

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1.1 Untersuchte Tiere

Zur Untersuchung gelangen 31 Hündinnen, die in der Klinik für Kleine Haustiere der Freien Universität Berlin zur Operation aufgrund von Umfangsvermehrungen in der Mammaleiste eingestellt werden. Sie sind zum Zeitpunkt der Operation zwischen 5 und 14 Jahren alt. Der Vorbericht baut auf den Angaben der Besitzer sowie den Patientendaten der Klinik auf.

3.1.1.2 Ultraschallapparatur

Zur Ultraschalluntersuchung wird das Gerät SIGMA 44 HVCD der Firma Kontron Instruments verwandt. Als Schallkopf kommt ein mechanischer Sektorschallkopf mit einer Frequenz von 7,5 Mhz und einer verstellbaren Eindringtiefe von zwei bis zehn Zentimetern zum Einsatz, dem eine Vorlaufstrecke aus dem Material Proxon der Firma Sonokit aufgesetzt wird.

Als Monitor dient der Farbmonitor EUM – 1491 A der Firma Mitsubishi.

Es steht zusätzlich der VHS-Videorecorder AG 5000700 der Firma Panasonic sowie der Video Copy Processor P 67 E der Firma Mitsubishi, der mit dem Filmmaterial „high density printing paper Type II UPP-110 mm HD, 110 mm x 20 m“ bestückt ist, zur Verfügung.

Als Kontaktgel wird das Sonogel® der Sonogel Vertriebs GmbH benutzt.

3.1.1.3 Operationsmaterial

Bei 25 Hündinnen wird die gesamte untersuchte Mammaleiste entfernt. Bei einer Hündin werden die inguinalen und kaudalen abdominalen Komplexe beider Seiten, bei einer Hündin der von der Veränderung betroffene Komplex und bei einer weiteren Hündin nur der aufgefallene Knoten operativ entfernt. Ein Tier kommt ein zweites Mal zur Untersuchung, wobei die kontralaterale Mammaleiste untersucht und komplett entfernt wird. Bei drei Hündinnen steht die Mammaleiste nicht zur histologischen Untersuchung zur Verfügung.

Insgesamt werden von diesen 28 Hündinnen 167 histologische Präparate angefertigt, die keine neoplastischen Bezirke aufweisen und mit den korrelierenden Ultraschallaufnahmen verglichen werden können.

3.1.2 Untersuchungsmethode

3.1.2.1 Erfassung des Vorberichtes

Der Vorbericht wird durch ein Gespräch mit den Patientenbesitzern erhoben. Diese werden zu folgenden Themen befragt:

- a) *Rasse des Tieres*
- b) *Alter des Tieres*
- c) *Geschlecht*
- d) *Kastration, wenn ja, wann*
- e) *Vorbehandlung, besonders Östrogene / Gestagene*
- f) *Läufigkeit*
 - *letzte Läufigkeit*
 - *Abstand zwischen den Läufigkeiten*

g) Zyklusunregelmäßigkeiten

- *verlängerte Läufigkeit*
- *unregelmäßige Abstände zwischen den Läufigkeiten*
- *Endometritis / Pyometrakomplex*

h) Scheinträchtigkeit

- *keine feststellbar*
- *geringgradige morphologische und / oder Verhaltensänderungen*
- *auffallende morphologische und / oder Verhaltensänderungen*
- *Auftreten der Scheinträchtigkeit regelmäßig*
- *Auftreten der Scheinträchtigkeit unregelmäßig*

*i) Anzahl der bisherigen Trächtigkeiten**j) letzte Trächtigkeit**k) erstmaliges Bemerken der Veränderung(en)***3.1.2.2 Sonographische Untersuchung**

Die Hündinnen werden präoperativ im Bereich des Gesäuges geschoren. Die Mammaleiste wird durchpalpiert und vorhandene, knotenförmige Verhärtungen und andere palpatorisch auffällige Bereiche werden ausgemessen und auf einem Versuchsprotokollbogen eingetragen. Hierbei wird deren Lage und Größe vermerkt. Ebenso wird die Konsistenz sowie die Verschieblichkeit unter der Haut beschrieben.

