

A. EINLEITUNG

Die zytopathologische Diagnostik wurde in der Humanmedizin ursprünglich für den Nachweis von Uteruskarzinomen der Frau mit Vaginalabstrichen eingesetzt (PAPANICOLAOU 1963). In den sechziger und siebziger Jahren wurde diese diagnostische Methode in verschiedenen Organbereichen genutzt, z. B. bei Erkrankungen der Lunge, des Magen-Darm-Traktes, der Harnwege und der Haut.

Mit den Arbeiten von PERMAN (1966) und ROSZEL (1967) hielt die zytopathologische Diagnostik Einzug in die Veterinärmedizin. Weit verbreitet ist der Einsatz der Zytologie in der Untersuchung von Blutaussstrichen, Lymphknoten, Knochenmark und malignen Körperhöhlenergüssen. Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet liegt in der Diagnostik von Umfangsvermehrungen der Haut (UEBERSCHÄR 1996).

Viele Arbeiten behandeln die Schwierigkeit, eine sichere Aussage zur Frage der Dignität zu treffen. Einerseits sind viele maligne Prozesse gut differenziert und weisen nur wenige Malignitätskriterien auf, andererseits können reaktive Zellen dieselben Kriterien zeigen. Präoperativ muss eine exakte Diagnose gestellt werden, da aufgrund des infiltrativen Wachstums mesenchymaler Neoplasien eine radikale Operation nötig ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob bei mesenchymalen Umfangsvermehrungen in Haut und Unterhaut des Hundes statistisch signifikante zytologische Unterscheidungskriterien zwischen neoplastischen und nicht-neoplastischen Prozessen existieren und so für die zytologische Diagnostik von Fibrosarkomen des Hundes eine ausreichende diagnostische Sicherheit besteht.

B. LITERATURÜBERSICHT

1. Definition und Gegenüberstellung Zytopathologie - Histopathologie

1.1 Definition

Die Histopathologie untersucht und beschreibt die krankhaften Veränderungen der Gewebe. Die Zytodiagnostik ist die mikroskopische Untersuchung von Einzelzellen, die aus dem Gewebeverband herausgelöst wurden (FREUDENBERG 1980).

1.2 Unterschiede

In histologischen Präparaten bleibt die Gewebetextur überwiegend erhalten. Die Zellen werden in ihrem natürlichen Verband fixiert und auch das angrenzende Gewebe kann untersucht werden. In der Histologie liefern die Gewebetextur und das Wachstumsverhalten wichtige Information zur Einschätzung der Dignität. Das invasiv destruierende Wachstum eines Prozesses ist ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Dignität. Die Zytologie beurteilt Malignitätskriterien in erster Linie an Hand von Veränderungen der Einzelzellen (UEBERSCHÄR 1996).

Im zytologischen Ausstrich befinden sich im Gegensatz zum histologischen Präparat nur sehr wenige Zellen. Diagnostisch wichtige Zellen, wie z. B. Tumorzellen, treten gegenüber anderen Zellpopulationen meist stark in den Hintergrund und müssen sorgfältig gesucht werden (UEBERSCHÄR 1996). Dies trifft nicht auf Gewebe zu, die leicht Zellen exfolieren. Präparate aus Lymphknoten, Knochenmark oder Flüssigkeitsansammlungen in Körperhöhlen, bei denen die Zellen im Sediment durch Zentrifugieren angereichert werden, enthalten im zytologischen Präparat viele Zellen. Bei diesen Geweben ist die Zytologie die bevorzugte Untersuchungsmethode.

Von histopathologischen Proben können beliebig viele Nachschnitte für Spezialuntersuchungen angefertigt werden. Dagegen gewinnt man bei der Probennahme für die zytologische Untersuchung nur wenige Zellen, die nur für eine geringe Zahl an Ausstrichen ausreichen. Es stehen nur die gefertigten Ausstriche zur Verfügung (UEBERSCHÄR 1996).

Bei der morphologischen Bewertung sind erhebliche Unterschiede der histologischen und zytologischen Präparate zu beachten. In den histologischen Schnitten findet man Scheiben und Anschnitte von Zellen und durch Wasserentzug und Veränderung der

Proteinstruktur kommt es zur Zellschrumpfung (REBAR et al. 1982). Bei zytologischen Präparaten liegen die Zellen einzeln als hauchdünne Schicht auf dem Objektträger und werden durch Ausziehung auf dem Objektträger extrem vergrößert (UEBERSCHÄR 1996).

1.3 Vorteile der Zytologie

Zytologische Präparate können einfach hergestellt und untersucht werden. Die Materialgewinnung ist für den Patienten minimal invasiv. Zumeist wird keine Narkose oder Sedation benötigt. Die Punktion kann ambulant erfolgen. Durch die einfache Herstellung und Färbung steht das Präparat sofort zur Diagnosestellung zur Verfügung, (TYLER et al. 1989). Die Kosten für die zytologische Untersuchung sind wesentlich geringer als bei einer histologischen Untersuchung (MENARD et al. 1986).

Für die Operationsplanung ist es wichtig, die Dignität und die Histogenese des Tumors zu beurteilen, um die geeignete Operationsmethode zu wählen. Allgemein lassen sich vier Resektionsebenen unterscheiden: intrakapsulär, marginal, weit und radikal. Eine intrakapsuläre oder marginale Resektion ist nur bei nachweislich benignen Neoplasien indiziert (KESSLER 1999). Maligne Tumoren haben häufig nur scheinbar eine Kapsel. Sie besteht aus dem komprimierten umliegenden Gewebe und wird als Pseudokapsel bezeichnet. Oft hat der Tumor diese Kapsel schon durchwandert und das umliegende Gewebe infiltriert. Darum darf die Resektion nicht entlang dieser vermeintlichen Kapsel erfolgen, sondern es ist stets eine weite oder radikale Operationstechnik angezeigt. Weichteilsarkome bilden besonders häufig Pseudokapseln aus (HAAGEDOORN et al. 1996). Sie weisen einen höheren Grad an Invasivität auf, darum muss bei der Operation eine weite Resektion mit einem Saum von mindestens 3 cm erfolgen (KESSLER 1999). Humanmedizinische Arbeiten betonen, dass die Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) die geeignete und oft die einzige diagnostische Methode für die Operationsplanung ist (AKERMAN et al. 1985). Die radikale Entfernung eines Sarkoms hat die beste Prognose, wenn vorher keine histologische Biopsie durchgeführt wurde (AKERMAN et al. 1980). Im Vergleich zur Inzisionsbiopsie ist der Defekt bei der FNAB nur sehr klein und die Gefahr von Blutungen, Infektionen oder die Verschleppung von Tumorzellen minimal (AKERMAN 1997). Verschiedene humanmedizinische Studien untersuchten die Entstehung von Tumoren durch Tumorzellverschleppung nach FNAB. Bei keiner dieser umfangreichen Studien konnte Tumorzellverschleppung nachgewiesen werden (BERG

und ROBBINS 1962; FRANZEN und ZAJICEK 1968). SONDERSTROM (1966) hält das Risiko für Tumorzellen entlang des Stichkanals bei FNAB für weitaus geringer als bei der Probeentnahme für histologische Biopsien.

Auch AYLA et al. (1995) bevorzugen die Zytodiagnostik gegenüber der Inzisionsbiopsie, da die Punktionsnadel tiefer in die Läsion eindringt, während mit der Inzisionsbiopsie oft nur Gewebe aus der Pseudokapsel des Tumors entnommen wird.

Die FNAB bietet die Möglichkeit, größere Tumoren an mehreren Stellen zu punktieren, um repräsentatives Material zu gewinnen (SKOOG et al. 1998).

1.4 Nachteile und Grenzen der Zytologie

Die Zytologie ermöglicht nur die Beurteilung einzelner Zellen oder kleiner Zellverbände. Der Untersucher erhält daher keine Information über den Aufbau des Tumors und dessen Ausdehnung in das umliegende Gewebe (STIRTZINGER 1988).

