn zumindest eine geringe Anzahl von Zellen, die eindeutig als neoplastische Zellen zu identifizieren sind, eine Immunreaktivität zeigen. Somit können die CK19-Färbungen von SCHNEIDER (2002) an den Trichoblastomen des bandartigen Subtyps und des medusoiden Subtyps als positiv gewertet und ein Ursprung dieser Subtypen von Strukturen der Haarfollikel aufgrund dieses Ergebnisses vermutet werden. Die granulären und trabekulären Subtypen zeigen allerdings negative Reaktionen, so dass die von Schneider (2002) getätigte Aussage, alle Trichoblastome betreffend, verallgemeinernd und nicht korrekt ist.

Des Weiteren wird unter den eben genannten Gesichtspunkten auch ihre die Resultate der AE3-Färbungen betreffende Folgerung hinfällig, dass es sich nicht um entartete epidermale Basalzellen handeln könnte, da insgesamt zu wenig Zellen angefärbt wurden. Erfolgt eine Interpretation immunhistochemischer Färbungen anhand des dargestellten Prinzips muss

dieses konsequent bei allen Antikörpern angewendet werden, und dies bedeutet im Falle der AE3-Ergebnisse, analog der Auswertungskriterien des CK19, dass die Trichoblastome in ihrer Immunreaktion mit diesem Antikörper als positiv zu werten sind und somit ein Ausgang dieser Neoplasien von den epidermalen Basalzellen möglich und nicht auszuschließen ist. Die Forderung von CULLEN et al. (2002), dass geeignete Antikörper genutzt werden sollen und vor allem mehrere Antikörper verschiedener Spezifität, um Aussagen zu einem bestimmten Zelltyp der neoplastischen Zelle treffen zu können, erscheint in der Studie von SCHNEIDER nicht erfüllt, da die genutzten Antikörper sich in ihrer Spezifität weitgehend entsprechen.

Zusammenfassend betrachtet sprechen in den von SCHNEIDER (2002) dargestellten Untersuchungen nur die Resultate des Antikörpers AE1/3 für den Ursprung aller Subtypen der Trichoblastome in Haarfollikeln und die Ergebnisse der CK19-Färbung lassen die Vermutung der Herkunft der bandartigen und medusoiden Subtypen der Trichoblastome in eben genannten Strukturen zu. Nach den Ergebnissen der AE3-Färbung ist ein Ausgang der Trichoblastome jedoch von den Basalzellen der Haut und von Haarfollikelstrukturen möglich. Unter Einbeziehung der in der hier vorliegenden Studie durchgeführten Untersuchungen mittels des Antikörpers AE1, welche die positive Immunreaktivität der epidermalen Basalzellen mit dem Antikörper AE1 darstellt, ist eine Herkunft von epidermalen Basalzellen ebenfalls nicht auszuschließen.

#### **4.4.3. Abschließende Bewertung und Ausblick**

Der nukleäre Antikörper p63 erwies sich auch für den Nachweis caniner neoplastisch entarteter Basalzellen als hoch spezifisch und sensitiv. Sein die HE-Färbung ergänzender Einsatz in der Routinediagnostik bei Differenzierungsschwierigkeiten von stark pigmentierten Basalzelltumoren von Melanomen oder Abgrenzungen basosquamöser Karzinome von Plattenepithelkarzinomen kann empfohlen werden.

Die Resultate der immunhistochemischen Untersuchungen an den Basalzelltumoren\* mittels dieses Antikörpers zeigen einheitlich die positive Reaktivität der neoplastischen Zellen. Eine Histogenese dieser Tumoren von epidermalen Basalzellen ist folglich nicht auszuschließen. Wie unter Punkt 4.4.2. ausführlich dargestellt, scheinen die zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen keinen sicheren Nachweis der Herkunft dieser Neoplasien von primitiven Haarkeimzellen zuzulassen, wie er nach SCHNEIDER (2002) von den Verfassern der novellierten WHO-Klassifikation epithelialer und melanotischer Tumore der Haut postuliert wird. Weitere Untersuchungen und Methoden, um den Ursprung der Basalzelltumoren\* den Haarfollikeln zuordnen zu können, scheinen notwendig zu sein, um diese Neoplasien als Trichoblastome in der Klassifikation führen zu können. Der Novellierung der WHO-Klassifikation lag die Intention der Verfasser zugrunde, ausschließlich gutartige Neoplasien neu zu klassifizieren (SCHNEIDER 2002). Für die eindeutige Beurteilung der Dignität sind ebenfalls Verlaufsuntersuchungen in Form von Nachuntersuchungen erforderlich, da nur so Spätrezidive und Metastasen erkannt werden

---

\* bedeutet: Basalzelltumor definiert nach der WHO-Klassifikation von WEISS und FRESE (1974)

können. Dies verlangt eine kooperative Zusammenarbeit von Klinik und Pathologie (COTCHIN 1959; ÜBERREITER 1960, SANDERSLEBEN 1964; BRODEY 1970; ESKENS 1983).

Anzumerken bleibt, dass von einer ausschließlichen Reklassifizierung der Basalzelltumoren\* als Trichoblastome zu sprechen nicht richtig erscheint, da die zu beobachtenden infiltrativ wachsenden Basalzelltumoren anhand der Novellierung als Basalzellkarzinome zu befunden sind, was allerdings die Destruktivität in ihrem Wachstum zum Ausdruck bringt.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten caninen Hautproben mittels des Antikörpers AE1 zeigten neben der Färbung der Suprabasalzellen die positive Immunreaktion der Zellen des Stratum basale der Haut, abweichend der Resultate, die SCHNEIDER (2002) in ihren Vorversuchen erzielte. Dies unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen und Methoden zur angestrebten Erstellung eines Zytokeratinkataloges für den Hund als Basis einer wichtigen diagnostischen Grundlage.