

Über die Feinstruktur von Mammamischtumoren der Hündin

I. Das Vorkommen von Myoepithelzellen in myxoiden Arealen

D. v. Bomhard und J. v. Sandersleben

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. J. v. Sandersleben)

Eingegangen am 16. Dezember 1972

The Ultrastructure of Mixed Mammary Gland Tumours in Bitches

I. The Incidence of Myoepithelial Cells in Myxoid Areas

Summary. The myxoid areas of 5 mixed mammary tumours taken from female dogs were studied by light and electron microscopy to determine the nature of the cells in these areas. The EM findings indicate that they are neoplastic myoepithelial cells. These cells are characterized by their abundant fibrils, broad endoplasmic cisterns, and distinct Golgi complexes, and contain glycogen in their cytoplasm. The findings indicate that the intercellular myxoid substance is a product of these neoplastic myoepithelial cells.

Zusammenfassung. Es wurden licht- und elektronenmikroskopisch myxoiden Areale aus 5 Mammamischtumoren von Hündinnen mit dem Ziel untersucht, die Natur der Zellen in diesen Bezirken abzuklären. Die elektronenmikroskopischen Befunde sprechen dafür, daß es sich um neoplastische Myoepithelzellen handelt. Die Zellen zeichnen sich durch reichlich Fibellen und Glykogen im Cytoplasma sowie durch weite endoplasmatische Zisternen und deutliche Golgikomplexe aus. Es wird die Ansicht vertreten, daß die myxoiden Zwischensubstanz ein Produkt der tumorös entarteten Myoepithelzellen darstellt.

Mammatumoren gehören zu den häufigsten Geschwülsten beim Hund (Dahme und Weiss, 1958; v. Sandersleben, 1963; Misdorp, 1972). Ein nicht unerheblicher Teil dieser Blastome wird zu den Mischtumoren gerechnet. Neben epithelialen Zellverbänden drüsiger Struktur finden sich Zellgruppen in retikulärem Verband bzw. myxoiden, knorpeligen oder knöcherne Gewebsanteile, die häufig auch nebeneinander im gleichen Tumor vorkommen. Alle angesprochenen Komponenten können unterschiedlich ausgereift sein, so daß auch carcinomatöse und sarkomatige Bilder beobachtet werden.

Vergleichbare Tumoren beim Menschen sind die als „Mischtumoren“ oder „Pleomorphe Adenome“ (Seifert, 1966) bezeichneten Speicheldrüsengeschwülste. Bei diesen konnte mit Hilfe histochemischer (Azzopardi und Smith, 1959) und elektronenmikroskopischer (Oota und Takahashi, 1958; Mylius, 1960; Doyle *et al.*, 1968; Hübner, 1971) Untersuchungen nachgewiesen werden, daß die Myoepithelien der Drüse sich am Tumorgeschehen beteiligen. Analog wird angenommen, daß es auch bei den Mammamischtumoren der Hündin über eine Proliferation von Myoepithelien zur Ausbildung „mesenchymaler“ Strukturen kommt (Peyron, 1924; Hamperl, 1939; Cotchin, 1958). Auch histochemische Befunde weisen in diese Richtung (Erichsen, 1955a, b). Da bislang jedoch elektronenmikroskopische Untersuchungen derartiger Tumoren der Hündin noch ausstehen, haben wir zunächst

reife myxoide Areale aus 5 Mammamischtumoren submikroskopisch mit dem Ziele untersucht, die Rolle der Myoepithelien bei der Bildung derartiger Strukturen abzuklären.

Material und Methode

Es wurde Gewebe aus 5 Mammamischtumoren von Hündinnen wie folgt zur Untersuchung vorbereitet.

1. Für lichtmikroskopische Untersuchungen: Paraffinschnitte gefärbt mit: Hämatoxylin-Eosin, Alcian-grün, PAS, Best-Carmin nach Fixation nach Gendre; Gefrierschnitte: Fettrot 7b.

2. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen: Dünne Gewebsscheiben von maximal 1 mm Dicke wurden unmittelbar nach der operativen Entfernung des Tumors mindestens 4 Std in 6,25%igem Glutaraldehyd bei 4°C vorfixiert und gründlich in 0,1 m Phosphat-Puffer pH 7,3 mit Saccharosezusatz gewaschen. Nach Fixation mit 1%igem Osmiumtetroxyd schloß sich die Kontrastierung mit 0,25%igem wäßrigen Uranylacetat, Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und schließlich Einbettung mit Durcupan ACM in kleinen Plastikformen an.