Ein wesentlicher Nachteil im Vergleich zur Histologie ist die geringere diagnostische Sensitivität. Ein negatives Ergebnis besagt, dass im Untersuchungsmaterial keine Tumorzellen gefunden wurden. Es kann trotzdem ein maligner Tumor vorliegen, von dem keine Zellen aspiriert wurden. Oft sind Tumorzellen so fest im Gewebeverband verankert, dass bei der FNAB keine Zellen aspiriert werden. Bei heterogenen Tumoren mit starker Begleitentzündung oder Nekrose besteht die Gefahr, dass repräsentative Tumorzellen nicht aspiriert werden. Der Probenumfang kann zu klein sein oder die Probe wurde nicht aus dem Tumor entnommen, sondern aus angrenzendem Gewebe. Weitere Fehler können bei der Auswertung entstehen, da die zytologische Unterscheidung von Hyperplasien, Dysplasien und Neoplasien problematisch ist. Dieses gilt vor allem für gut differenzierte bösartige Tumoren (UEBERSCHÄR 1996). Darüber hinaus sind zytologische Präparate häufiger als bei der histologischen Untersuchung nicht auswertbar, wenn bei der FNAB zu lang aspiriert oder falsch ausgestrichen wurde (BARTH et al. 1992). Die Interpretation von zytologischen Präparaten erfordert besondere Sachkenntnis, die von der Beurteilung pathologisch-histologischer Präparate abweicht. Um Fehler zu vermeiden, sollte die Punktion des Tumors und die Auswertung des Präparates von derselben Person erfolgen (UEBERSCHÄR 1996). Alle verfügbaren Informationen, wie Anamnese und die Befunde der klinischen und röntgenologischen Untersuchung sollten bei der Diagnosestellung berücksichtigt werden (STRITZINGER 1988).

Wenn Gewebezellen Malignitätskriterien zeigen und von Entzündungszellen begleitet werden, ist das Präparat vorsichtig zu interpretieren. Entzündliche Reaktionen können die Zellmorphologie benachbarter Gewebe beeinflussen. Zellen, die sich durch lokale Entzündungsvorgänge dysplastisch verändern, können fälschlicherweise als neoplastische Zellen interpretiert werden (TYLER et al. 1989).

2. Materialgewinnung für die zytologische Untersuchung

Zytologische Präparate werden durch Feinnadelaspiration, Tupf- oder Schabetechnik gewonnen. Die bevorzugte Technik hängt von der anatomischen Lokalisation und dem zu untersuchenden Gewebe ab. Die am häufigsten angewendete Methode ist die FNAB (REBAR 1980a).

Es sollten mehrere Proben gewonnen werden, um mit größerer Wahrscheinlichkeit diagnostisch wichtige Zellen zu erhalten.

Bei Neoplasien entstehen häufig sekundäre Entzündungen. Deshalb ist es wichtig, Zellen aus unterschiedlichen Arealen des Tumors zu gewinnen, um Tumorzellen zu erhalten (TYLER et al. 1989).

2.1 Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB)

Die FNAB wird mit Hilfe von 2 ml - 12 ml Spritzen und 21 - 24 G Nadeln (0,6 - 0,9 mm) durchgeführt. Durch Zurückziehen des Spritzenkolbens wird ein Unterdruck produziert, durch den einzelne Zellen in die Kanüle gelangen. Welcher Durchmesser für Kanüle und Spritze geeignet ist, richtet sich nach der Konsistenz des Gewebes. Weiche Gewebe (z. B. Lymphknoten) aspiriert man mit einem kleinen Durchmesser, da sich schon bei geringem Unterdruck Zellmaterial löst und bei zu großem Unterdruck Zellen zerstört werden. Bei derben Geweben oder Geweben mit geringer Neigung zur Abschilferung von Zellen, wie z. B. Fibrosarkomen, benötigt man eine Kanüle mit einem größeren Durchmesser und eine größere Spritze, um einen stärkeren Unterdruck entwickeln zu können. Es sollten keine Kanülen mit einem größeren Durchmesser als 0,9 mm verwendet werden, da dann schon Gewebeteile aspiriert werden und man wenige freie Zellen erhält (DUNCAN und PRASSE 1976; TYLER et al. 1989). Außerdem ist die Blutkontamination der Präparate bei größeren Kanülen ausgeprägter. Der Grad der Blutkontamination ist zudem von der Aspirationsdauer abhängig. Es sollte mehrfach kurz aspiriert werden, um möglichst wenig Blut zu aspirieren. Zur Durchführung der

Punktion wird die Haut mit Alkohol desinfiziert und die Nadel in der Mitte des Gewebes eingestochen. Es ist wichtig, im späteren Exzisionsbereich zu punktieren, da dadurch das Risiko, Tumorzellen entlang des Stichkanals zu verschleppen, minimiert wird. Man sollte Zellen aus verschiedenen Gebieten des zu untersuchenden Gewebes gewinnen. Dazu wird die Nadel beim Aspirieren in verschiedene Richtungen vorgeschoben, ohne das Gewebe zu verlassen oder den Unterdruck aufzuheben (DUNCAN und PRASSE 1976; REBAR 1980a). Bevor die Nadel das Gewebe verlässt ist es wichtig, einen Druckausgleich zu schaffen und den Kolben wieder ganz in die Spritze zurückgleiten zu lassen. Findet kein Druckausgleich statt, werden die Zellen beim Verlassen des Gewebes durch den Unterdruck in das Spritzenlumen gesogen und können von dort nicht mehr entnommen werden. Zum Aufbringen der Zellen auf einen Objektträger wird die Nadel von der Spritze entfernt und die Spritze mit Luft gefüllt. Man setzt die Nadel wieder auf und bläst durch Entleeren der Spritze die in der Nadel befindlichen Zellen auf einen Objektträger. Diesen Vorgang wiederholt man einige Male (REBAR 1980a, TYLER et al. 1989).

Der Vorteil der FNAB liegt in der geringen Invasivität, so dass zumeist keine Narkose notwendig ist. Ein Nachteil der Methode ist die niedrige Zielgenauigkeit.

Mögliche Komplikationen, die durch die Probenentnahme entstehen könnten, sind Blutungen, Übertragung von Infektionen, Verletzung von benachbarten Strukturen oder die Verschleppung von Tumorzellen entlang des Stichkanals. Diese Komplikationen treten aber nur selten bis gar nicht auf (KESSLER 1995).

2.2 Tupfproben

Tupfproben können von oberflächlichen Hautveränderungen oder von Biopaten, die während einer Operation entnommen wurden, gewonnen werden. Es wird eine frische Fläche der Biopsie angeschnitten und diese von Gewebeflüssigkeit und Blut befreit. Dann tupft man sie an mehreren Stellen des Objektträgers sanft auf. Es ist dabei wichtig, nicht zu wischen oder zu stark zu drücken (DUNCAN und PRASSE 1976).

Bei Hautoberflächen entfernt man zunächst den Schorf, reinigt die Oberfläche etwas und legt einen Objektträger auf die Läsion. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass man viele Zellen gewinnt, die z. T. noch in ihrer ursprünglichen Anordnung liegen. Durch Quetschung der Zellen kann es eventuell zu Artefakten kommen (TYLER et al. 1989) .

2.3 Schabepreparate

Diese Präparate gewinnt man von Oberflächen, äußerlich zugänglichen Gewebszubildungen oder nach einer operativen Biopsieentnahme. Dabei wird mit einer Skalpellklinge mehrmals über den betroffenen Bezirk geschabt. Die gewonnenen Zellen streicht man auf einem Objektträger aus (DUNCAN und PRASSE 1976; TYLER et al. 1989). Beim Schabepreparat gewinnt man viele Zellen. Es eignet sich besonders für harte Gewebe. Die Zellen sind aber oft stark beschädigt (TYLER et al. 1989).

Bei der Bürstenbiopsie wird das Zellmaterial mit Hilfe kleiner Kunststoff- oder Stahlbürsten gewonnen. Sie lassen sich zum Beispiel über den Instrumentenkanal eines Endoskops einsetzen, so dass die Technik bevorzugt zur Probengewinnung aus Hohlorganen (z. B. Bronchien, Ösophagus, Magen, harnableitende Wege) angewandt wird (MISCHKE 1999). Weitere Einsatzgebiete zur Gewinnung von Bürstenbiopsien sind die Konjunktiva zur Gewinnung von Konjunktivalabstrichen, die Kornea oder Mukosa von Maul- und Nasenhöhle.

2.4 Herstellung von Präparaten

Es gibt verschiedene Methoden, Ausstriche für die zytologische Untersuchung herzustellen. Man wählt die Ausstrichmethode nach der Viskosität und dem Umfang des gewonnenen Materials. Gewebeproben müssen schnell dünn ausgestrichen werden, da sie sonst koagulieren (CLINKENBEARD und COWELL 1994). Bei zu langsamer Trocknung oder zu dicken Ausstrichen kommt es zu postvitalen Zellveränderungen, die die Interpretation des Präparates erheblich einschränken.

