

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Nachweis und mögliche Bedeutung
von Thrombosierungen
und extravasalen Fibrinablagerungen
in Mammatumoren der Hündin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Andrea Golombiewski
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1999

Journal-Nr.: 2301

gefördert durch ein Forschungsstipendium der Akademie für Tiergesundheit e.V.
sowie ein Promotionsstipendium des Landes Berlin

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Klaus Hartung
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Roland Rudolph
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg

Tag der Promotion: 31.8.1999

Auszüge dieser Doktorarbeit wurden mit freundlicher Genehmigung durch den Vorsitzenden der Promotionskommission im Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Herrn Univ. - Prof. Dr. R. Berg, vorab veröffentlicht:

"Immunohistological Assessment of Fibrin Deposition and Thrombus Formation in Canine Mammary Neoplasia"

Golombiewski, A.; Gutberlet, K. und Rudolph, R.

Journal of Comparative Pathology 117: 177-183 (1997)

"Nachweis von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen in caninen Mammatumoren"

Golombiewski, A.; Gutberlet, K. und Rudolph, R.

40. Tagung der Fachgruppe "Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Berlin, 20. Mai 1997. Abstract in: *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 7/8: 295 (1997)

"Intratumorale Thrombosierungen - ein weiteres Kriterium für die Einschätzung der Dignität von Mammatumoren der Hündin?"

Golombiewski, A.; Gutberlet, K. und Rudolph, R.

42. Tagung der Fachgruppe "Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Jena, 26. Mai 1999.

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	2
2.1. Veränderungen des Mammagewebes.....	2
2.1.1. Inzidenz von Mammatumoren bei Hunden	2
2.1.2. Prognose und Bewertung der Dignität von Mammatumoren.....	2
2.1.2.1. Verlauf	2
2.1.2.2. Eigenschaften von Mammatumoren als Prognosefaktoren.....	2
2.1.2.3. Lymphknotenmetastasen.....	3
2.1.3. Blutgefäße in Mammatumoren	4
2.1.3.1. Gefäßversorgung	4
2.1.3.2. Besonderheiten intratumoraler Blutgefäße	4
2.1.3.3. Folgen atypischer Gefäßeigenschaften	5
2.2. Das Blutgerinnungssystem	5
2.2.1. Das Fibrinogenmolekül	5
2.2.2. Gerinnung und Fibrinolyse.....	6
2.2.2.1. Blutgerinnung	6
2.2.2.2. Fibrinolyse.....	6
2.2.2.3. intravasale Gerinnung	7
2.2.2.3.1. Ursachen und Voraussetzungen.....	7
2.2.2.3.2. Aufbau und Kinetik von Thrombosierungen	7
2.2.2.4. extravasale Gerinnung.....	8
2.3. Krebserkrankung und das Blutgerinnungssystem	8
2.3.1. Einleitung	8
2.3.2. systemische Blutgerinnungsstörungen bei neoplastischen Erkrankungen	9
2.3.2.1. klinisch manifeste Blutgerinnungsstörungen	9
2.3.2.2. Veränderungen labordiagnostisch nachweisbarer Gerinnungsparameter.....	9
2.3.3. Produkte von Zellen in Mammatumoren mit potentieller Wirkung auf Blutgerinnung, Fibrinolyse oder Endothelzellen.....	10
2.3.3.1. Einleitung	10
2.3.3.2. direkte Aktivierung der Gerinnungskaskade.....	10
2.3.3.3. Plättchenaggregation.....	11
2.3.3.4. Beeinflussung der Fibrinolyse	11
2.3.3.5. Tumorzellprodukte mit Wirkung auf Endothelzellen	12
2.3.4. Blutgerinnungssystem und Metastasierung.....	12
2.3.5. extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren.....	12
2.3.5.1. Voraussetzungen und mögliche Ursachen	12
2.3.5.2. Kinetik der extravasalen Fibrinbildung in Tumoren	13
2.3.5.3. Vorkommen von extravasalen Fibrinablagerungen in Tumoren.....	14
2.3.5.3.1. Einleitung	14
2.3.5.3.2. extravasale Fibrinablagerungen in Spontantumoren des Hundes	14
2.3.5.3.3. extravasale Fibrinablagerungen in Spontantumoren des Menschen.....	14
2.3.5.3.4. extravasale Fibrinablagerungen in experimentellen Tumoren bei Versuchstieren ..	15
2.3.5.4. Bedeutung extravasaler Fibrinablagerungen in Tumoren	15
2.3.6. Thrombosierungen in Tumoren	16
2.3.6.1. Voraussetzungen und mögliche Ursachen.....	16
2.3.6.2. Vorkommen von Thrombosierungen in Tumoren	17
2.3.6.2.1. Einleitung	17
2.3.6.2.2. Thrombosierungen in Spontantumoren des Hundes.....	17

