

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material

1.1 Aufbau der Untersuchung

Die zytologische Diagnosestellung mesenchymaler Proliferationen erweist sich als problematisch, da es schwierig ist, Fibrosarkome von entzündlichen oder reparativen Prozessen zu unterscheiden. Ziel dieser Arbeit war es, zytologische Diagnosekriterien für Fibrosarkome und benigne mesenchymale Proliferationen zu untersuchen und ihre statistische Signifikanz zu überprüfen. Dazu wurden zytologische Kriterien bei Fibrosarkomen, chronischen Entzündungen und Narbengewebe systematisch untersucht.

Die zytologischen Präparate von Fibrosarkomen und chronischen Entzündungen entstammten dem Archiv der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU-Berlin aus den Jahren 1988 - 2000. Die Diagnosen waren durch eine histologische Untersuchung von extirpierten Geweben oder Gewebebiopsien, im Institut für Veterinärpathologie der FU Berlin, gesichert. Präparate der Narbengewebe wurden von der Untersucherin erstellt und stammten von Hunden, die in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere operiert wurden.

1.2 Gewinnung von Präparaten aus Narbengewebe

Es wurden Narbengewebe von Hunden punktiert, bei denen eine orthopädische Operation durchgeführt worden war. Bei den Patienten durften keine neoplastischen Erkrankungen vorliegen und die Wundheilung musste komplikationslos verlaufen. Die Narben wurden zwischen dem 5. und 10. Tag post operationem punktiert. Für die Feinnadelaspiration wurde eine 19G Nadel (1.0x30mm) und eine 10 ml Spritze verwendet. Die entsprechende Stelle wurde mit Alkohol desinfiziert und in mehreren Richtungen punktiert. Es wurde 1-2x aspiriert. Danach erfolgte ein Druckausgleich durch langsames Zurückgleiten des Spritzenkolbens im Zylinder.

1.3 Fixierung und Färbung

Der Inhalt der Spritze wurde auf einen Objektträger geblasen und mit Hilfe des Nadelausstrichverfahrens ein Monolayer hergestellt. Die Fixierung erfolgte durch Trocknung, anschließend wurde nach Pappenheim (Hemafix[®]-Färbeset, Firma Biomed) gefärbt.

1.4 Patientengut

Es wurden Präparate von insgesamt 75 Hunden zytologisch untersucht. (Fibrosarkom n= 25, chronische Entzündung n= 25, Narben n= 25). Es waren Hunde von 27 Rassen und verschiedene Mischlinge aller Altersstufen vertreten. Das Durchschnittsalter betrug 6,3 Jahre, 50 Tiere waren männlich und 19 weiblich. Bei 6 Tieren lagen keine Angaben zum Geschlecht vor und konnten, da es sich um Archivmaterial handelte, auch nicht nachgefragt werden.

Alle Präparate wurden mit einer vierstelligen Zahl codiert, so dass während der Untersuchung nicht bekannt war, zu welcher Präparatgruppe der jeweilige Ausstrich gehörte.

2. Methoden

Alle Untersuchungen wurden von einem zweiten Untersucher geprüft.

Die Präparate wurden mit dem Lichtmikroskop Axiophot der Firma Zeiss ausgewertet. Die Messung der Zellgrößen erfolgte mit einem Strichkreuzmikrometer der Firma. Dabei wurde das Mikrometer so geeicht, dass eine Einheit in der 1000x Vergrößerung 10 µm entsprach.

Zunächst wurde das ganze Präparat systematisch in einer kleinen Vergrößerung (40x) durchgemustert und zur Auswertung geeignete Bereiche gesucht. Mit Hilfe der 400x Einstellung erfolgten die quantitativen Messungen der Zellpopulation. In der 1000x Vergrößerung unter Ölimmersion wurden quantitative Untersuchungen von Zellkomponenten und qualitative Bestimmungen von zytologischen Kriterien durchgeführt sowie die Zellgrößen bestimmt.

2.1 Allgemeine Merkmale

2.1.1 Qualität des Präparates

Zunächst wurde die Qualität des Präparates beurteilt. Es sollte ein Monolayer vorliegen, um Kern und Zytoplasmastrukturen der Zellen beurteilen zu können. Die Qualität der Färbung wurde berücksichtigt. Präparate mit mangelhafter Färbung, einem hohen Anteil an postvitalen Veränderungen oder Quetschartefakte wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Das Merkmal Qualität wurde in zwei Gruppen eingeteilt:

- 1 = Qualität ausreichend: nicht alle Bereiche des Präparates eignen sich zur Beurteilung, aber es sind ausreichend Bereiche mit guter Qualität vorhanden. Z.T. Bereiche mit mangelhafter Färbung, dickem Ausstrich, Quetschartefakte oder postvitalen Veränderungen.
- 2 = Qualität gut

2.1.2 Zellgehalt

Der Zellgehalt wurde in der 400 x Vergrößerung bestimmt:

- 1 = geringgradiger Zellgehalt: Präparate mit < 10 Zellen pro Gesichtsfeld.
- 2 = mittelgradiger Zellgehalt: Präparate mit > 10 Zellen pro Gesichtsfeld.
- 3 = hoher Zellgehalt: Präparate mit >100 Zellen pro Gesichtsfeld.
- Präparate mit einem zu geringen, oder zu hohen Zellgehalt, bei dem die Zellen nicht mehr in einem Monolayer vorlagen, wurden nicht untersucht.