Zur Orientierung wurden etwa 3 μ dicke Schnitte auf einem Tetrander der Firma Jung hergestellt und 3 min mit Toluidinblau und 2 $\frac{1}{2}$ min mit Saffraninlösung (modifiziert nach Musy *et al.*, 1970) gefärbt. Das im Lichtmikroskop ausgesuchte Areal des Makroblockes wurde mittels eines Hohlfrässers oder einer Säge als Mikroblock herausgearbeitet. Semidünn schnitte und Ultradünn schnitte wurden auf einem Reichertmikrotom Om U2 hergestellt. Die Semidünn schnitte wurden mit Toluidinblau/Saffranin gefärbt, die Dünn schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und in einem Siemens-Elektronenmikroskop IA betrachtet.

Ergebnisse der Untersuchung

1. Lichtmikroskopische Befunde

Die reifen myxoiden Areale stellen sich im allgemeinen als verschieden große, runde, meist deutlich gegen ihre Umgebung durch kollagenes Bindegewebe abgegrenzte Tumorbezirke dar, in denen die Zellen auseinandergerückt und von reichlich Zwischensubstanz umgeben sind (Abb. 1). Letztere erscheint im HE-Präparat und im Toluidinblau/Saffranin-Kunststoffschnitt farblos bis hellrosa und weist in der Alcian-grün-Färbung einen grünlichen Farbton auf; sie verhält sich PAS negativ. In die Zwischensubstanz eingelagert finden sich mehr oder weniger deutlich Fasern, die häufig noch die ursprüngliche Begrenzung der Drüs en läppchen andeuten. Gefäße sind kaum zu sehen. Die Zellen erscheinen im Semidünn schnitt langgestreckt, polymorph mit zahlreichen kleineren oder größeren Ausläufern (Abb. 2). Die Fortsätze benachbarter Zellen können einander berühren. Die Kerne sind oval und häufig gelappt. Im Zelleib finden sich nicht selten Fettvacuolen, sowie große, nicht scharf konturierte, schwach rötlich angefärbte Räume, die ein Großteil des Cytoplasmavolumens einnehmen können. Sie färben sich bei Best-Carmin-Färbung leuchtend rot an.

2. Elektronenmikroskopische Befunde

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigt — wie auch lichtmikroskopisch erkennbar —, einzeln liegende Zellen, die meist langgestreckt und von einer wenig elektronendichten Substanz umgeben sind (Abb. 3a). In dieser Matrix finden sich einzeln, gebündelt oder haufenweise Kollagenfasern von unterschiedlichem Durchmesser und verschiedener Länge. Kurze Stücke solcher Fasern

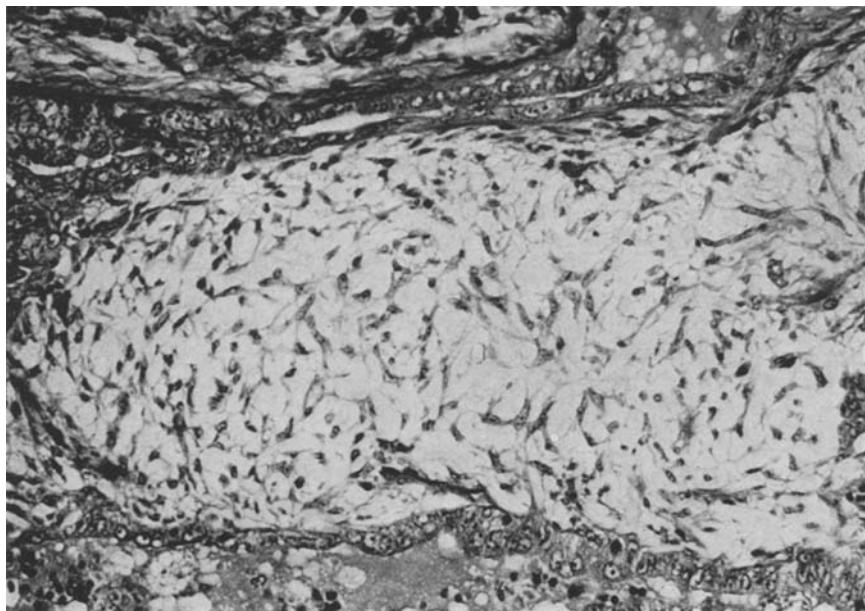


Abb. 1. Myxoides Areal eines Mammamischtumors der Hündin. HE, Zeiss-Photomikroskop
ca. 160×