2.3.6.2.3.	Thrombosierungen in Spontantumoren des Menschen.....	17
2.3.6.2.4.	Thrombosierungen in experimentellen Tumoren bei Versuchstieren	18
2.3.6.3.	mögliche Folgen von Thrombosierungen in Tumoren	18
2.4.	Darstellung von extravasalem Fibrin und Thrombosierungen im Gewebsschnitt..	19
2.4.1.	Einleitung	19
2.4.2.	histologische Färbetechniken.....	19
2.4.2.1.	Mechanismus und Interpretation histologischer Färbungen	19
2.4.2.2.	Darstellung von Fibrin mit histologischen Färbetechniken	19
2.4.3.	Immunhistochemie.....	20
2.4.3.1.	Mechanismus immunhistochemischer Darstellungsmethoden.....	20
2.4.3.2.	die APAAP-Methode	20
2.4.3.3.	immunhistochemischer Nachweis zweier Antigene in einem Gewebsschnitt (Doppelmarkierung)	21
2.4.3.4.	Antigenmaskierung und -demaskierung.....	21
2.4.3.5.	immunhistochemische Darstellung von Fibrin	21
2.4.3.5.1.	immunhistochemische Darstellung von Fibrin von Hunden.....	21
2.4.3.5.2.	immunhistochemische Darstellung von Fibrin von Menschen	22
2.4.3.6.	immunhistochemische Darstellung von Gefäßen in Mammatumoren.....	22

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. MATERIAL UND METHODEN	23	
3.1.1.	Untersuchte Gewebe	23
3.1.2.	Nationale.....	23
3.1.3.	Verlauf.	23
3.1.4.	Gewebebearbeitung.....	24
3.1.5.	Anfertigung und Behandlung von Schnittpräparaten	24
3.1.6.	Vorversuche zu histologischen Färbetechniken zur Darstellung von Thrombi und extravasalen Fibrinablagerungen.....	25
3.1.6.1.	Einleitung	25
3.1.6.2.	Bindegewebsfärbung nach LADEWIG (1938).....	25
3.1.6.3.	Picro-Polychromtechnik nach SHOOBRIDGE (1983).....	26
3.1.6.4.	kombinierte Elastika-, Fibrin- und Kollagenfärbung nach GARVEY <i>et al.</i> (1987).27	27
3.1.6.5.	Martius Yellow - Scarlet Red - Anilin Blue (MSB) - Technik nach LENDRUM <i>et al.</i> (1962), modifiziert nach PUSEY und EDWARDS (1978).....	28
3.1.6.6.	Methode zur Auswertung der Vorversuche zu den histologischen Färbetechniken	28
3.1.7.	Vorversuche zur Immunhistochemie	29
3.1.7.1.	Einleitung	29
3.1.7.2.	Allgemeines Schema für die Durchführung der APAAP-Methode.....	29
3.1.7.3.	Immunhistochemische Darstellung von Fibrin (Fibrin-Einfachmarkierung).....	30
3.1.7.4.	Immunhistochemische Darstellung von Gefäßen	30
3.1.7.5.	Gleichzeitige immunhistochemische Darstellung von Fibrin und Gefäßen (Doppelmarkierung)	31
3.1.7.6.	Methode zur Auswertung der Vorversuche zur Immunhistochemie	31
3.1.8.	Rezepte der Lösungen für die immunhistochemischen Verfahren und histologi- schen Färbungen sowie Verzeichnis der verwendeten Geräte und Reagenzien ...	31
3.1.9.	Hauptversuche	31
3.1.10.	Untersuchung der H.E.-Schnitte.....	32
3.1.10.1.	Untersuchung auf Veränderungen, Diagnosen.....	32
3.1.10.2.	Wertungspunkte.....	33