2.1.3 Blutkontamination

Das Vorkommen von Blutkontamination wurde in vier Gruppen unterteilt:

- 0 = keine Blutkontamination,
- 1 = wenig Blutkontamination, pro Gesichtsfeld < 10 Erythrozyten,
- 2 = mittlere Blutkontamination, pro Gesichtsfeld 10 - 20 Erythrozyten,
- 3 = hohe Blutkontamination, pro Gesichtsfeld > 21 Erythrozyten.

2.1.4 Bakterien

Der Gehalt an Bakterien im Präparat wurde beurteilt:

- 0 = keine Bakterien im Präparat vorhanden, 1 = Bakterien vorhanden.

2.2 Zellpopulation

Für die Beurteilung der Anteile einzelner Zellpopulationen wurden pro Präparat 100 Zellen ausgezählt. Es wurden Fibroblasten, Fibrozyten, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Lymphoblasten, Plasmazellen und Makrophagen quantifiziert. Um die Gesamtzellpopulation zu erfassen, wurden die Zellen in einer zufälligen Verteilung über 5 - 8 Gesichtsfelder ausgezählt.

2.3 Eigenschaften der Fibroblasten

2.3.1 Verhältnis von Fibroblasten zu Fibrozyten

Zur Bestimmung des Verhältnisses von Fibroblasten und Fibrozyten wurden 100 Bindegewebszellen ausgezählt.

2.3.2 Größenmessungen der Fibroblasten

Pro Präparat wurden von 25 Fibroblasten mit Hilfe eines Mikrometers die maximale Länge, die maximale Breite und die maximale Kernlänge bestimmt. Es eigneten sich nur Zellen mit deutlicher Begrenzung zur Auswertung. Dabei wurde eine zufällige Auswahl, unabhängig von Form und Größe der Zellen getroffen.

2.3.3 Anteil rundzelliger Fibroblasten

Rundzellige Fibroblasten weisen Kerne auf, die ihre Bohnenform verlieren und sich abrunden. Das Zytoplasma rundet sich ebenfalls ab. Der Anteil der rundzelligen/rundkernigen Fibroblasten bei 100 ausgezählten Fibroblasten wurde bestimmt.

2.3.4 Kern - Plasma - Verhältnis

Zur Bestimmung des Kern - Plasma - Verhältnis wurden die durchschnittlichen Längsdurchmesser von Zelle und Kern ins Verhältnis gesetzt. Pro Präparat wurde von 25 Zellen das Kern - Plasma - Verhältnis bestimmt und daraus der Mittelwert gebildet.

2.4 Kerneigenschaften

2.4.1 Mitosen

Die Mitosehäufigkeit wurde bei 100 Fibroblasten untersucht.

2.4.2 Zellnekrose

Bei den Fibroblasten wurden Nekrosen in der 1000 x Vergrößerung bestimmt und in 4 Gruppen eingeteilt: 0 = keine Zellnekrose; 1 = wenig Zellnekrose: einzelne Fibroblasten nekrotisch; 2 = mittlere Zellnekrose: Areale, in denen bis zu einem Drittel aller Fibroblasten nekrotisch waren; 3 = starke Zellnekrose: Areale mit mehr als einem Drittel aller Fibroblasten nekrotisch.

2.4.3 Anzahl der Kerne

Von 100 Zellen wurde die Anzahl der mehrkernigen Zellen bestimmt und codiert:

0 = ein Kern pro Zelle, 1 = bis zu 10 % mehrkernige Zellen, 2 = mehr als 10 % mehrkernige Zellen.

2.4.4 Chromatinstruktur

Die Chromatinstruktur wurde bei ebenfalls n=100 Zellen beurteilt:

0 = fein granulär: das Chromatin durchzieht als feiner Faden den Kern.

1 = granulär: die Kernstruktur ist gleichmäßig mit etwas dickeren Chromatinfäden.

2 = grob granulär: die Chromatinfäden ziehen als dicke Stränge durch den Kern.

3 = verklumpt: kondensierte Chromatinklumpchen verteilen sich über den Kern.