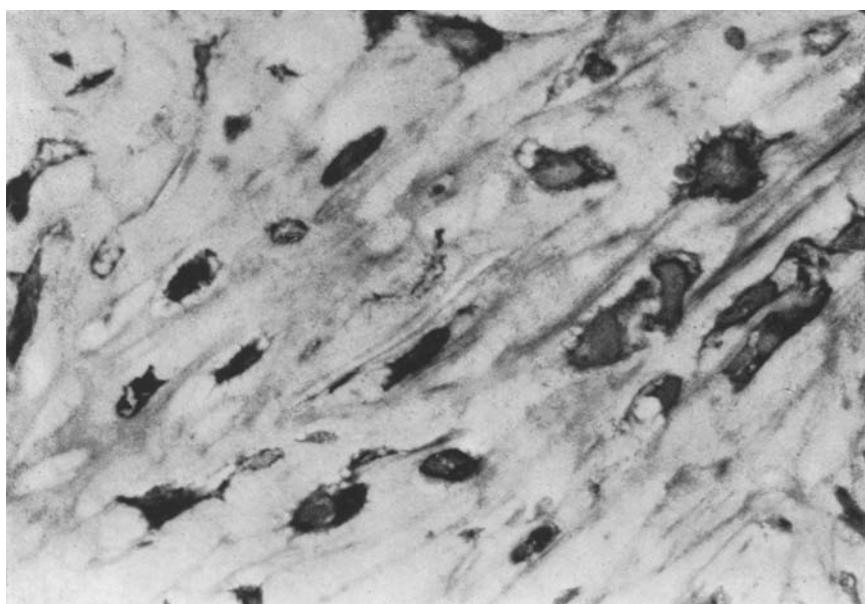


Abb. 2. Myxoides Areal eines Mammamischtumors der Hündin. Semidünnsschnitt, Toluidinblau/Saffranin, Zeiss-Photomikroskop, ca. 400×