2.4.1 Blutausstrichtechnik

Man bringt die Zellen auf das hintere Drittel des Objektträgers auf und streicht sie mit Hilfe eines zweiten Objektträgers, in einem Winkel von 45° nach Art des Blutausstriches aus. Diese Methode eignet sich besonders für Flüssigkeiten (PERMAN et al. 1979; TYLER et al. 1989).

2.4.2 Ausstrichtechnik mit zwei Objektträgern

Dazu legt man ohne Druck einen zweiten Objektträger senkrecht zum ersten auf das gewonnene Material. Das Gewicht des Objektträgers drängt die Zellen leicht auseinander. Nun kann man entweder den zweiten Objektträger um 90° drehen, so

dass er parallel zum Unteren liegt, oder man streicht den zweiten Objektträger schnell aber ohne Druck zum Ende des unteren Objektträgers hin aus. Dies ist eine geeignete Methode für Material mit erhöhter Viskosität (TYLER et al. 1989) oder körnigem Material, wie z. B. Leberbiopsien (STOCKHAUS und TESKE 1997).

2.4.3 Nadelausstrichverfahren

Mit Hilfe einer Kanüle wird das gewonnene Material mehrmals in verschiedenen Richtungen zum Rand des Objektträgers gezogen (TYLER et al. 1989).

2.5 Fixierung und Färbung zytologischer Präparate

2.5.1 Fixierung

Die Fixierung der Präparate bedeutet ein Stoppen der intra- und postvital ablaufenden Stoffwechselprozesse. Dadurch wird die Zelle in ihrem momentanen Stadium konserviert und das Auftreten von postvitalen Zerfallserscheinungen (Autolyse) wird verhindert (FASKE 1964). Man unterscheidet die Fixierung durch Trocknung und die Alkoholfixierung. Durch die Alkoholfixierung kommt es zur Koagulation der Proteine und Proteinlipide (SOOST 1978), was zum Schrumpfen der Zellen führt (FASKE 1964). Nach Lufttrocknung erscheinen die Zellen eher aufgetrieben, so dass auch intranukleäre Strukturen, z. B. Nukleoli, vergrößert zu sehen sind (SOOST 1978). Durch die Fixierung kommt es auch zu einem besseren Anheften der Zellen auf dem Objektträger beim anschließenden Färbevorgang (MÜLLER 1996).

2.5.2 Färbung

Die Färbung dient dazu, die Zellen und Zellbestandteile mikroskopisch differenzieren zu können (PERMAN et al. 1979).

Fixiertes Gewebe wird färbbar, da bei der Denaturierung chemische Gruppen frei werden, die eine Affinität zu bestimmten Farbstoffen der Farblösungen haben. Basophilie ist die Affinität zu basischen Farbstoffen. Bei der Eosinophilie wird Eosin, ein saurer Farbstoff, gebunden. Azurophilie ist die Affinität zu Azur. Bei der Neutropilie werden saure und basische Farbstoffe etwa gleich stark gebunden (SCHIEBLER 1991). Färbungen mit nur einem Farbstoff liefern keine guten Übersichtsbilder. Deshalb werden Farbgemische verwendet, die möglichst alle drei Arten von Farbstoffen enthalten (WIRTH 1950).

2.5.2.1 Färbung nach Papanicolaou

Für die Papanicolaou-Färbung werden die Präparate sofort nach dem Herstellen 10 - 30 Minuten in 95 % Alkohol fixiert. Zunächst erfolgt die Kernfärbung mit Hämatoxylin. Danach wird das Zytoplasma mit Orange G und Polychromfarbstoff EA 50 gefärbt. Schließlich wird mehrmals mit hochprozentigem Alkohol gespült (SOOST 1978).

Papanicolaou-Färbungen stellen Kerndetails wie Membran, Nukleoli und die Chromatinstruktur deutlich dar und sind deshalb für die Beurteilung der Dignität gut geeignet (REBAR 1980a). Das Zytoplasma wird nur leicht gefärbt. Da es durch die Feuchtfixierung zu Zellschrumpfung und Vakuolenbildung kommt, werden zytoplasmatische Veränderungen nicht so betont (BOON et al. 1982). Darum ist bei der Beurteilung von entzündlichen Prozessen die Färbung nach Papanicolaou der Pappenheimfärbung unterlegen (REBAR et al. 1982). Durch die transparente Färbung des Zytoplasmas, können auch Kerne von dicken Ausstrichen und Zellhaufen beurteilt werden (REBAR et al. 1982). Mastzellgranula werden mit der Papanicolaou-Färbung nicht gefärbt. Aus diesem Grund kann man sie leicht mit Makrophagen verwechseln (BOON et al. 1982). Die Färbung benötigt erheblich mehr Zeit und Färbeschritte als die Färbung luftgetrockneter Ausstriche (TYLER et al. 1989).

2.5.2.2 Färbung nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa)

Bei der Pappenheim-Färbung handelt es sich um eine hämatologische Färbung, die die May-Grünwald-Färbung mit der Giemsa-Färbung kombiniert. Die luftgetrockneten Präparate werden 3 Minuten in die May-Grünwald-Lösung eingestellt. Dadurch erfolgen zunächst die Fixierung und dann die Färbung der Granula. Danach wird mit Aqua dest. gespült und 12 - 15 Minuten mit Giemsa Lösung gefärbt. Durch die Giemsa Färbung werden die Kerne rotviolett und das Zytoplasma lichtblau gefärbt (FASSKE 1964). Kernstrukturen werden bei der Färbung nach Pappenheim weniger deutlich dargestellt, als bei der Papanicolaou-Färbung. Die Färbung reicht aber aus, um Kriterien der Malignität zu erkennen (TYLER et al. 1989). Das Zytoplasma färbt sich sehr gut (REBAR 1980a). Durch die Lufttrocknung sind Zelle und Kern größer als bei der Färbung nach Papanicolaou. Dadurch wird das Zytoplasma deutlicher dargestellt, Vakuolen und Bakterien sind leichter zu erkennen und Entzündungen besser zu beurteilen. Mikroorganismen und Mastzellgranula werden gut gefärbt (REBAR et al. 1982). Myxoide Matrix, Kollagen und Chondroidfragmente stellen sich besser dar als bei

Färbungen nach Papanicolaou (AKERMAN 1997).

2.5.2.3 Diff-Quik®

Bei der Diff-Quik®-Färbung handelt es sich um eine polychromatische Schnellfärbung. Sie hat den Vorteil, dass die Präparate nach wenigen Minuten untersucht werden können. Die Präparate werden luftgetrocknet und in einer Methanollösung fixiert, dann wird mit Eosin das Plasma rötlich und zuletzt werden mit Thiazin Kernstrukturen blau gefärbt. Bei der Schnellfärbung stellen sich die Zellstrukturen undeutlicher dar als bei der Pappenheimfärbung. Durch diese Färbung werden Nukleoli und Kernchromatin prominenter, so dass eine falsch positive Tumordiagnose gestellt werden kann (STOCKHAUS und WERNER 1996).

2.5.2.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)

Für die HE-Färbung zytologischer Präparate werden die Ausstriche mit Alkohol fixiert und dann mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Zellkerne erscheinen je nach Chromatingehalt hell- bis tiefblau und das Zytoplasma rot (FASSKE 1964).

2.5.2.5 Trichrom-Färbung

Alle Übersichtsfärbungen enthalten zwei Farbkomponenten, das Bindegewebe nimmt hierbei den gleichen Farbton wie das Zytoplasma der Zellen an. Dagegen basieren Bindegewebsfärbungen auf der Kontrastierung durch eine dritte Farbe (BURCK 1973). Nach Alkoholfixierung erfolgt die Kernfärbung mit Eisenhämatoxylin. Dann wird mit Säurefuchsin das Zytoplasma gefärbt. Durch Übergießen mit Phosphormolybdänsäure wird das Bindegewebe entfärbt und mit Anilinblau- Lösung wieder gefärbt. Danach wird mit Essigsäure ein Überschuss an Farbe entfernt (FASSKE 1964).

Die Trichrom-Färbung gibt Kerndetails noch besser wieder als die Papanicolaou-Färbung (BOON et al. 1982).

