

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurden immunhistochemische Untersuchungen zu drei Themenkomplexen erstellt. Der Schwerpunkt der Arbeit sind die Untersuchungen der basaloiden Proliferationen und Neoplasien im Mammaparenchym der Hündin. Mammatumoren stellen bei der Hündin die häufigste Neoplasie dar und maligne mammäre Tumoren sind mit die häufigste Todesursache beim Hund. Da bei dieser Spezies eine Vielzahl verschiedener Typen von Mammatumoren mit unterschiedlichsten biologischen Verhalten auftreten, ist eine genaue Kenntnis der verschiedenen Neoplasien und eine gesicherte, zuverlässige Diagnostik ihrer erforderlich. Ziel der Untersuchungen ist die Ermittlung der Histogenese der zur Zeit noch wenig untersuchten basaloiden mammären Gewebeveränderungen, um diese richtig klassifizieren und damit einhergehend prognostische und therapeutische Aussagen treffen zu können.

Es wurden aus einer Materialmenge von 220 HE-gefärbten Präparaten 50 Fälle, die die typische basaloide Zellmorphologie und die spezielle Gewebetextur aufwiesen, ausgewählt und immunhistochemisch mittels 5 verschiedener Antikörper und histochemisch anhand der PAS-Reaktion bearbeitet. In der vorliegenden Studie werden 22 Fälle mit ihren 154 Färbungen repräsentativ besprochen.

Zuerst wurde das histomorphologische Erscheinungsbild der verschiedenen Gewebeproben an HE-gefärbten histologischen Präparaten ermittelt und die vorliegenden Tumortypen anhand der WHO-Klassifikation befundet. Die auffallenden Charakteristika der histologischen Struktur sind die palisadenartige Anordnung peripherer Zellen, deren zentrale Zellen drüsige oder squamöse Differenzierung oder auch solide Strukturen ausbilden, sowie die Formierung von bandartigen Texturen durch doppelreihige, ebenfalls palisadenartig aufgereihete Zellen.

Nach den Auswertungen der Immun- und PAS-Färbungen erfolgte eine erneute Diagnostik der mammären Veränderungen, mit den Erkenntnissen der genauen Histogenese der hyperplastischen und neoplastischen Zelltypen, die ihnen zugrunde liegen. Im Anschluss wurden die erhobenen Befunde mit denen der HE-Färbung vergleichend betrachtet und Möglichkeiten von Fehldiagnosen aufgezeigt.

Der Einsatz der zytoplasmatischen Antikörper AE1, LP34, CK14, HHH35 und des nukleären Kernproteinmarker p63 ermöglichte eine spezifischere Diagnostik der Veränderungen. Durch diese zusätzlichen Erkenntnisse konnten Empfehlungen für Modifizierungen, bzw. Klassifizierungen einzelner Tumortypen in der WHO-Klassifikation der Mammatumoren des Hundes vorgenommen werden. So befürworten die Untersuchungsergebnisse eine spezifischere Klassifizierung der einfachen Adenome bei gleichzeitiger Reklassifizierung der basaloiden Adenome. Unter den einfachen Adenomen sollten 3 verschiedene Typen aufgeführt werden: 1. die Drüsenepitheliome, 2. die Myoepitheliome und 3. die basaloiden Adenome. Eine Einteilung der einfachen Adenome in zwei Subtypen, den Drüsenepitheliomen und den Myoepitheliomen ist ebenfalls möglich, wobei die basaloiden Adenome

in die erste Kategorie eingeteilt werden müssten, da ihre ermittelte Histogenese ihre ausschließliche Abstammung von den Drüsenepithelien der Mamma zeigt. Allerdings sollten sie in der Aufführung als Drüsenepitheliome, aufgrund ihrer deskriptiven histologischen Merkmale, ihrer speziellen Gewebetextur, als spezielle Variante dargestellt werden.

Die Dignität der basaloiden Adenome betreffend, können anhand der Methodik der durchgeführten Untersuchungen keine eindeutigen Aussagen getroffen, sondern nur Beobachtungen aufgezeigt werden. Die auffälligen Analogien im histomorphologischen Erscheinungsbild in 7 der malignen Fälle implizieren die Vermutung einer möglichen bösartigen Transition dieser basaloiden Adenome.