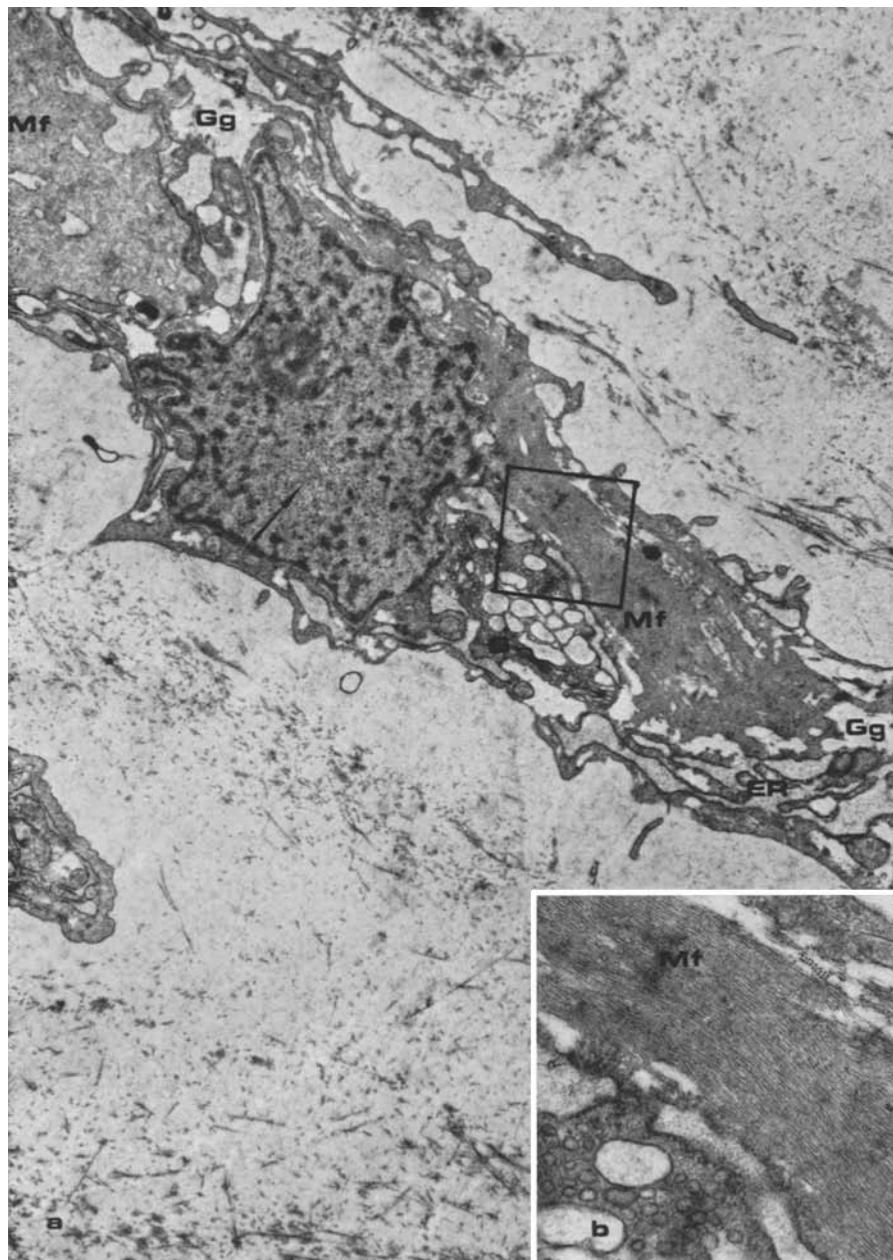


Abb. 3. a Neoplastische Myoepithelzelle im myxoiden Areal eines Mammamischtumors der Hündin. Myofibrillen (*Mf*); Glykogen (*Gg*), durch Bearbeitung herausgelöst; Golgi-Komplex (*G*); geweitetes endoplasmatisches Reticulum (*ER*); Ribosomen im Kern (→). Arch.-Nr. 118/1/27. Vergr. el. opt. 5000×, Endvergr. 10500×. b Ausschnitt aus Abb. 3a. Myofibrillen (*Mf*). Arch.-Nr. 118/1/30. Vergr. el. opt. 12000×, Endvergr. 36000×

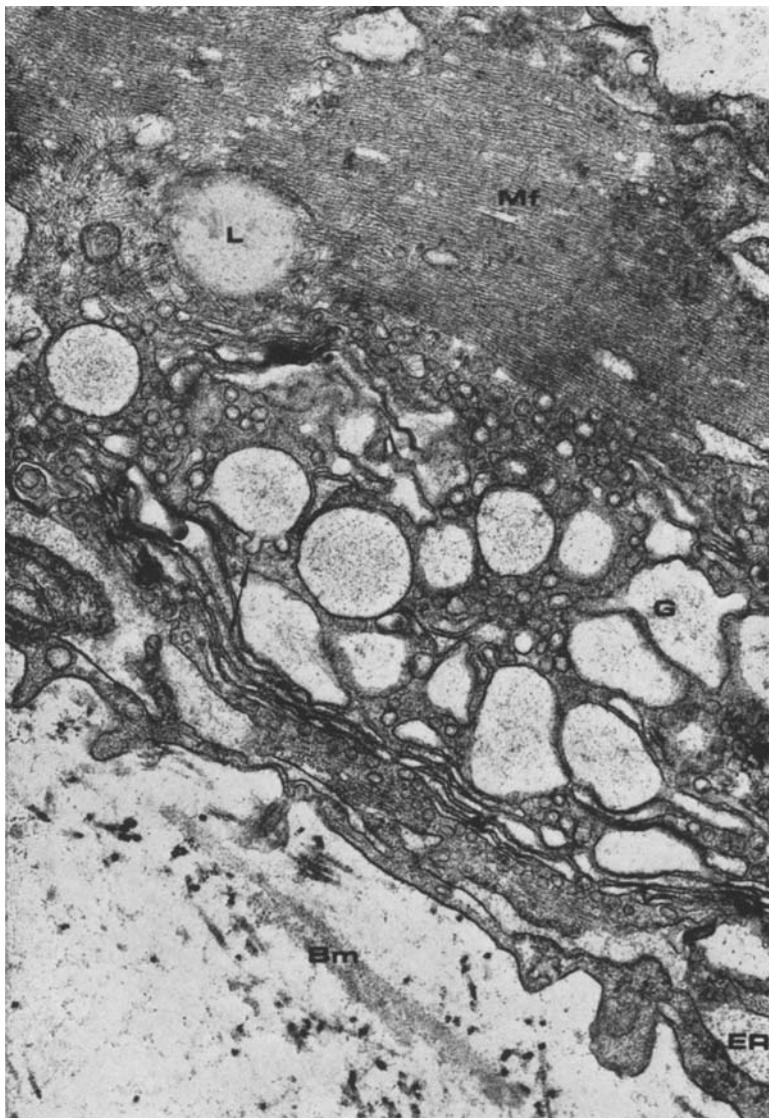


Abb. 4. Ausschnitt aus einer neoplastischen Myoepithelzelle. Myofibrillen (*Mf*); kleinerer Lipoidtropfen (*L*); geweitetes endoplasmatisches Reticulum (*ER*); geweiteter Golgikomplex (*G*) mit Knospung (\rightarrow); basalmembranähnliches Material in einiger Entfernung von der Zelle (*Bm*). Arch.-Nr. 118/1/7. Vergr. el. opt. 11000 \times , Endvergr. 33000 \times

liegen häufig in unmittelbarer Nähe der Zellmembran, meist in Ausbuchtungen, ebenso wie Substanzen, die elektronendichter sind als die übrige Grundsubstanz. Gelegentlich findet sich in einiger Entfernung der Zellen basalmembranartiges Material (Abb. 4 und 6). Eine ausgeprägte, der Zelle unmittelbar anliegende vollständige Basalmembran ist jedoch nicht zu sehen.