2.5.2.6 Methylenblau-Färbung

Das Präparat wird luftgetrocknet und mit einer 0,5 % Methylenblaulösung 20 Sekunden lang gefärbt (MEYER 1987). Die Färbung gibt Details von Kern und Nukleoli sehr gut wieder. Da sich Nukleoli sehr deutlich darstellen, werden gutartige Tumoren gelegentlich als bösartig fehlinterpretiert (WELLMAN 1990). Das Zytoplasma wird nur wenig gefärbt,

weshalb zytoplasmatische Kriterien schwer zu beurteilen sind (HALL und MAC WILLIAMS 1988). Eosinophile Granulozyten und Erythrozyten werden nicht gefärbt und erscheinen als farblose Kreise. Darum eignet sich die Färbung für dicke und blutkontaminierte Präparate (HALL und MAC WILLIAMS 1988). Bakterien, Pilze und Mastzellgranula stellen sich gut dar. Fett und Cholesterinkristalle werden hervorgehoben (MEYER 1987). Da die Methyleneblau-Färbung keine permanente Färbung ist, eignet sie sich nicht zur Archivierung (HALL und MAC WILLIAMS 1988).

2.5.2.7 PAS-Färbung (Perjodsäure-Schiff-Reaktion)

Bei der PAS-Färbung handelt es sich um eine zytochemische Reaktion mit der Glykogen, Mucopolysaccharide, Glykoproteide und Glykolipide dargestellt werden. Die Reaktion beruht auf einer Oxidation von Polysacchariden, die karmesinrot angefärbt werden (ZETKIN-SCHALDACH 1985). Bei der PAS-Färbung wird das Präparat luftgetrocknet, in 95 % Ethanol fixiert und mit Perjodsäure-Schiff-Reagenz gefärbt. Danach erfolgt eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (TAKAHASHI 1987).

3. Allgemeine zytopathologische Tumordiagnostik

3.1 Untersuchung von zytologischen Präparaten

Zunächst wird das ganze Präparat systematisch mit einer kleinen Vergrößerung (40 x) durchgemustert. Dabei werden Zellularität, Zellanordnung, der Hintergrund sowie die Qualität von Präparat und Färbung beurteilt. Einzelne Zellpopulationen sind oft nur auf einer kleinen Fläche verteilt. Darum merkt man sich Gesichtsfelder mit diagnostisch wichtigen Zellen zur späteren Auswertung (PERMAN et al. 1979, TYLER et al. 1989). Mit Hilfe der nächst größeren Einstellung (200 x) gewinnt man einen Eindruck über die beteiligten Zellarten und über die Zellgröße. Mit der 400 x oder 1000 x Vergrößerung erfolgt dann eine Untersuchung von Kern- und Zytoplasmastruktur der Zellen (TYLER et al. 1989). Nur vollständige Zellen eignen sich zur Auswertung. Defekte Zellen haben vergrößerte Kerne und blasses, diffuses Chromatin, was fälschlicherweise als Malignitätszeichen interpretiert werden kann (WELLMAN 1990).

Ziel der zytologischen Untersuchung ist es, zunächst zu entscheiden, ob ein entzündlicher oder neoplastischer Prozess vorliegt. Bei Neoplasien versucht man

festzustellen, ob es sich um einen Primärtumor oder eine Metastase handelt (AYALA et al. 1995, WILLEN et al. 1995). Die zytologische Einteilung der Neoplasien erfolgt nach ihrem Ursprungsgewebe und ihren zellulären Charakteristika in epitheliale, mesenchymale oder Rundzelltumoren. Bei anaplastischen Tumoren ist diese Zuordnung schwierig (TYLER et al.1989).

3.2 Malignitätskriterien

Zytologische Malignitätskriterien resultieren aus der asynchronen Entwicklung der Zellen und einer Zellproliferation ohne normale Differenzierung (ZINKL 1981a).

Es werden allgemeine Malignitätskriterien, Kernkriterien und zytoplasmatische Kriterien unterschieden (PAPANICOLAOU 1963; REBAR 1980a). Nicht alle Malignitätskriterien können bei den verschiedenen Tumorarten angewendet werden. Während viele Malignitätskriterien bei epithelialen Tumoren nachweisbar sind, werden diese bei lymphatischen Tumoren überwiegend nicht festgestellt. Kennzeichen dieser Tumore ist die große Anzahl einer monomorphen Population häufig unreifer lymphoider Zellen (ZINKL 1981b). Nicht alle Zellen einer Population maligner Zellen müssen ein bestimmtes Kriterium aufweisen. Darüber hinaus können auch nicht-maligne Zellpopulationen bis zu drei Kriterien der Malignität zeigen. Das Fehlen von Malignitätskriterien schließt eine maligne Neoplasie aber keinesfalls aus (TYLER et al. 1989). So weisen Schilddrüsentumore und Tumoren der Analbeutel zytologisch ein verhältnismäßig benignes Zellbild auf, obwohl es sich bei beiden Tumoren um hochmaligne Zubildungen mit invasivem Wachstum und hoher Metastasierungsrate handeln kann (KESSLER 1999). Es gibt kein einzelnes Zellkriterium, das beweisend für die Malignität eines Tumors ist. Erst eine Kombination mehrerer Zellveränderungen ergeben die Diagnose der Malignität (ZACH 1972). Um einen bösartigen Tumor nachzuweisen, sollten mindestens drei Kernkriterien der Malignität vorhanden sein (BARTON 1987; TYLER et al. 1989).

3.2.1 Allgemeine Kriterien

Hyperzellularität: Infolge der vermehrten Proliferation ist die Zellularität erhöht. Darüber hinaus gewinnt man durch eine verringerte Zelladhäsion bei der Punktion maligner Prozesse mehr Zellen (TYLER et al. 1989).

Zellpleomorphismus: Hierbei besteht eine deutliche Variation der Zellform. Die Form

einer benignen Zelle schwankt nur in einem relativ engen Bereich (KOSS 1979).

Anisozytose: Teilweise findet man in malignen Tumoren sehr große Zellen, die durch unphysiologische Zellteilung entstehen (KOSS 1979).

Kern - Plasma - Verhältnis: Das normale Kern - Plasma - Verhältnis von 1:3 bis 1:8 verändert sich auf $< 1:2$. Abhängig von dem Zellzyklus zeigt eine normale Zelle nur leichte bis mittlere Abweichungen der Zell- und Kerngröße. Kerne von malignen Zellen sind in der Regel größer als die von benignen Zellen, da sie mehr DNA enthalten. Der DNA-Gehalt variiert innerhalb der Tumorzellpopulation deutlich (KOSS 1979).

3.2.2 Kernkriterien

Zellkernveränderungen sind das wichtigste Kriterium für die Beurteilung der Dignität (REBAR 1980a; STIRTZINGER 1988). Sie resultieren aus einer unkontrollierten Proliferation der Zellen (ZINKL 1981a). Kerne rupturierter Zellen sowie freie Kerne schwellen an und verändern ihre Größe sowie Chromatin- und Kernstruktur, sie eignen sich nicht zur Beurteilung (REBAR 1980a).

Folgende Zellkernveränderungen bei malignen Neoplasien werden beobachtet:

Makrokaryose: Große Zellkerne entstehen durch unvollständige Mitosen, dabei kommt es zur Verdopplung des Chromosomensatzes ohne Kernteilung (BARTON 1987). Kerne mit einem Durchmesser von über 10 - 12 μm sind hinweisend auf Malignität (TYLER et al. 1989).

Anisokaryose: Unterschiedlich große Kerne entstehen durch unphysiologische Mitosen, bei denen die Chromosomen nicht gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden (PERMAN et al. 1979; REBAR 1980a; BARTON 1987).

Chromatinstruktur: Bei gutartigen und nicht -neoplastischen Zellen ist die Chromatinstruktur je nach Zellart fein- bis grobgranulär. Bei Geweben mit hoher Mitoserate können einzelne Zellen in der Prophase der Mitose auch kondensiertes Chromatin enthalten. Bei malignen Zellen ist die Chromatinmenge erhöht, was zu einer gröberen Chromatinstruktur und zu einer unregelmäßigen Chromatinverklumpung führt (DeNICOLA und REAGAN 1998).

Hyperchromasie: Die lichtmikroskopisch sichtbare dunklere Färbung des Kerns. Ursache ist eine größere DNA-Konzentration und die erhöhte Färbbarkeit basophiler Substanzen (Heterochromatin) im Kern (KOSS 1979).

Größe Nukleoli: Ist der Durchmesser des Nukleolus $> 5\mu\text{m}$, besteht starker Malignitätsverdacht. Die Synthese von RNA und Protein führen zur Vergrößerung der Nukleoli. Bei Malignität ist aber auch eine Blockade des Transportes der nukleolären Substanzen zum Zytoplasma für die Größenzunahme verantwortlich. Kerne, die mehr als fünf Nukleoli enthalten, sind ein weiteres Zeichen für Malignität (TAKAHASHI 1987). Nukleoli maligner Zellen werden deutlicher sichtbar. Nukleoli maligner Zellen haben oft eine eckige Form (REBAR 1980a; BARTON 1987).