Für die weiteren Modifizierungsvorschläge ist der außerordentlich interessante Befund der immunhistochemischen Färbungen, insbesondere der p63-Färbung, wichtig und grundlegend, der das Vorkommen eines basaloiden, epithelzellähnlichen Phänotyps der basalen/myoepithelialen Zellen zeigt, und zwar in mehr als der Hälfte der Fälle. Ohne das Wissen dieses Erscheinungstypes, bzw. ohne verifizierende Immunfärbungen, sind in der Routinediagnostik Fehldiagnosen möglich, da diese neoplastischen Zellen fälschlicherweise den Drüsenepithelzellen zugeordnet werden, und es resultieren falsche prognostische Einschätzungen, da der vorliegende Tumortyp nicht erkannt wird. Dies betrifft, wie in dieser Studie gezeigt wird, zum einen die mit einer schlechteren Prognose einhergehenden Myoepithelkarzinome sowie andererseits komplexe Tumore und solche Tumore, die eine assoziierte myoepitheliale Hyperplasie aufweisen, für die durch die Mitbeteiligung des Myoepithels eine weitaus bessere Prognose gegeben ist. Die Möglichkeit des Vorkommens eines basaloiden, epithelzellähnlichen Phänotyps der caninen Myoepithelzelle sollte in der WHO-Klassifikation der Mammatumoren zum Ausdruck gebracht werden (Myoepitheliom), so dass bei der Untersuchung basaloider Tumoren vom Pathologen zur spezifischen Diagnostik die Anwendung immunhisto-chemischer Untersuchungen erwogen werden kann.

So ist auch die Möglichkeit, dass adenosquamöse Karzinome nicht nur als einfache, sondern auch als komplexe Neoplasien auftreten, in die Beschreibung dieses Tumortyps in die WHO-Klassifikation mit aufzunehmen.

Des Weiteren zeigt die vorliegende Studie den Tumortyp des komplexen Adenoms als noch nicht hinreichend in der Klassifikation beschrieben. Nur anhand der vorgenommenen immunhistochemischen Färbungen der Antikörper CK14 und besonders p63 konnte das vorliegende komplexe Adenom diagnostiziert werden, weil die jetzige Definition der histomorphologischen Erscheinung in der Klassifikation diesen Typ in der HE-Färbung nicht vermuten ließ. Da ausschließlich den einfachen und nicht den komplexen Adenomen präkanzeröse Eigenschaften zugesagt werden, ist auch hier die spezifische Diagnostik, obwohl es sich um einen benignen Tumor handelt, von Relevanz.

Ebenfalls erwähnenswert zeigen sich die Befunde an den untersuchten epithelialen und duktalem Hyperplasien. In einem Drittel der Fälle sind nur streckenweise Myoepithelzellschichten an den Veränderungen ausgebildet, oder sie fehlen sogar ganz. Diese Beobachtung ist Kennzeichen invasiver Veränderungen und lässt eine mögliche infiltrative Eigenschaft

vermuten. Zum jetzigen Zeitpunkt werden nur duktale Hyperplasien, die eine moderate bis markante Atypie zeigen, als präkanzeröse Veränderungen in Erwägung gezogen und mit einer größeren Chance zur Entwicklung invasiver Karzinome assoziiert und nicht, wie es in der vorliegenden Studie zu beobachten ist, duktale Hyperplasien mit normotypischen Zellen sowie epitheliale reguläre Hyperplasien.