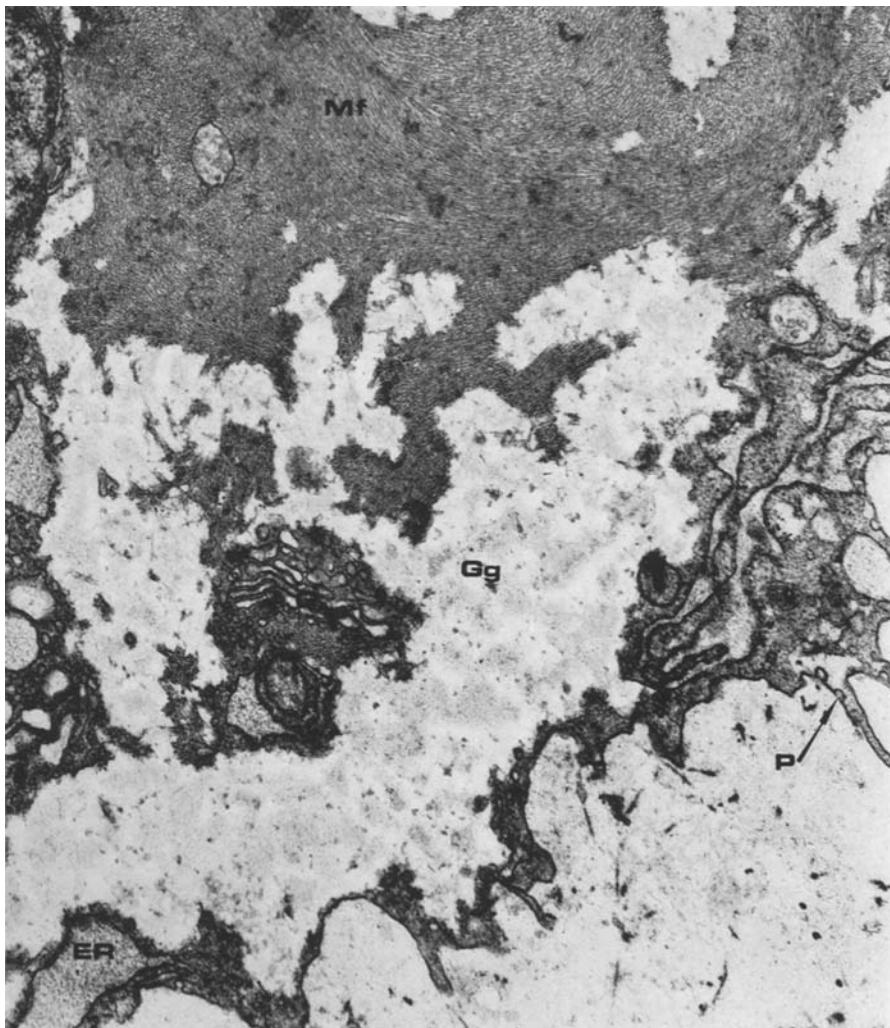


Abb. 5. Ausschnitt aus einer neoplastischen Myoepithelzelle. Glykogen (Gg); Myofibrillen (Mf); Pinocytose (P); Kern (N); endoplasmatisches Reticulum (ER); Golgikomplex (G). Arch.-Nr. 118/1/10; Vergr. el. opt. 5000 \times , Endvergr. 21500 \times

Die Form der Zellen ist meist langgestreckt mit vielen kleinen und größeren Fortsätzen (Abb. 6) und Buchten. Zellausläufer, die sehr schmal sein können, berühren gelegentlich die Ausläufer einer Nachbarzelle. An solchen Stellen sind, wenn auch selten, Desmosomen zu sehen. Die Kerne der Zellen sind rund bis oval, auch gelappt und zeigen ein deutlich abgesetztes Heterochromatin (Abb. 3a). Im Karyoplasma befinden sich viele Ribosomen. Selten ist ein gut ausgebildeter Nukleolus zu sehen. Der Zelleib ist erfüllt von Filamenten mit einem Durchmesser