Mitose: Sie bezeichnet die gleichmäßige Aufteilung der identischen genetischen Materials auf die Tochterzellen. Der Mitoseindex (MI) gibt die Zahl der Mitosen pro 1000 Zellen an (MAYERSBACH 1973). Er gibt Auskunft über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Gewebes. In proliferierendem Geweben wie Tumoren aber auch Granulationsgewebe und Entzündungen ist die Mitoserate erhöht. Bei malignen Prozessen kann der Mitoseindex erhöht sein, weil die mitotische Teilung länger dauert als bei gesunden Zellen.

Ein wichtiges Merkmal der Malignität sind abnorme Mitosen. Man findet eine abnorme Zahl und Form der Chromosomen in der Metaphase. Die missgebildeten Chromatiden bewegen sich asymmetrisch in mehr als zwei Zellregionen. Abnorme Mitosen sind relativ selten zu beobachten (PERMAN et al. 1979; REBAR 1980a; BARTON 1987).

Polynukleose: Mehrkernigkeit entsteht durch unvollständige Mitosen, mit Kernteilung ohne Zellteilung (BARTON 1987). Man findet sie häufig bei Osteo-, Rhabdo- oder Leiomyosarkomen (KOSS 1979).

Kernmembranverdickung: Die unregelmäßige Verdickung der Kernmembran entsteht durch Chromatinkondensation an der Kernwand und ist ein frühes Zeichen von Zelldegeneration (TAKAHASHI 1987).

Kernwandeinpressung (Nuclear molding): Durch den Verlust der Kontakthemmung und einer erhöhten Proliferation kommt es zur Kompression der Zellen, wobei der Kern deformiert wird. Diese Deformation kann auch entstehen, wenn sich mehrere Kerne in einer Zelle komprimieren (TYLER et al. 1989; DeNICOLA und REAGAN 1998).

3.2.3 Zytoplasmatische Kriterien

Zytoplasmatische Veränderungen maligner Neoplasien sind weniger spezifische Hinweise auf Malignität (REBAR 1980a). Veränderungen des Zytoplasmas werden häufig auch durch nicht-neoplastische Prozesse verursacht (TYLER et al. 1989). Als

zytoplasmatische Kriterien treten auf:

Zytoplasmatische Basophilie: Sie wird durch Anfärbung eines erhöhten Gehaltes an RNA im Zytoplasma hervorgerufen, und deutet auf stoffwechselaktive Zellen hin (REBAR 1980b; BARTON 1987). Maligne Zellen zeigen zwar häufig Basophilie, dieses Merkmal tritt aber auch bei zahlreichen nicht-neoplastischen teilungsaktiven Zellen auf. Ein spezifischer Hinweis auf Malignität ist die Variabilität der Basophilie (PERMAN et al. 1979).

Die Basophilie ist bei malignen epithelialen Tumoren stärker ausgeprägt als bei malignen mesenchymalen Tumoren (REBAR et al. 1982).

Zytoplasmatische Vakuolisierung: Sie ist ein wenig spezifisches Kriterium, das entweder auf die Degeneration neoplastischer Zellen, oder auf die Bildung von Sekreten der neoplastischen Zelle hinweist (REBAR et al. 1982). Die Vakuolengröße kann dabei sehr stark variieren. Das Zytoplasma von Zellen mit ausgeprägter Vakuolenbildung erscheint weniger basophil.

Variierender Anteil an Zytoplasma: Zellen gut differenzierter Tumore haben eine unterschiedliche die Menge an Zytoplasma. Weniger differenzierte Tumorzellen haben einen gleichmäßig geringeren Zytoplasma- und einen höheren Kernanteil (PERMAN et al. 1979).

3.2.4 Tumorriesenzellen

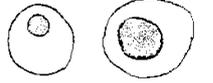
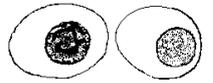
Tumorriesenzellen entstehen durch Kernteilung ohne Zellteilung oder Zellverschmelzung. Maligne vielkernige Zellen erfüllen alle Kriterien der Malignität wie erhöhtes Kern - Plasma - Verhältnis, Hyperchromasie mit grobem Chromatinmuster, irreguläre Kernform, prominente Nukleoli und unterschiedliche Größe und Form der Kerne. Riesenzellen treten auch als gutartige Zellen auf, z.B. als Fremdkörperriesenzellen. Diese unterscheiden sich von maligner Zellen durch das niedrige Kern - Plasma - Verhältnis und der Gleichmäßigkeit von Kerngröße und Kernform (TAKAHASHI 1987).

3.2.5 Kannibalismus

Kannibalismus bezeichnet eine maligne Zelle, in deren Zytoplasma eine andere malignen Zelle eingeschlossen ist. Die Zellmembran bleibt dabei zwischen beiden Zellen erhalten. Dies kann durch abnorme Mitose geschehen, bei der keine vollständige

Trennung zwischen den Tochterzellen stattfindet. Eine weitere Erklärung für diesen Vorgang ist der Verlust der Kontakthemmung maligner Zellen (TAKAHASHI 1987). „Crowding“ bezeichnet das Gruppenweise Zusammenliegen von Zellen. Dieses Kriterium ist besser in abgeschilferten Zellhaufen als im Gewebeschnitt zu beurteilen.

Tab. 1: Malignitätskriterien modifiziert nach CLINKENBEARD und COWELL (1994)

Merkmal	Beschreibung	Skizze
Allgemeine Kriterien		
Pleomorphismus	Deutliche Unterschiede in Form und Größe von Zellen gleicher Art	
Anisozytose	Veränderung der Zellgröße; Vorkommen von Riesenzellen	
Anisokaryose	Veränderung der Kerngröße	
Kern - Plasma - Verhältnis	Kern : Plasma < 1:2 Malignitätshinweis	
Hyperzellularität	Erhöhter Zellgehalt	
Kernkriterien		
Makrokaryose	Erhöhte Kerngröße Kern > 30 µm Malignitätszeichen	
Chromatinstruktur	Chromatinstruktur gröber	
Kernbasophilie	Zunahme der Kernbasophilie	
Mehrkernigkeit (Geschwulstriesenzellen)	Mehrere Kerne pro Zelle, oft mit unterschiedlicher Größe	
Mitosen	Mitoserate erhöht; Vorkommen von abnormen Mitosen	
Kernmembranverdickung	Verdickung der Kernmembran	
Makronukleoli	Nukleoli vergrößert, etwa so groß wie Erythrozyten	
Anisonukleoliose	Veränderung der Form oder Größe: Vergrößerte Nukleoli fusiforme oder eckige Nukleoli	
Kernwandeinpressung	Deformation der Kerne durch weitere Kerne derselben oder benachbarten Zellen	
Zytoplasmatische Kriterien		
Basophilie	Das Zytoplasma wird basophiler	
Vakuolenbildung	Vorkommen von Vakuolen	

3.3 Epitheliale Tumoren

Epitheliale Tumoren findet man in der Haut, in Hautdrüsen, inneren Schleimhäuten sowie inneren Drüsen.

Bei der FNAB eines epithelialen Tumors gewinnt man zellreiche Präparate, wobei Zellverbände sichtbar sind (DUNCAN und PRASSE 1976; PERMAN et al. 1979; REBAR 1980a; TYLER et al. 1989). Bei Adenomen und Adenokarzinomen lässt sich teilweise eine azinäre Anordnung der Zellen erkennen (PERMAN et al. 1979, REBAR 1980a). Es handelt sich um große bis sehr große runde oder ovale Zellen. Die Kerne sind groß und gleichmäßig rund. Sie enthalten ein bis drei deutliche Kernkörperchen. Abhängig von Malignitätsgrad und Tumorherkunft ist die Chromatinstruktur fein bis verklumpt. Die Zellen besitzen viel Zytoplasma und haben deutliche Zellgrenzen (DUNCAN und PRASSE 1976; PERMAN et al. 1979; REBAR 1980a; TYLER et al. 1989).

Gutartige epitheliale Tumoren unterscheiden sich zytologisch kaum von normalem epithelialen Gewebe. Sie sind weitgehend homogen in Größe und Gestalt. Man findet lediglich eine geringgradige Pleomorphie (DUNCAN und PRASSE 1976). Die Nukleoli sind deutlicher sichtbar als bei normalen Epithelzellen. Das Kern - Plasma - Verhältnis ist nur leicht erhöht. (REBAR 1980a; TYLER et al. 1989). Das Zytoplasma ist gelegentlich basophiler als bei normalen Epithelzellen und es kann Vakuolen mit sekretorischen Produkten enthalten (REBAR 1980a).