4 = kondensiert: das Chromatin ist kondensiert.

2.4.5 Kernmembranverdickung

Der Anteil an Fibroblasten mit Kernmembranverdickung wurde bei n =100 untersuchten Zellen bestimmt.

0 = keine Kernmembranverdickung,

1 = sehr wenig Zellen mit Kernmembranverdickung (< 5 %),

2 = viele Zellen mit Kernmembranverdickung (>5 %)

2.4.6 Kernfarbe

Der Grad der Basophilie wurde bestimmt und eingeteilt in:

1 = gering basophil oder 2 = deutlich basophil.

2.4.7 Nukleoli

Die Deutlichkeit der Nukleoli wurde ermittelt:

0 = kaum erkennbar, 1 = erkennbar, 2 = deutlich erkennbar.

Die Farbe wurde folgendermaßen beschrieben:

1 = grau, 2 = rot, 3 = hellblau, 4 = dunkelblau.

Die Form der Nukleoli wurde als 1 = überwiegend rund beurteilt, wenn 80 % der Nukleoli rund waren. Ein Anteil von mehr als 20 % eckigen Nukleoli wurde als

2 = Vorkommen von eckigen Nukleoli bestimmt.

2.5 Zytoplasmeeigenschaften

2.5.1 Deutlichkeit der Zellgrenzen

Die Deutlichkeit der Zellgrenzen wurde eingeteilt in:

0 = Zellgrenzen nicht zu erkennen,

1 = Zellgrenzen undeutlich, auch bei längerem Betrachten nicht immer eindeutig erkennbar,

2 = Zellgrenzen deutlich, bei längerem Betrachten eindeutig zu erkennen,

3 = Zellgrenzen sehr deutlich, sofort zu erkennen.

2.5.2 Farbe Zytoplasma

Die Farbe des Zytoplasmas wurde unterteilt in:

1 = Zytoplasma blass, 2 = Zytoplasma vermehrt basophil.

2.5.3 Vakuolen im Zytoplasma

Das Vorkommen von Vakuolen im Zytoplasma wurde beschrieben mit:

0 = keine Vakuolen erkennbar,

1 = wenig Vakuolen erkennbar, einzelne Zellen enthalten Vakuolen,

2 = viele Vakuolen erkennbar, ein deutlicher Anteil an Zellen enthält Vakuolen,

3 = sehr viele Vakuolen erkennbar, die Mehrheit der Zellen enthalten Vakuolen.

2.6 Fibroblastenassoziiertes Kollagen

Fibroblasten scheiden eine kollagene extrazelluläre Matrix aus, die als roter unregelmäßiger Hof um die Fibroblasten, oder in Fibroblastenaggregaten zu erkennen sind. Das Vorkommen und die Menge von fibroblastenassoziiertem Kollagen wurde quantifiziert mit:

0 = keine Matrix,

1 = wenig Matrix: in weniger als jedem 2. Gesichtsfeld bei 200 x Vergrößerung war fibroblastenassoziiertes Kollagen zu erkennen,

2 = viel Matrix: In mindestens jedem 2. Gesichtsfeld bei 200 x Vergrößerung war fibroblastenassoziiertes Kollagen zu erkennen.

2.7 Untersuchung der Malignitätskriterien

Die Anzahl der im Präparat vorkommenden Malignitätskriterien wurde bestimmt und einzeln aufgeführt:

0 = keine Malignitätskriterien im Präparat zu erkennen, 1 = Anisozytose,
2 = Anisokaryose, 3 = Makrokaryose, 4 = Makronukleoli, 5 = Anisonukleoliose,
6 = eckige Nukleoli, 7 = Kernmembranverdickung, 8 = Kernwandeinpressung,
9 = pathogene Mitose, 10 = Chromatinverklumpung, 11 = zytoplasmatische Basophilie.

Tab. 3: Untersuchungsprotokoll der zytologischen Untersuchung

Präparat Nr.: _____

Datum der Untersuchung: _____

Qualität des Präparates (0-2)	1= Qualität ausreichend, 2= Qualität gut,
Zellgehalt (1-3)	1= geringgradiger Zellgehalt, 2= mittelgradiger Zellgehalt, 3= hoher Zellgehalt
Blutkontamination (0-3)	0= keine Blutkontamination, 1= wenig Blutkontamination, 2= mittlere Blutkontamination, 3= hohe Blutkontamination
Bakterien (0-1)	0= keine Bakterien vorhanden, 1= Bakterien vorhanden
Zellpopulation: n=100	
Fibroblasten (%)	
Fibrozyten (%)	
Neutrophile (%)	
Makrophagen (%)	
Lymphozyten (%)	
Lymphoblasten (%)	
Plasmazellen (%)	
Ø Längendurchmesser n=25 (10µm)	
Ø Zellquerschnitt n=25 (10µm)	
Ø Kernlänge n=25 (10µm)	
Verhältnis Fibroblasten: Fibrozyten, n=100	
Anteil rundzellige Fibroblasten, n=100	
Kern/Plasmarelation	
Mitosen (%)	
Zellnekrose (0-3)	0= keine Nekrose, 1= wenig Nekrose, 2= mittelgradige Nekrose, 3= starke Nekrose
Anzahl Kerne pro Zelle, n=25 (0-2)	0= ein Kern pro Zelle, 1= bis 10% mehrkernige Zellen, 2= mehr als 10% mehrkernige Zellen