Anschließend werden die Hündinnen mit dem o. g. Ultraschallgerät systematisch von kranial nach kaudal entlang der Mammaleiste untersucht, wobei der Schallkopf quer zur Körperachse geführt wird. Die Hündinnen befinden sich bei der Untersuchung in Rückenlage und werden von einem Schaumstoffkissen, welches einen V-förmigen Ausschnitt auf der Liegefläche besitzt, gestützt. Es werden Computerausdrucke der entstehenden Ultraschallbilder über allen Zitzen, ein bis zwei Ausdrucke zwischen den jeweiligen Zitzen sowie zusätzliche Ausdrucke in palpatorisch und / oder sonographisch auffälligen Bereichen angefertigt und deren Lage protokolliert. Ebenfalls werden Videoaufzeichnungen der gesamten Untersuchung gemacht.

3.1.2.3 Herstellung der histologischen Präparate

3.1.2.3.1 Fixierung

Nach der operativen Entfernung des Mammagewebes wird dieses sofort in Formalin (4 %) verbracht und für mindestens 48 Stunden fixiert.

3.1.2.3.2 Pathologisch-anatomische Untersuchung

Von der fixierten Mammaleiste werden mit Hilfe eines Skalpell ca. 5 - 10 mm dicke Abschnitte angefertigt, deren Lage mit den Ultraschallbildern übereinstimmt. Diese Abschnitte werden makroskopisch untersucht. Dabei wird auf die Farbe und Konsistenz des Gewebes sowie eventuelle Herdbefunde geachtet und diese beschrieben. Ebenso wird die Größe der Herdbefunde sowie deren Abgrenzbarkeit vom umgebenden Gewebe bestimmt.

3.1.2.3.3 Einbettung

Von den untersuchten Abschnitten des Mammagewebes werden 3 - 5 mm dicke Schnitte hergestellt und diese routinemäßig in Paraffin eingebettet.

3.1.2.3.4 Schnitthanfertigung

Von den Paraffinblöckchen werden jeweils 4 Schnitte mit einer Dicke von 3 - 5 μm auf einem Schlittenmikrotom (Fa. Jung, Heidelberg) angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Auch hierbei wird wieder darauf geachtet, dass die Ausrichtung der Schnitte mit der Ausrichtung der Ultraschallbilder korreliert. Anschließend werden die Schnitte auf den Objektträgern im Brutschrank bei 37° C über Nacht getrocknet.

3.1.2.3.5 Histologisches Darstellungsverfahren

Die angefertigten Schnitte werden routinemäßig H.-E. entsprechend folgender Vorlage gefärbt:

1. Schnitte entparaffinieren (10 min mit Xylol, absteigende Alkoholreihe:
2 x 100 %, 2 x 96 %, 1 x 70 %)
2. kurz H₂O
3. 6 min Hämatoxylin nach Hansen
4. kurz H₂O
5. kurz HCl-Alkohol zum Differenzieren
6. 10 min fließend wässern
7. 10 sek alkoholisches Eosin
8. aufsteigende Alkoholreihe (1 x 70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 %iger Alkohol)
9. Xylol bis zum Eindeckeln

Die so hergestellten Schnitte dienen der Stellung der histologischen und histopathologischen Diagnosen sowie dem Vergleich mit der Sonographie.

3.1.2.4 Beurteilungskriterien der histologischen Präparate

Bei der mikroskopischen Musterung der Präparate werden verschiedene Kriterien zur Beurteilung herangezogen. Zuerst wird ein allgemeiner Überblick vorgenommen. Liegen herdförmige Veränderungen vor, werden deren Größe, Form und die beteiligten Gewebsarten festgestellt. Es wird geprüft, ob die Veränderung homogen oder aus mehreren Einzelveränderungen zusammengesetzt ist. Innerhalb der Veränderung werden die verschiedenen Gewebsarten festgehalten. Sind Drüsenzellen vorhanden, werden sie nach ihrer Wachstumsform beurteilt. Diese kann ein- oder zweireihig, alveolär oder zystisch sein. Solides oder ungeordnetes Wachstum sowie Wachstum, das mehr als zweireihig ist, wird als neoplastisch beurteilt und nicht weiter in die

Betrachtung einbezogen. Die Form der Drüsenzellen kann flach, kubisch oder hochprismatisch sein.

Wenn eine Sekretion vorhanden ist, wird deren Menge sowie Beschaffenheit untersucht. Sie kann milchartig oder zellreich sein, wobei Entzündungszellen, Makrophagen oder Drüsenzellen auftreten können. Die Sekretion kann Kristalle sowie Verkalkungen enthalten.

Falls Myoepithel sichtbar ist, wird dieses nach Menge und Lokalisation beurteilt. In dem Falle von metaplastischen Differenzierungsrichtungen des Myoepithels - wie Knorpel oder Knochen - werden diese vermerkt.