3.1.10.3.	Nekrose	33
3.1.10.4.	Blutung	33
3.1.10.5.	eitrige Entzündung	34
3.1.10.6.	Angiosis carcinomatosa	34
3.1.11.	Untersuchung der Schnitte der Spezialdarstellungen	34
3.1.11.1.	Fläche des ausgewerteten Tumorgewebes	34
3.1.11.2.	Vorhandensein einer Kapsel	34
3.1.11.3.	Vorhandensein von Fibrin	34
3.1.11.4.	Thrombosierungen in Tumoren	34
3.1.11.5.	extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren	35
3.1.11.6.	fibrinpositive Makrophagen	36
3.1.11.7.	Gefäßdichte	36
3.1.12.	Zusammenhänge zwischen Merkmalen / statistische Tests	36
3.2. ERGEBNISSE		38
3.2.1.	Alters-, Rassen- und Geschlechtsverteilung	38
3.2.2.	Ergebnis der Verlaufsuntersuchung	39
3.2.3.	Lymphknotenstatus	39
3.2.4.	Ergebnisse der Vorversuche	41
3.2.4.1.	Histologische Färbetechniken zur Darstellung von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen	41
3.2.4.1.1.	Ergebnis der Färbung nach Ladewig	41
3.2.4.1.2.	Ergebnis der Färbung nach Shooobridge	41
3.2.4.1.3.	Ergebnis der Färbung nach Garvey <i>et al.</i>	41
3.2.4.1.4.	Ergebnis der Färbung nach Pusey und Edwards	41
3.2.4.2.	Ergebnisse der Vorversuche zur Immunhistochemie	42
3.2.4.2.1.	Ergebnis der Vorversuche zur Fibrin-Einfachmarkierung	42
3.2.4.2.2.	Ergebnis der Vorversuche zur immunhistochemischen Darstellung von Gefäßen .	43
3.2.4.2.3.	Ergebnis der Vorversuche zum immunhistochemischen Nachweis zweier Antigene in einem Gewebsschnitt (Doppelmarkierung)	43
3.2.5.	Durchführung der Hauptversuche	44
3.2.5.1.	Durchführung der histologischen Darstellung von Fibrin im Hauptversuch	44
3.2.5.2.	Durchführung der immunhistochemischen Darstellung von Fibrin im Haupt- versuch	45
3.2.5.3.	Durchführung der immunhistochemischen Darstellung von Gefäßen im Haupt- versuch	45
3.2.5.4.	Durchführung der Doppelmarkierung im Hauptversuch	46
3.2.6.	Untersuchte Tumoren	46
3.2.7.	Gefäßdichte	47
3.2.8.	Nachweis von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen in Inguinallymphknoten	48
3.2.9.	Nachweis von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen in nichtneoplastischem Mammagewebe	49
3.2.9.1.	unverändertes Mammagewebe	49
3.2.9.2.	nichtneoplastisch verändertes Mammagewebe	49
3.2.10.	Nachweis von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen in Mammagewebe im frühen Karzinomstadium	49
3.2.11.	Nachweis von Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Mammatumoren i.w.S.	50