Chromatinstruktur (0-4)	0= fein granulär, 1= granulär, 2= grob granulär, 3= verklumpt, 4= kondensiert
Kernmembranverdickung (0-2)	0= keine Kernmembranverdickung, 1= sehr wenig Zellen mit Kernmembranverdickung, 2= viele Zellen mit Kernmembranverdickung
Kernfarbe (0-1)	1= gering basophil, 2= deutlich basophil
Deutlichkeit Nukleoli (0-2)	0= Nukleoli kaum erkennbar, 1= Nukleoli erkennbar, 2= Nukleoli deutlich erkennbar
Nukleoli pro Kern n=25 (1-3)	
Farbe Nukleoli (1-4)	1= grau, 2= rot, 3= hellblau, 4=dunkelblau
Form Nukleoli (1-2)	1= überwiegend rund, 2=Vorkommen von eckigen Nukleoli
Deutlichkeit Zellgrenzen (0-3)	0= Zellgrenzen nicht zu erkennen, 1= Zellgrenzen undeutlich, 2= Zellgrenzen deutlich, 3= Zellgrenzen sehr deutlich
Farbe Zytoplasma (1-3)	1= Zytoplasma blass, 2= Zytoplasma leicht basophil, 3= Zytoplasma deutlich basophil
Vakuolen im Zytoplasma (0-3)	0= keine Vakuolen erkennbar, 1= wenig Vakuolen erkennbar, 2= viele Vakuolen erkennbar, 3= sehr viele Vakuolen erkennbar
Matrix (0-2)	0= keine Matrix, 1= wenig Matrix, 2= viel Matrix
Anzahl Malignitätskriterien (0-6)	
Beschreibung Malignitätskriterien (0-11)	0= keine Malignitätskriterien, 1= Anisozytose, 2= Anisokaryose, 3= Makrokaryose, 4= Makronukleoli, 5= Anisonucleollose, 6= eckige Nukleoli, 7= Kernmembranverdickung, 8= Kernwandeinpressung, 9= pathogene Mitose, 10= Chromatinverklumpung, 11= zytoplasmatische Basophilie

3. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS Version 10.0 im Institut für Biometrie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Die erhobenen Daten wurden mittels deskriptiver und schließender Statistik beurteilt. Da die Merkmale der drei untersuchten Gruppen von verschiedenen Individuen stammen, handelt es sich um unabhängige Stichproben. Die Merkmale waren z. T. ordinal, z. T. metrisch skaliert. Bei den metrisch skalierten Merkmalen konnte nicht davon ausgegangen werden, dass sie normalverteilt waren, insbesondere nicht bei prozentualen Angaben. Aufgrund dieser Bedingungen wurde zum Lagevergleich der drei Gruppen der Kruskal-Wallis Test als verteilungsfreies varianzanalytisches Verfahren für die metrischen Merkmale gewählt. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ festgelegt ($p < 0,05$).

Wurden signifikante Unterschiede beim Kruskal-Wallis Test festgestellt, diente der Mann-Whitney Test zum gezielten Vergleich zweier Gruppen. Für diesen Test wurde das Signifikanzniveau bei den Paarvergleichen um ein Drittel auf 1,7 % reduziert.

Die graphische Darstellung der Lage- und Streuungsmaße erfolgte durch Boxplots. Sie geben die 25 %-, 50 %-(Median) und 75 %-Punkte an. Die Whisker reichen bis zum letzten Messwert, der nicht weiter als die 1,5-fache Boxlänge von der Box entfernt ist. Alle Punkte, die weiter entfernt sind, werden als Einzelpunkte gezeichnet.

Bei den ordinalen Merkmalen wurden die Häufigkeitsverteilungen ermittelt und die Gruppen mit Hilfe von Chi-Quadrat Tests verglichen. Die Häufigkeiten wurden als gruppierte Histogramme dargestellt.

Die Anzahl der Malignitätskriterien wurde in zwei Gruppen zusammengefasst: Vorkommen von bis zu drei Malignitätskriterien und Vorkommen von mehr als 3 Malignitätskriterien, ihre Signifikanz wurde mittels Chi-Quadrat Test bestimmt.