Aussagen über das Vorliegen von Neoplasien, die aus entarteten mammären Reserve-/Stamm- bzw. Vorläuferzellen bestehen, können nur spekulativ getroffen werden. Die Kenntnis, dass eine p63-Expression in adulten Epithelien auf Reserve- bzw. Vorläuferzellen beschränkt ist, impliziert einerseits die Frage der Rolle der Myoepithelien in der Genese der mammären Reservezellen und andererseits in 4 der vorliegenden Fälle der Studie das Vorliegen eines mammären Stammzelltumors. Die Existenz mammärer Reserve-/Stamm-/bzw. Vorläuferzellen ist beim Hund noch nicht bewiesen, aber sehr wahrscheinlich, da das Mammaparenchym zyklusbedingt stetigen Auf-, Um- und Abbauprozessen unterworfen ist. Hypothetisch kann eine Analogie des Phänotyps der mammären Reservezellen zu den epidermalen, den Basalzellen vermutet werden, da die Milchdrüse ektodermalen Ursprungs ist und eine modifizierte Schweißdrüse darstellt. Die Möglichkeit, dass diese Zellen bei neoplastischer Entartung ein den Basalzelltumoren (entsprechend der Definition von WEISS und FRESE 1974 und SANDERSLEBEN 1989) der Epidermis ähnelndes histologisches Bild präsentieren könnten, wäre denkbar. Es sind jedoch weitgreifendere Untersuchungen zur Klärung der Existenz mammärer Stammzellen und zu ihrer Rolle in der Tumorgenese mammärer Neoplasien erforderlich, um Aussagen darüber treffen zu können, ob die Mamma Stammzelltumoren spezieller Morphologie ausbildet, oder gar alle mammären Neoplasien von Stammzellen ausgehen, die sich während der Tumorgenese zu verschiedenen Phänotypen entwickeln und so die Entartung der einzelnen mammären Zelltypen simulieren.

Den Untersuchungen der Mammagewebsveränderungen wurde eine Prüfung zur Eignung des Einsatzes des humanen Kernproteinmarkers p63 (clone 4A4) im caninen Gewebe vorangestellt. Die Ergebnisse dieser immunhistochemischen Untersuchungen an caniner Haut und caninem Mammagewebe zeigen seine hohe Spezifität und Sensitivität, myoepitheliale und basale Zellen im Gewebe des Hundes zu identifizieren. Das nukleäre p63-Protein beider Spezies wird durch den gleichen Antikörper erkannt (Kreuzreaktivität), was strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den humanen und caninen Epitopen impliziert.

Die Identifizierung intakter, kontinuierlich ausgebildeter Myoepithelschichten, die Kennzeichen nicht invasiver mammärer Gewebeveränderungen sind, ist mittels der Kernfärbung durch den p63-Antikörper deutlich verbessert. Dies konnte in den Studien der basaloiden Mammagewebsveränderungen gezeigt werden. Der Antikörper CK14 bereitete in seiner Auswertung an den in der HE-Diagnostik befundenen Karzinoma in situ-Läsionen sowie den epithelialen und duktalem Hyperplasien aufgrund seines zytoplasmatischen Färbeprofiles in der Form Schwierigkeiten, dass die Kontinuität der basalen/myoepithelialen Schicht durch die schnittbedingt unterschiedlich getroffenen Zytoplasmaausläufer der Zellen meist nur vermutet, aber nicht sicher beurteilt werden konnte. Durch Anfärbung der Zellkerne