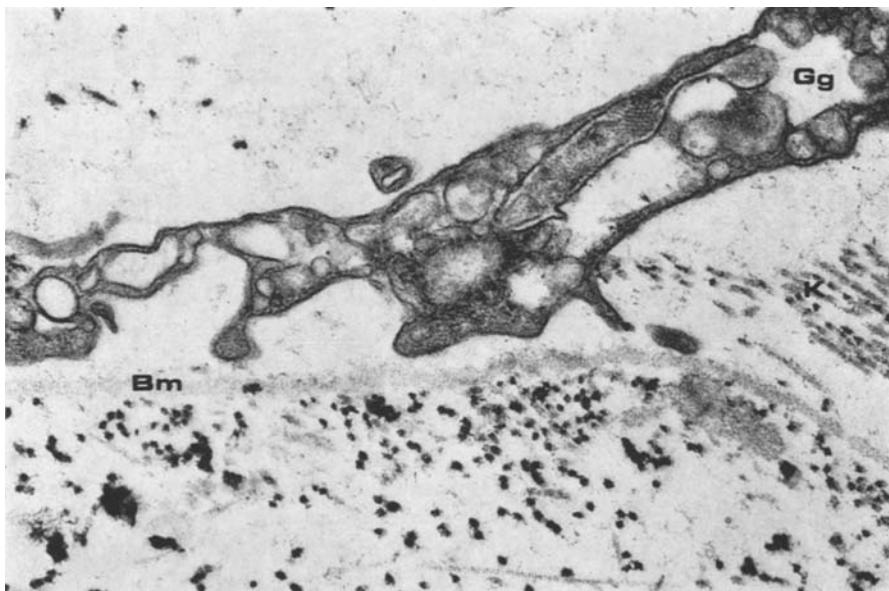


Abb. 6. Fortsatz einer neoplastischen Myoepithelzelle, basalmembranartige Substanz (Bm); Glykogen (Gg); Kollagen (K). Arch.-Nr. 118/1/18; Vergr. el. opt. 19000 \times , Endvergr. 39900 \times

von ca. 70 Å (Abb. 3 und 5). Diese können sehr dicht gelagert parallel oder winkelartig verlaufen oder sich bündelweise überkreuzen. Gelegentlich umfassen sie geflechtartig Zellorganellen oder verlaufen einzeln im Cytoplasma. Diese Filamente fehlen meist im Bereich des Golgikomplexes (Abb. 3a und 4). Darüber hinaus fallen kleinere oder größere Räume im Cytoplasma auf, die teilweise leer (Abb. 5), teilweise mit elektronendichten Granula gefüllt erscheinen. Diese Granula stellen ihrem Kontrastierungsverhalten nach Glykogen dar. Die Hohlräume besitzen keine Membran und können große Teile des Zelleibes einnehmen. Neben diesen unscharf begrenzten Räumen sieht man häufig große Vacuolen (Abb. 4), die eine homogene, mäßig dichte Substanz enthalten, welche den bereits lichtmikroskopisch erfaßbaren Fetttröpfchen entspricht. Sie können auch in großer Zahl in einer Zelle vorkommen. Manchmal ist ein Zellausläufer an nur einer Stelle durch eine solche Fettvacuole um das Mehrfache seiner Breite aufgetrieben. Besonders auffallend sind die häufig in Mehrzahl auftretenden Golgikomplexe mit zahlreichen möglicherweise durch „Knospung“ entstehenden Vesikeln und dilatierten Schläuchen (Abb. 4), sowie ein ausgeprägtes glattes oder rauhes Ergastoplasma mit stark geweiteten Zisternen (Abb. 3). Im Lumen dieser Organellen finden sich feingranuläre Substanzen, die im endoplasmatischen Reticulum dichter erscheinen als im Golgikomplex. Sie haben etwa die gleiche Elektronendichte wie die extracellularäre Matrix. Gelegentlich sind einzelne „dense bodies“ zu sehen. Die Mitochondrien sind oval bis länglich und zeigen nur wenige Cristae. Mikropinocytosebläschen sind in Einzelfällen zu beobachten (Abb. 5).

Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist die Frage nach der Natur der Zellen in den myxoiden Bezirken von Mammamischtumoren der Hündin.