Je maligner ein Prozess ist, desto mehr Einzelzellen liegen im Präparat vor, da die Kohäsivität der Zellen abnimmt. Mit steigendem Malignitätsgrad zeigen sich zunehmend Variationen an Größe und Form von Zelle, Zellkern und Nukleolus. Die Chromatinstruktur wird gröber und der Kern weist einen oder mehrere prominente Nukleoli auf, deren Form irregulär sein kann. Das Kern - Plasma - Verhältnis steigt deutlich und vereinzelt sind Kernwandeinpressungen zu sehen (TYLER et al. 1989).

Epitheliale Tumoren sind oft ulzeriert und sekundär entzündet. Deshalb sollte man die Probe aus der Tiefe des Tumorgewebes aus verschiedenen Gebieten gewinnen. Lokale Entzündungen oder andere Irritationen können dazu führen, dass die Epithelzellen sich dysplastisch verändern. Dysplastische Epithelzellen zeigen einige Malignitätskriterien wie Variationen in Größe und Form von Zelle, Kern und Nukleolus. Darum ist die zytologische Differenzierung von Dysplasien und Neoplasien gelegentlich schwierig

(TYLER et al. 1989).

3.4 Rundzelltumoren

Diese Tumoren sind zytologisch durch zahlreiche kleine bis mittelgroße, runde oder ovale Zellen gekennzeichnet. Die Präparate sind sehr zellreich. Die Zellen liegen einzeln vor und haben deutliche Zellgrenzen. Die häufigsten Rundzelltumoren sind: Malignes Lymphom, Mastzellsarkom, Histiozytom und das Sticker-Sarkom (REBAR 1980a; DUNCAN und PRASSE 1976; BARTON 1987). In aller Regel kann zytologisch eine definitive Diagnose gestellt werden (MISCHKE 1999).

Tab. 2: Überblick über das zytologische Erscheinungsbild von Tumoren

Tumorart	Zellgröße	Zellform	Zellularität des Aspirats	Vorkommen in Zellverbänden
Epithelial	groß	rund bis oval	zellreich	Zellhaufen
Mesenchymal	klein bis mittelgroß mit Zytoplasmaausläufern	spindelförmig	zellarm	Einzelzellen mit wenigen Zellverbänden
Rundzelltumor	klein bis mittelgroß	rund	zellreich	Einzelzellen

3.5 Mesenchymale Tumoren

Zu den mesenchymalen Tumoren gehören die Tumoren der Gefäße, des Binde- und Stützgewebes, der Muskulatur und der Hüllsubstanzen. Sie werden nach ihrem Anteil an fibrösem und kollagenem Bindegewebe, Schleim, Fett und Muskulatur sowie ihrer Assoziation mit Nerven, Blut- oder Lymphgefäßen unterschieden. Mesenchymale Tumoren stellen bei Hunden und Katzen eine bedeutende Gruppe von Tumoren dar. 10-15 % aller Hauttumoren sind mesenchymalen Ursprungs (KESSLER 1999). Die genaue Spezifizierung der Sarkome ist mit Hilfe der Zytodiagnostik häufig nicht möglich (HALL und MAC WILLIAMS 1988), da Architekturkriterien fehlen und diagnostische Kriterien für Ausstriche aus Feinnadelpunktaten für die Mehrzahl der verschiedenen Typen primärer Weichteiltumoren nicht ausreichend beschrieben sind (ORELL et al. 1999).

Die genaue Klassifizierung ist allerdings für die weitere Therapieentscheidung nicht

entscheidend, da die Therapie der Wahl in den meisten Fällen die chirurgische Entfernung mit ausreichendem Sicherheitsabstand ist (POWERS et al. 1994, AYLA et al. 1995, AKERMAN 1997).

3.5.1 Fibrom

Fibrome sind gutartige Tumoren und treten in der Haut, Unterhaut und der Vagina auf. Sie machen 2,3 % bis 3,5 % aller Hauttumoren aus. Die häufigsten Lokalisationen sind Kopf, Gliedmaßen und Flanke (BEVIER und GOLDSCHMIDT 1981). Bevorzugt erkranken ältere Tiere, mit einem durchschnittlichen Alter von 6 - 11 Jahren. Es besteht eine Rasseprädisposition für Dobermann, Boxer und Golden Retriever (GOLDSCHMIDT UND SCHOFER 1992). Weibliche Tiere sind häufiger betroffen (KESSLER 1999). Das Fibroma durum besitzt eine harte Konsistenz und besteht aus ausgereiften Fibrozyten, Kollagenfasern und einzelnen Fibroblasten. Das Fibroma molle weist eine weichere Konsistenz auf und enthält mehr Fett bzw. Zwischenzellsubstanz. Die Tumore sind gewöhnlich solitär, gut umschrieben und halbkugelförmig bis gestielt. Die Oberfläche ulzeriert nur sehr selten und ist oft haarlos. Fibrome wachsen sehr langsam, nicht invasiv und metastasieren nicht. Die Therapie der Wahl ist die marginale chirurgische Exstirpation, wobei kaum Rezidive auftreten (BEVIER und GOLDSCHMIDT 1981).

3.5.2 Fibrosarkom

Fibrosarkome sind bösartige Tumoren ausgehend von den Fibroblasten des Bindegewebes. Der Tumor kann überall im Weichteilgewebe des Körpers entstehen, in erster Linie jedoch in der Unterhaut. Prädilektionsstellen sind Gliedmaßen und Rumpf. Er wird hauptsächlich bei älteren Tieren zwischen 5 - 12 Jahren gefunden (GOLDSCHMIDT und SCHOFER 1992). Niedrig differenzierte Formen treten auch bei jungen Tieren auf. Eine Rasse- oder Geschlechtsprädisposition besteht nicht (KESSLER 1999).

Der Tumor erscheint klinisch häufig als derbe Umfangsvermehrung der Haut. Er ist unregelmäßig und unklar abgegrenzt. Die Konsistenz ist knotig-derb und oft inhomogen. Wenig differenzierte Tumoren oder solche mit wenig Kollagen können auch weich sein. Gelegentlich kommt es zur Ulzeration und sekundären Infektion. Fibrosarkome sind durch infiltratives Wachstum und starke Rezidivneigung charakterisiert, während Metastasen in weniger als ein Viertel der Fälle auftreten (BEVIER und GOLDSCHMIDT 1981).

Eine radikale chirurgische Entfernung zum frühestmöglichen Zeitpunkt hat die besten Erfolgsaussichten. Nach der chirurgischen Exstirpation liegt die Rezidivrate bei 30 % (BEVIER und GOLDSCHMIDT 1981). Die beste Aussicht auf Heilung besteht bei der Erstoperation, während Rezidivoperationen fast immer mit einer schlechteren Prognose verbunden sind (KESSLER 1999). Tumoren mit einem Mitoseindex über 9 haben eine schlechte Prognose (BEVIER und GOLDSCHMIDT 1981).

Histologisch ist bei Fibrosarkomen keine spezifische Differenzierung der Fibroblasten erkennbar (WEISS 1994). Sie bestehen aus einzelnen Spindelzellen, eingelagert in Kollagenfasern, die in parallelen Reihen liegen (DeSCHEPPER und VANDEVENNE 1997). Die histologische Unterscheidung von Fibrosarkomen in gut (low grade) und wenig (high grade) differenzierte Tumoren hängt von der Zellularität, der Zellreife, der von den Tumorzellen produzierten Kollagenmenge und dem Vorhandensein von Nekrose ab. Gut differenzierte Fibrosarkome sind durch mäßige Zellularität gleichmäßiger Spindelzellen charakterisiert. Sie zeichnen sich durch mäßigen Kernpleomorphismus und nur wenig Mitosen aus. Eine kollagene Matrix ist gewöhnlich vorhanden. Wenig differenzierte Fibrosarkome zeigen eine deutlichere Kernpleomorphie, hohe Zellularität, vermehrte Mitosen und Tumornekrosen (DeSCHEPPER und VANDEVENNE 1997).