mittels des Antikörpers p63, sieht man bei vorhandener myoepithelialer Schicht die Nuklei perlschnurartig in einer Ebene liegen, lokalisierte Verluste sowie ihr Fehlen sind mit weitaus größerer Sicherheit zu befunden. Das nukleäre Färbemuster bedingt eine optisch einfachere Auswertung.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden immunhistochemische Untersuchungen an den ehemals als Basalzelltumoren bezeichneten und jetzt als Trichoblastome reklassifizierten Neoplasien durchgeführt. Die primäre Intention bestand in der Überprüfung der Markierung neoplastisch entarteter Basalzellen durch den Kernproteinmarker p63. Die ausgesuchten, nach WEISS und FRESE (1974) als Basalzelltumoren bezeichneten Neoplasien wurden zunächst anhand der novellierten WHO-Klassifikation von GOLDSCHMIDT et al. (1998) in der HE-Färbung neu befundet. Hierbei ist festzustellen, dass eine ausschließliche Reklassifizierung dieser Tumoren als Trichoblastome, wie dies von den Autoren ausdrücklich betont wird, dem Wesen der Neoplasien nicht gerecht wird, da die geschaffenen Definitionen der einzelnen Typen dieser Neoplasien die verschiedenen histomorphologischen Erscheinungsbilder nicht abzudecken vermögen. Zur Klassifizierung der ehemals als Basalzelltumoren beschriebenen Neoplasien müssen neben den Definitionen der Subtypen der Trichoblastome ebenfalls die Termini des Basalzellkarzinoms und des basosquamösen Karzinoms für die Diagnostik genutzt werden. Schwierigkeiten in der Zuordnung bestehen zum einen bei infiltrativ wachsenden, medusoide Wuchsform aufweisenden Neoplasien, da diese histologische Struktur dem Basalzellkarzinom nicht zugeordnet wurde und die Diagnose eines Trichoblastoms vom medusoiden Typ die Dignität der Neoplasie nicht widerspiegelt. Andererseits müssten infiltrativ wachsende Basalzelltumoren, die Tumorzellinseln, Stränge oder so genannte Klarzellen aufweisen, dem Basalzellkarzinom zugeordnet werden, was der Intention der Verfasser der Novellierung nicht zu entsprechen scheint. Sie bezeichnen das Vorkommen dieses Basalzellkarzinoms beim Hund als ungewöhnlich.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden anhand der neuen Klassifikation 3 Basalzellkarzinome und 2 basosquamöse Karzinome und 5 Trichoblastome diagnostiziert, wobei bei letztgenannten 2 der als medusoiden Subtypen befundeten Neoplasien ein infiltratives Wachstum aufwiesen.

In den Immunfärbungen konnte in allen untersuchten Neoplasien für die den Tumor bildenden Zellen eine positive Immunreaktivität mit dem Antikörper p63 gezeigt werden

Somit ist auch unter Anerkennung der novellierten Klassifikation von GOLDSCHMIDT et al. (1998) der Nachweis der Markierung entarteter epidermaler Basalzellen durch den p63 Marker gegeben, aufgrund der positiven Reaktivität der Basalzellkarzinome und der basosquamösen Karzinome. Der Ursprung der untersuchten Tumorgruppe ist, die Spezifität des verwendeten Antikörpers betrachtend, sowohl von epidermalen Basalzellen, als auch von den Zellen der äußeren epithelialen Wurzelscheide des Haares möglich. Eine Differenzierung zwischen den Zellen der genannten Strukturen ist nicht möglich. Analog erscheinen die, in den der Reklassifizierung zugrunde liegenden immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzten 4 Antikörper von SCHNEIDER (2002), aufgrund ihrer definierten Spezifitäten, zu einer Differenzierung zwischen diesen Strukturen nicht in der Lage zu sein. Es wurden drei

Breitspektrumantikörper (AE1/3, AE1 und AE3) sowie der Antikörper CK19, der sich durch eine unzureichende Spezifität und eine schwache Sensitivität auszeichnete, eingesetzt, um die Abstammung dieser Tumoren von primitiven Haarkeimen zu beweisen. Kritikwürdig erscheint ebenso der nicht einheitliche Modus der Interpretation der immunhistochemischen Resultate der verschiedenen Antikörperfärbungen, da qualitative und quantitative Bewertungskriterien der Beurteilung zugrunde gelegt wurden und folglich die resultierenden Schlussfolgerungen den Resultaten der Färbungen nicht entsprechen. Zudem bleibt die in der vorliegenden Studie zu beobachtende deutliche positive Immunreaktivität der Basal- und weitgehend auch der Suprabasalzellen der Epidermis mit dem Antikörper AE1 aufzuzeigen. In den immunhistochemischen Untersuchungen zur Reklassifizierung wurde eine negative Immunreaktivität der Epidermis beobachtet und folgend zur Beweisführung genutzt, dass die positiv reagierenden Trichoblastome nicht auf epidermale Strukturen zurückzuführen sind. Der Nachweis der ausschließlichen Abstammung dieser Tumoren von primitiven Haarkeimen wird anhand der bis jetzt vorliegenden immunhistochemischer Untersuchungen nicht erbracht. Vielmehr lassen die Ergebnisse die Möglichkeit des Ursprungs dieser Neoplasien von Basalzellen der Epidermis und von Strukturen der Haarfollikel zu.