Das Charakteristikum dieser Zellen ist neben ihrer Polymorphie die große Dichte von intracytoplasmatischen Filamenten, die häufig durch die ganze Zelle in mehr oder weniger parallelen Strängen ziehen. Der Durchmesser dieser Filamente von ca. 70 Å hält sich in den Grenzen, die von Langer und Huhn (1958) für Myofilamente in Myoepithelzellen angegeben werden. Zellen mit einem solchen Angebot an intracytoplasmatischen Filamenten können nach unserer Ansicht in der Mamma entweder nur von glatten Muskelzellen der Gefäße oder von Myoepithelzellen ausgehen. Anhaltspunkte dafür, daß es in Mammamischtumoren der Hündin zu einer Proliferation von Gefäßwandmuskelzellen kommt, gibt es lichtmikroskopisch nicht. Hingegen weisen die Entwicklungsstadien der myxoiden Areale auf eine myotheliale Genese hin. Zunächst kommt es zu einer lichtmikroskopisch erkennbaren Proliferation „epitheloider“ Zellen zwischen Basalmembran und Drüsenepithelien. Diese kann entweder die ganze Zirkumferenz der Drüsenalveole umfassen oder örtlich begrenzt auftreten. Unter Einlagerung einer Zwischensubstanz bilden sich retikulär strukturierte Zellareale. Mit ihrer Zunahme und weiterem Auseinanderweichen der Zellen entstehen so schließlich die myxoiden Bezirke. Man gewinnt dabei den Eindruck, daß die Drüsenepithelien und die Basalmembran mit Fortschreiten des Prozesses schwinden. Auf den myothelialen Ursprung der beschriebenen Zellen weist auch ihr Reichtum an Glykogen hin (u.a. Erichsen, 1955a, b; Mylius, 1960; Feyerter, 1963; Doyle *et al.*, 1968; Hamperl, 1971; Donath und Seifert, 1972). Durch die Bearbeitung ist es in den eigenen Fällen allerdings zur Masse herausgelöst. In allen 5 Fällen markieren sich die Zellareale, in denen ursprünglich Glykogen eingelagert war, als größere „Felder“, um die häufig nur ein schmaler Cytoplasmasaum erkennbar ist. Gelegentlich finden sich jedoch noch Glykogenengranula in Form von β -Teilchen. Gleichartige Artefakte werden in Myoepithelien bei einem epithelial-myothelialen Schaltstückcarcinom einer menschlichen Speicheldrüse von Donath, Seifert und Schmitz (1972) beschrieben.

Die enge räumliche Beziehung, die in der normalen Drüsenalveole zwischen Myoepithelzellen und Basalmembran besteht, ist im myxoiden Tumorareal nicht anzutreffen. Allerdings finden sich im elektronenmikroskopischen Bild stellenweise basalmembranartige Strukturen in einiger Entfernung von den Zellen. Ähnliche Befunde werden auch von Mischtumoren und Cylindromen der Speicheldrüse des Menschen berichtet (Hübner *et al.*, 1969). Im übrigen spricht die Tatsache, daß von den beschriebenen Zellen basalmembranartiges Material gebildet wird, gegen ihren Ursprung aus der Fibrocyten/Fibroblastenreihe. Letztere können zwar intracytoplasmatische Filamente enthalten, aber keine Basalmembranen bilden.

Die Tumorzellen zeigen im elektronenmikroskopischen Bild Anzeichen für hohe Aktivität in Form von geweiteten Ergastopalsmacysternen und gut entwickelten Golgikomplexen mit zahlreichen Vesikeln sowie vielen auch intranukleären Ribosomen. Da sich im Lumen des endoplasmatischen Retikulum und der Golgikomplexe Substanzen von ähnlicher Elektronendichte finden wie im extrazellulären Raum, folgern wir, daß diese von den Zellen produziert und nach außen

abgegeben werden. Zu den gleichen Schlußfolgerungen kamen anhand von ultrastrukturellen und histochemischen Untersuchungen an Tumormyoepithelien menschlicher Speicheldrüsen Doyle *et al.* (1968), Hübner *et al.* (1969), Hübner (1971), Erichsen (1955 a, b), Azzopardi und Smith (1959). Die chemische Zusammensetzung der myxoiden Zwischensubstanz war nicht Gegenstand unserer Untersuchung. Wir können lediglich bestätigen, daß sie saure Mucopolysaccharide enthält. Erichsen (1955 a, b) hat jedoch hierüber bei der Hündin eingehende Untersuchungen angestellt, auf die verwiesen werden kann.

Abschließend noch kurz einige Bemerkungen zu dem Nachweis kollagener Fasern im myxoiden Gewebe. Sie stammen nach unserer Auffassung sicherlich wenigstens zum Teil vom Bindegewebe des ehemaligen Drüsenläppchens. Hierauf weisen insbesondere die Befunde an den Semidünnschnitten hin. Man kann hier häufig schemenhaft Faserzüge erkennen, die die Strukturen von Drüsenläppchen andeuten. Andererseits muß auch in den eigenen Fällen daran gedacht werden, daß diese Fasern von Myothelien produziert werden. Insbesondere die Lage von Kollagenfasern in Zellbuchten zusammen mit elektronendichterem Material als die übrige Zwischensubstanz weisen unseres Erachtens in diese Richtung. Die gleiche Vermutung wird von Doyle *et al.* (1960) und Murad *et al.* (1968) geäußert.