3.5.3 Zytologische Merkmale von Sarkomen

Mesenchymale Proliferationen sind durch das Vorhandensein von Spindelzellen gekennzeichnet. Da die Zellen in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind, aspiriert man bei mesenchymalen Prozessen weniger Zellen als bei epithelialen Zubildungen (DUNCAN und PRASSE 1976, REBAR 1980a). Diese Matrix kann man häufig als kollagene, chondroide oder osteoide Matrix identifizieren, was eine wichtige Hilfe bei der Bestimmung des Gewebes sein kann (STIRTZINGER 1988). Feinnadelpunktate aus hochmalignen Sarkomen enthalten normalerweise infolge der vermehrten Proliferation und der verringerten Zelladhäsion reichlich Material.

Spindelzellen haben eine fusiforme Gestalt mit Zytoplasmaausläufern, die sich vom Kern in eine oder zwei Richtungen ausdehnen. In Abhängigkeit vom Ursprungsgewebe und der Malignität sind dabei nur einzelne oder sehr viele Zellen spindelförmig. Die Zellen sind eher klein mit zart- bis mittelblauem Zytoplasma. Die Zellgrenzen sind häufig undeutlich, wobei einzelne Zellen ein schleierförmiges Zytoplasma besitzen. Der Kern

ist rund bis oval. Er färbt sich basophil und weist ein gleichmäßiges feingranuläres Chromatin auf. Im Kern befinden sich 1-2 kleine runde Kernkörperchen, die schwer zu erkennen sind (TYLER et al. 1989).

Die Polymorphie der Zellen mesenchymaler Tumoren nimmt dem Malignitätsgrad entsprechend zu. Das spindelförmige Aussehen nimmt immer mehr ab. Die Form der Spindelzellen ist plump bis oval (TYLER et al. 1989). Es können Zellen mit Sternform oder Zellen mit nur einzelnen, teilweise undeutlichen Zytoplasmaausziehungen vorliegen. Die Zellgrenzen sind undeutlich (REBAR 1980b). Das Kern - Plasma - Verhältnis ist erhöht. Der Kern ist oval und liegt in der Mitte der Zelle. Vielkernige Zellen sind selten. Der Kern enthält einen oder manchmal mehrere Nukleoli, die über 5 µm groß, oder unregelmäßig bis eckig sein können. Die Chromatinstruktur der Kerne ist verklumpt im Gegensatz zu dem fein granulären Chromatin der normalen Fibrozyten (REBAR 1980b). Das Zytoplasma ist basophil und enthält häufig kleine Vakuolen (REBAR1980b, TYLER et al. 1989).

Malignitätskriterien mesenchymaler Tumoren sind unregelmäßiger und nicht so deutlich wie bei epithelialen Tumoren (STIRTZINGER 1988). Zytologische Malignitätskriterien können sowohl bei benignen als auch malignen Bindegewebsproliferationen vorliegen. Unklar ist, ob spezifische Kriterien für maligne Prozesse bestehen. Da auch unreife Fibroblasten aus Granulationsgewebe wie dysplastisch veränderte mesenchymale Zellen verschiedene Malignitätskriterien aufweisen können, ist eine Abgrenzung von mesenchymalen Tumoren auf der Basis zytologischer Diagnosekriterien häufig sehr schwierig und erfordert in der Regel eine histopathologische Untersuchung (TYLER et al. 1989). Vorsicht ist insbesondere bei gleichzeitigem Vorhandensein von Entzündungszellen geboten.

Die Bedeutung der Zytologie für den Nachweis von Sarkomen wird in der Literatur kontrovers diskutiert (siehe 6.)

4. Zytopathologische Diagnostik von Entzündungen

Entzündliche Veränderungen sind zytologisch durch unterschiedliche Entzündungszellpopulationen neben den organtypischen Gewebszellen gekennzeichnet. Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen sind die vorherrschenden Entzündungszellen (REBAR 1980a; TYLER et al. 1989). Die Menge und das Verhältnis der beteiligten Entzündungszellen wird bestimmt, um die Art der Entzündung zu beschreiben. Entzündungen werden nach ihrer Dauer in akut, subakut, chronisch oder nach dem vorherrschenden Entzündungszelltyp in eitrig, proliferativ, granulomatös, und eosinophil unterschieden.

4.1 Morphologische Beschreibung der Entzündungszellen

4.1.1 Neutrophile Granulozyten

Bei den neutrophilen Granulozyten handelt es sich um runde Zellen mit einer Größe von 10 - 12 μm . Die jugendliche Form bezeichnet man als stabkernige neutrophile Granulozyten. Ihr Kern ist stabförmig und zeigt beginnende Einschnürungen. Gealterte Granulozyten werden als segmentkernige neutrophile Granulozyten bezeichnet. Sie enthalten 3 - 5 Kernsegmente, die durch Chromatinbrücken verbunden sind. Das Chromatin ist grobschollig. Das Zytoplasma sehr hell und zart granuliert (GEDIGK 1974).

4.1.2 Monozyten

Monozyten sind 17 - 20 μm groß. Sie haben einen großen und bohnenförmigen Kern, der exzentrisch liegt. Er enthält fein granuliertes Chromatin, das mit zunehmendem Alter gröber wird. Die Zelle enthält viel Zytoplasma, das sich schwach basophil färbt. In reiferen Formen enthält das Zytoplasma sehr feine, rosa Granula (GEDIGK 1974).

4.1.3 Makrophagen

Makrophagen sind je nach Aktivierungsgrad bis zu 30 μm groß. Der Kern ist groß und oval. Er liegt exzentrisch und enthält oft einen Nukleolus. Das Chromatin ist grob granuliert. Makrophagen enthalten viel Zytoplasma, in dem sich oft Vakuolen befinden. Diese enthalten manchmal phagozytiertes Material. Optisch leere Fettvakuolen geben der Zelle ein schaumiges Aussehen (BOON et al. 1982).

4.1.4 Kleine Lymphozyten

Die kleinen Lymphozyten haben einen Durchmesser von 5 - 10 μm (WIRTH 1950). Sie enthalten einen runden Kern. Das Chromatin ist kondensiert und färbt sich tief violett. In dem Kern sind keine Nukleoli zu erkennen. Er wird von einem schmalen leicht basophilen Zytoplasmasaum umgeben (BOON et al. 1982).

4.1.5 Große Lymphozyten

Große Lymphozyten sind 12 - 18 μm groß. Das Chromatin des Kerns ist weniger kondensiert als bei den kleinen Lymphozyten. Nukleoli sind aber nicht zu erkennen. Die Zellen enthalten etwas mehr Zytoplasma, das auch etwas basophiler ist (BOON et al. 1982).

4.1.6 Immature lymphatische Zellen

Diese Zellen sind bis zu 30 μm groß. Sie enthalten einen großen Kern. Er ist rund mit 1-2 großen, blauen Nukleoli. Das Chromatin ist grob granulär. Der Kern wird von einem dünnen Zytoplasmarand umgeben. Das Zytoplasma ist basophil und manchmal vakuolisiert (BOON et al. 1982).

4.1.7 Plasmazellen

Plasmazellen sind 9 - 15 μm groß und oval. Der Kern ist rund und liegt exzentrisch. Darin ist das Chromatin in groben Klumpen „radspeicherartig“ angeordnet. Nukleoli sind nicht zu sehen. Die Zelle enthält viel Zytoplasma, das sich stark basophil färbt. Im Zytoplasma ist eine schmale perinukleäre Aufhellungszone zu erkennen, die man als juxta-nukleären Hof bezeichnet (GEDIGK 1974).

4.2 Einteilung der Entzündungsformen

4.2.1 Akute eitrige Entzündung

Bei der akuten eitrigen Entzündung sind über 70 % der beteiligten Entzündungszellen neutrophile Granulozyten. Sie können denen des peripheren Blutes gleichen, oder degeneriert sein. Degenerierte Zellen enthalten einen geschwollenen Kern, bei dem die Segmentation verloren geht. Das Zytoplasma ist stark vakuolisiert und basophil gefärbt (REBAR et al. 1982). Zu Beginn des Kernzerfalls tritt Pyknose ein. Der pyknotische Kern

schrumpft, das Chromatin ist verdickt und färbt sich stärker an. Danach kommt es zur Kernauflösung (Karyolysis), wobei sich die Zellgrenzen auflösen und Chromatin in das Zytoplasma austritt, und zum Kernzerfall (Karyorhexis). Eine akute Entzündung ohne Degeneration der Neutrophilen deutet auf eine sterile Infektion hin. Es kann auch unter sterilen Bedingungen zur Degeneration kommen, wenn lokale Toxine, z. B. von nekrotischem Gewebe auf die Zellen wirken. Degeneration mit Zellzerfall ist ein Hinweis auf eine bakterielle Infektion (REBAR et al. 1982). Mit der Färbung nach Pappenheim färben sich Bakterien blauschwarz an (HALL und MAC WILLIAMS 1988). Man kann diese Bakterien in zytoplasmatischen Vakuolen finden (REBAR et al. 1982).