Entzündungszellinfiltrate werden nach ihrer Menge und ihrer Lokalisation beschrieben.

Andere Zellbestandteile, die nicht aus dem Mammagewebe hervorgehen, werden beschrieben und deren Lage im Gewebe vermerkt.

In Gewebsbereichen ohne Herdveränderungen werden das Drüsengewebe, das Myoepithel und das Stroma beurteilt. Dabei werden folgende Punkte untersucht:

a) Drüsenepithel:

Beim Drüsenepithel werden die Lage, Dicke, Gleichmäßigkeit, Zellgestalt und Sekretionsprodukte beurteilt. Die Lage kann zwischen der subkutanen und der retromammillären Fettschicht sein. Es kann auch die Bauchmuskelschicht oder die Haut direkt an das Drüsengewebe angrenzen, ebenso können die Fettgewebsschichten fehlen. Die Gleichmäßigkeit beschreibt das Aussehen und die Formation der Drüsenläppchen, sie kann regelmäßig oder unregelmäßig sein. Die Zellgestalt wird wieder als flach, kubisch oder hochprismatisch bezeichnet. Eine Sekretion wird in ihrer Menge beurteilt, ebenso nach ihrem Aussehen und ihren Bestandteilen. Enthaltene Zellen können wiederum Entzündungszellen, Makrophagen und Drüsenepithelien sein. Auch kann eine Kristallisation sowie Verkalkung des Sekretes vorkommen.

b) Myoepithel:

Das Myoepithel wird nur bei Sichtbarsein beschrieben. Seine Lage und Menge wird untersucht. Falls Sekretionsprodukte vorhanden sind, werden sie als myxoide Sekretion oder als Knorpel- oder Knochenmetaplasien bezeichnet.

c) Stroma:

Die Beschreibung des Stromas beinhaltet dessen Menge, Dichte, Zellreichtum, Zellarten und Gefäßreichtum. Die Menge bezieht sich vor allem auf die Relation zum Drüsengewebe. Die Dichte kann aufgelockert, gleichmäßig oder verdichtet sein. Der Zellreichtum beschreibt die Menge der vorhandenen Zellen. Auftretende Zellarten können Entzündungszellen, Makrophagen, Fibrozyten und Fibroblasten sein. Der Gefäßreichtum sowie das Kaliber der Gefäße wird beurteilt.

Zusätzlich auftretende Gewebsarten werden nach ihrer Menge und Ausprägung beschrieben.

3.1.2.5 Beurteilungskriterien für die sonographischen Aufnahmen

Bei der Beurteilung der sonographischen Aufnahmen werden Kriterien angewandt, die denen der Humanmedizin entsprechen. Das Parenchymmuster wird nach seiner Echodichte, seiner Homogenität und seiner Echostruktur bewertet.

Bei dem Kriterium Echodichte kommen die Ausprägungen „echoreich“, „mittelechoreich“, „echoarm“ und „echofrei“ in Betracht. Unter einem echoreichen Parenchymmuster wird ein Bild mit starken, d. h. hellen Signalen verstanden. Die Beschreibung „echoarm“ beinhaltet ein Bild mit vorhandenen, jedoch wenig ausgeprägten Signalen. „mittelechoreich“ bezeichnet eine Struktur, deren Echodichte zwischen den Ausprägungen „echoreich“ und

„echoarm“ liegt. Als „echofrei“ wird ein Parenchym ohne erkennbare Signale bezeichnet.

Die Homogenität eines Parenchyms wird als „homogen“ oder „inhomogen“ bezeichnet. Bei der Beurteilung „homogenes Muster“ sind die Echosignale gleichmäßig über das Bild verteilt. Ein „inhomogenes Muster“ zeigt eine unregelmäßige Verteilung der Signale.

Die Echostruktur kann die Ausprägung „feinkörnig“ oder „grobkörnig“ haben. „Feinkörnig“ bezeichnet eine Struktur, bei der das Gewebe kleine, feine Signale gibt. Als grobkörnig wird ein Echomuster dann bezeichnet, wenn die Signale eine grobe Struktur erkennen lassen.

Des Weiteren wird geprüft, ob ein Herdbefund vorliegt. Dieser wird definiert als abgegrenzte, sich in der Echostruktur und / oder der Echodichte vom umliegendem Gewebe abhebende Struktur.

Falls ein Herdbefund gefunden wird, wird dessen Größe angegeben. Seine Randkontur wird beurteilt, wobei auf die Form, die Abgrenzbarkeit zum Umgebungsgewebe und den Randsaum geachtet wird. Die Form kann regelmäßig oder unregelmäßig, die Abgrenzbarkeit gut oder schlecht und der Randsaum scharf begrenzt oder unscharf sein.