Aus den vorgestellten Befunden ziehen wir zusammenfassend die Schlußfolgerung, daß es sich bei den Zellen in rein myxoiden Arealen der Mammamischtumoren der Hündin um neoplastische Myoepithelzellen handelt.

Literatur

- Azzopardi, J. G., Smith, O. D.: Salivary gland tumours and their mucins. *J. Path. Bact.* **77**, 131—140 (1959).
- Cotchin, E.: Mammary neoplasms of the bitch. *J. comp. Path.* **68**, 1—22 (1958).
- Dahme, E., Weiss, E.: Zur Systematik der Mammatumoren des Hundes. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **65**, 458—461 (1958).
- Donath, K., Seifert, G., Schmitz, R.: Zur Diagnose und Ultrastruktur des tubulären Speichelgangcarcinoms. *Epithelial-myotheliales Schaltstückcarcinom*. *Virchows Arch. Abt. A* **356**, 16—31 (1972).
- Doyle, L. E., Lynn, J. A., Panopio, I. T., Crass, G.: Ultrastructure of the chondroid regions of benign mixed tumor of salivary gland. *Cancer (Philad.)* **22**, 225—233 (1968).
- Erichsen, S.: Connective-tissue mucin producing carcinoma of the canine mammary gland. *Acta path. microbiol. scand.* **36**, 481—489 (1955 a).
- Erichsen, S.: A histochemical study on mixed tumours of the canine mammary gland. *Acta path. microbiol. scand.* **36**, 490—502 (1955 b).
- Feyerter, F.: Über das glykogenreiche retikulierte Adenom der Speicheldrüsen. *Z. Krebsforsch.* **65**, 446—454 (1963).
- Hamperl, H.: Über die Myoepitheliien (myoepithelialia Elemente) der Brustdrüse. *Virchows Arch. path. Anat.* **305**, 171—215 (1939).
- Hamperl, H., Lichtenberger, E.: Über Vorkommen und Bedeutung von myoepithelialen Zellen (Myothelien) in Tumoren. *Klin. Wschr.* **49**, 144—148 (1971).
- Hübner, G.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Speicheldrüsengeschwülsten. *HNO* **19**, 137—144 (1971).
- Hübner, G., Kleinsasser, O., Klein, H. J.: Zur Feinstruktur und Genese der Cylindrome der Speicheldrüsen. Weitere Untersuchungen zur Rolle myoepithelial differenzierter Zellen in Speicheldrüsengeschwülsten. *Virchows Arch. Abt. A* **347**, 296—315 (1969).
- Langer, E., Huhn, S.: Der submikroskopische Bau der Myoepithelzelle. *Z. Zellforsch.* **47**, 507—516 (1958).
- Misdorp, W.: Quelques aspects comparatifs des cancer de la mamelle chez la Chienne, la Chatte et la Femme. *Rec. Méd. vét. Alfort* **148** (5), 583—590 (1972).

- Murad, T. M., Haam, E. v.: Ultrastructure of myoepithelial cells in human mammary gland tumours. [Ber. allg. spez. Path. 78, 120—121 (1969).] Cancer (Philad.) 21, 1137—1149 (1968).
- Musy, J. P., Modis, L., Gotzos, V., Conti, G.: Nouvelles methodes de coloration sur coupes semifines pour tissus inclus en "Araldit". Etudes au microscope à champ clair à contraste de phase et à fluorescence. Acta anat. (Basel) 77, 37—49 (1970).
- Mylius, E. A.: The identification and role of the myoepithelial cell in the salivary gland tumour. Acta path. microbiol. scand. 50, (Suppl. 139) 1—81 (1960).
- Oota, K., Takahashi, N.: Electron microscopic studies on the so-called benign mixed tumor of the salivary gland I. Gann 49, Suppl. 234—235 (1958).
- Peyron, A.: Sur la pathologie comparée des tumeurs de la mamelle. Bull. Cancer 13, 349—365 (1924).
- Sandersleben, J. v.: Unterschiedliche Malignitätsgrade bei Mammatumoren der Hündin. Kongressber. Hannover 1963, XVIII. Welttierärztekongr. Bd. 2, S. 991—995.
- Seifert, G.: In Doerr-Uehlinger, Spezielle pathologische Anatomie, Bd. 1. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.

Prof. Dr. v. Sandersleben
Institut für Allgemeine Pathologie
und Pathologische Anatomie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität
D-8000 München 22, Veterinärstraße 13
Bundesrepublik Deutschland