4.2.2 Subakute Entzündung

Auch bei der subakuten Entzündung dominieren die neutrophilen Granulozyten mit 50 % - 70 %. Etwa 30 % - 50 % der Zellpopulation besteht aus Makrophagen, daneben kommen Monozyten, Plasmazellen, Lymphozyten und Angiofibroblasten vor. Auch bei dieser Entzündungsform kann man degenerative und nicht degenerative Veränderungen der Neutrophilen erkennen. Die Degeneration sollte nicht anhand von Makrophagen oder Monozyten beurteilt werden, da die Zellen morphologisch stärker variieren (REBAR et al 1982).

4.2.3 Chronische Entzündung

Bei einer chronischen Entzündung machen Monozyten oder Makrophagen über 50 % der Entzündungszellen aus (REBAR 1980b). Die Entzündungszellpopulation besteht aus gut erhaltenen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen. Gleichzeitig finden Entzündungs- und Reparationsvorgänge statt, so dass man im Präparat junge plumpe Fibroblasten finden kann (KOSS 1979). Sie können dysplastisch verändert sein und Kernvergrößerung, Hyperchromasie, vergrößerte Nukleoli und Vielkernigkeit zeigen. Das Kern - Plasma - Verhältnis ist aber nur leicht erhöht und die Chromatinstruktur feingranuliert (TAKAHASHI 1987).

4.2.4 Granulomatöse Entzündung

Bei der granulomatösen Entzündung entwickeln sich aus Makrophagen Epitheloidzellen oder Riesenzellen. Epitheloidzellen ähneln aufgrund ihrer plumpen Form Epithelzellen. Im Gegensatz zu Epithelzellen treten sie aber nur als einzelne Zellen und nie im

Zellverband auf (HALL und MAC WILLIAMS 1988). Riesenzellen sind bis zu 100 µm groß und enthalten viele Kerne. Sie müssen von vielkernigen neoplastischen Zellen unterscheiden werden. Die Größe und Form vielkerniger Riesenzellen sind sehr gleichmäßig, während neoplastische Riesenzellen pleomorph sind (HALL und MAC WILLIAMS 1988).

Auslöser einer granulomatösen Entzündung sind Fremdkörper oder Pilzorgane, die man manchmal noch frei im Präparat, oder in Vakuolen der Makrophagen erkennen kann (REBAR 1980b).

5. Zytopathologische Merkmale der Wundheilung

Die Wundheilung unterteilt man in drei Phasen: Resorption, Organisation und Reparation. Die Wundheilung beginnt mit der Resorption des nekrotischen Gewebes. Örtliche Entzündungsmediatoren verursachen im angrenzenden Gewebe eine perifokale Entzündung, die einer akuten serofibrinösen Entzündung entspricht.

Nach der Phase der Resorption kommt es zur Organisation durch Bildung des Granulationsgewebes. Dabei geht die akute exsudative Entzündung in eine chronisch-proliferative Entzündung über. Kapillaren sprossen in das Wundgebiet ein und ortständige Fibroblasten beginnen mit der Zellteilung. Sie synthetisieren eine Matrix aus Proteoglykanen, Chondroitinsulfat und Hyaluronat. In die Matrix werden Kollagenfibrillen eingebettet. Die Bildung des Granulationsgewebes beginnt am 3. Tag nach der Verletzung. Vom Wundrand her setzt die Umwandlung des Granulationsgewebes in das mechanisch belastbarere und reißfestere Narbengewebe ein. Dabei wandeln sich die Fibroblasten in Fibrozyten um. Ab dem 5. Tag bis zur 5. Woche nimmt der Kollagengehalt zu. Während der Narbenschumpfung retrahieren sich die kollagenen Fasern. In der Haut kann an chirurgisch versorgten Wunden nach etwa 10 - 14 Tagen eine ausreichende Festigkeit erwartet werden (KÖHLER 1971).

Zytologisch besteht Granulationsgewebe neben Angioblasten mit Kapillarbildung aus proliferierenden Fibroblasten und der von ihnen gebildeten Matrix. Es handelt sich um junge, unreife Zellen mit anaplastischem Charakter. Die morphologischen Veränderungen der Zellen ähneln denen bei Neoplasien, sie sind aber nicht so stark ausgeprägt (TYLER et al. 1989). Ohne Kenntnis der Anamnese ist es oft unmöglich, Granulationsgewebe von Tumorgewebe zu unterscheiden (KOSS 1979).

Bei reaktiven Fibroblasten kommt es zur funktionellen Kernschwellung und feinscholligen Hyperchromasie. Der Kern reaktiver Fibroblasten enthält mehr und deutlicher zu erkennende Nukleoli als nicht-reaktives Gewebe. Es können mehrere Nukleoli vorhanden sein, sie sind immer rund (REBAR 1980a). Das Zytoplasma ist in der Regel basophiler als reife Zellen (KOSS 1979). Obwohl hyperplastische Zellen große Kerne und viel Zytoplasma enthalten, bleibt das Kern - Plasma - Verhältnis sehr konstant. Vereinzelt lassen sich Mitosen finden. Sie sind immer physiologisch (REBAR 1980a). Zellen von Granulationsgewebe, die sich im gleichen Differenzierungsstadium befinden sind sehr gleichmäßig in ihrer Form. Sie haben eine ähnliche Chromatinstruktur und zytoplasmatischen Eigenschaften (STIRTZINGER 1988).

Nach JAMES (1985) sind die wichtigsten Merkmale zur Unterscheidung von Bindegewebsproliferationen gegenüber malignen Prozessen die geringe Zellularität, das Vorhandensein von Entzündungszellen und das Vorkommen von verschiedenen Reifungsstadien der mesenchymalen Zellreihe in einem Präparat.

6. Diagnostische Sicherheit der Zytologie bei mesenchymalen Proliferationen

Verschiedene Studien der Tier- und Humanmedizin untersuchten die diagnostische Sicherheit zytologischer Diagnosen bei mesenchymalen Proliferationen und kommen dabei zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen.

In einer Untersuchung von WURM et al. (1993) stimmen die Ergebnisse der zytologischen Untersuchung mesenchymaler Tumoren in höherem Maße mit der Histologie überein als diejenigen der epithelialen Tumore. GRIFFITH et al. (1984) untersuchte 147 Hauttumoren von Hunden sowohl histologisch als auch zytologisch. 75% der epidermalen Tumoren wurden zytologisch richtig diagnostiziert, dagegen nur 50 % der mesenchymalen Tumoren. Er erklärt die Schwierigkeit, mesenchymale Proliferationen korrekt zu diagnostizieren damit, dass bei der FNAB

mesenchymaler Tumoren nur wenig Zellen gewonnen werden, und diese morphologisch wenig deutliche Hinweise auf Malignität geben (GRIFFITH et al. 1984). Auch MENARD et. al. (1986) schätzen die diagnostische Sicherheit mesenchymaler Proliferationen geringer ein, als die anderer Tumoren. Er führt dieses auf die geringe Zellularität und den hohen Differenzierungsgrad der Fibroblasten zurück. In der Humanmedizin wurden zu Beginn der 80er Jahre Studien durchgeführt, in denen die diagnostische Genauigkeit der FNAB bei der Untersuchung von Bindegewebstumoren ermittelt wurde. Der Nutzen der FNAB zur Diagnose von Bindegewebstumoren wird unterschiedlich eingeschätzt. Nach HAJDU und MELAMED (1984) ist nur die Diagnose eines malignen Tumors zuverlässig. Andere Studien ergaben eine hohe diagnostische Sicherheit für sowohl gutartige als auch bösartige Tumoren (FELDMAN und COVELL 1983; LAYFIELD et al. 1986; MIRALLES et al. 1986; NGUYEN 1988; AKERMAN 1997).

LAYFIELD et al. (1986) gibt in seiner Untersuchung für die Bestimmung der Dignität eine Sensitivität und Spezifität von 95 % an. Als Ursachen für fehlerhafte Diagnosen nennt er die Zellarmut der Präparate, sowie die Schwierigkeit, gut differenzierte Sarkome vom umgebenden Bindegewebe zu unterscheiden.

AKERMAN (1997) erklärt falsche Diagnosen seiner Untersuchung mit der Aspirationslokalisation, bei der kein Tumorgewebe aspiriert wurde, sondern reaktiv verändertes Gewebe im Tumorgebiet.