Das retrotumoröse Schallverhalten wird vermerkt. Es kann eine dorsale Schallverstärkung, ein dorsaler Schallschatten, ein Schallrandschatten oder eine unveränderte Echostruktur auftreten.

Die Echostruktur sowie die Echodichte innerhalb des Herdbefundes werden ebenso beurteilt wie bereits für das Parenchymmuster beschrieben.

3.1.2.6 Klassifikation des gesunden Gewebes

Es kommen verschiedene für die unterschiedlichen Zyklusstadien und Altersstufen typischen Gewebsformationen in Betracht.

1. Gut entwickeltes Mammagewebe mit deutlicher Sekretion:

Das Drüsengewebe dominiert das Bild, es ist nur ein geringer Bindegewebsanteil vorhanden. Eine milchartige Sekretion wird in der überwiegenden Anzahl der Läppchen sowie in den Milchsammelgängen gefunden.

2. Gut entwickeltes Mammagewebe ohne oder mit geringer Sekretion:

Auch hier überwiegt der Drüsengewebsanteil. Eine milchartige Sekretion wird nicht oder nur in wenigen Läppchen vorgefunden.

3. Inaktives Mammagewebe:

In dieser Gruppe findet sich ein Bild, bei dem das Drüsengewebe und das Bindegewebe jeweils einen ausgewogenen Anteil des Mammagewebes ausmachen. Eine Sekretion wird nicht beobachtet. In einigen Sammelgängen können sich Reste von milchartigem Sekret befinden.

4. Involuiertes Mammagewebe:

Hier zeigt sich das Bindegewebe als beherrschendes Element der Mamma. Das Drüsengewebe ist nur in Resten vorhanden. Auch hier wird in den Alveolen keine Sekretion beobachtet, jedoch können ebenfalls noch Reste von milchartiger oder zellreicher Sekretion in einzelnen Milchsammelgängen vorhanden sein.

3.1.2.7 Klassifikation des nichtneoplastisch veränderten Gewebes

Die Schnitte werden begutachtet und in die Klassifikation nach GUTBERLET (1994) eingeordnet.

Zusätzlich zu den genannten Diagnosen treten Veränderungen auf, die nicht direkt von dem Gewebe der Mamma ausgehen, aber aufgrund ihrer

Lokalisation klinisch nicht immer von ihnen zu unterscheiden sind. Zu diesen gehören zum Beispiel Hauttumore und Inguinalhernien (MANN 1984). Auch vergrößerte Lymphknoten sind hier möglich. Daher werden diese Veränderungen in dieser Arbeit noch mit einem siebten Punkt hinzugefügt.

1. Zysten
2. Fibrosklerose
3. Gynäkomastie
4. nichtentzündliche lobuläre Hyperplasie
5. entzündliche lobuläre Hyperplasie
6. Myoepithelhyperplasie
7. nichtneoplastische Läsionen, die nicht vom Gewebe der Mamma ausgehen.

3.1.2.8 Bezeichnung der Drüsenkomplexe

Die einzelnen Drüsenkomplexe werden von kranialer in kaudaler Richtung als kranialer thorakaler (T1), kaudaler thorakaler (T2), kranialer abdominaler (A1), kaudaler abdominaler (A2) und inguinaler Komplex (I) bezeichnet. Die Seitenangaben „rechts“ und „links“ beziehen sich auf die Körperhälften des Tieres.

Zum Verständnis der Abkürzungen dient folgendes Schema:

	kranial		
	T1	T1	
	T2	T2	
rechts	A1	A1	links
	A2	A2	
	I	I	
	kaudal		

3.1.2.9 Vergleich der palpatorischen, sonographischen, pathologisch-anatomischen und histologischen Ergebnisse

Um die Ergebnisse der Untersuchungen zu vergleichen, werden während der histologischen Befundung die Ergebnisse der palpatorischen, sonographischen und pathologisch-anatomischen Untersuchungen betrachtet und direkt mit dem histologischen Bild in Zusammenhang gesetzt. Korrelationen zwischen den einzelnen Befunden werden vermerkt. So wird versucht, einzelne strukturelle Auffälligkeiten der Ultraschallbilder in einen Zusammenhang mit den anderen Untersuchungen zu setzen. Auf diese Art und Weise können zu bestimmten histologischen Befunden passende sonographische Standardbilder erstellt werden.