3.2.12.	Nachweis von Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Mammatumoren i.e.S.....	51
3.2.12.1.	Vorhandensein von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen....	51
3.2.12.2.	Art und Lage von extravasalen Fibrinablagerungen.....	52
3.2.12.3.	Größe und Lage von thrombosierten Gefäßen.....	55
3.2.13.	Zusammenhang zwischen Thrombosierungen bzw.extravasalen Fibrinablagerungen in Mammatumoren i.e.S. und anderen Parametern.....	56
3.2.13.1.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren und Nationale	56
3.2.13.2.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen bei Tieren mit multiplen Mammatumoren i.e.S.....	61
3.2.13.3.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren aus der ersten bzw. einzigen Operation oder einer Folgeoperation eines Tieres	62
3.2.13.4.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren aus verschiedenen Lokalisationen.....	64
3.2.13.5.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren unterschiedlicher Größe	66
3.2.13.6.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren unterschiedlicher Klassifikation	68
3.2.13.7.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren mit unterschiedlicher Punktzahl.....	70
3.2.13.8.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in ulzerierten Tumoren..	72
3.2.13.9.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren mit eitriger Entzündung	72
3.2.13.10.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren mit fibrinpositiven Makrophagen.....	73
3.2.13.11.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren mit Angiosis carcinomatosa.....	73
3.2.13.12.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren mit und ohne Nekrosen	74
3.2.13.13.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren mit und ohne Blutungen.....	76
3.2.13.14.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren unterschiedlicher Gefäßdichte	78
3.2.13.15.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren und Status des/der ipsilateralen Inguinallymphknoten(s).....	80
3.2.13.16.	Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren und Krankheitsverlauf	82
3.2.13.17.	Thrombosierungen, Nekrose und Gefäßdichte in Tumoren	86
3.2.14.	Weitere Zusammenhänge einiger Merkmale von Mammatumoren i.e.S.....	87
3.2.14.1.	Zusammenhang zwischen Tumornekrose und Tumorgröße	87
3.2.14.2.	Zusammenhang zwischen Tumornekrose und Gefäßdichte.....	87
3.2.14.3.	Zusammenhang zwischen dem Alter des Tieres und Tumornekrose bzw. -punktzahl.....	87

4. DISKUSSION	88
4.1. Material und Methoden.....	88
4.1.1. Art der vorliegenden Studie.....	88
4.1.2. Untersuchungsgut	88
4.1.3. Überwachungszeitraum und Krankheitsverlauf.....	89
4.1.4. Darstellung von extravasalen Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in Gewebsschnitten von Hunden	89
4.1.4.1. histologische Färbetechniken.....	89
4.1.4.2. immunhistochemische Darstellung.....	90
4.1.4.3. Methodenkritik	92
4.1.4.4. Fazit	92
4.2. Extravasale Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in unverändertem und nichtneoplastisch verändertem Mammagewebe sowie in Mammagewebe im frühen Karzinomstadium der Hündin	93
4.3. Extravasale Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in Mammatumoren i.w.S. der Hündin	94
4.4. Extravasale Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in Mammatumoren i.e.S. der Hündin	94
4.4.1. Vorkommen	94
4.4.1.1. Vorkommen extravasaler Fibrinablagerungen.....	94
4.4.1.2. Vorkommen von Thrombosierungen.....	95
4.4.2. Zusammenhang von extravasalen Fibrinablagerungen, Thrombosierungen und anderen Merkmalen.....	96
4.4.2.1. extravasale Fibrinablagerungen bzw. Thrombosierungen bei verschiedenen Individuen	96
4.4.2.2. extravasale Fibrinablagerungen und Thrombosierungen.....	97
4.4.2.3. extravasale Fibrinablagerungen bzw. Thrombosierungen und andere Tumormerkmale.....	97
4.4.2.4. extravasale Fibrinablagerungen bzw. Thrombosierungen, Metastasen und Krankheitsverlauf.....	102
4.4.3. Schlußfolgerungen: Theorien zur Entstehung und Bedeutung von extravasalen Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in Mammatumoren i.e.S. der Hündin	103
4.4.3.1. Mögliche Ursachen und Bedeutung extravasaler Fibrinablagerungen.....	103
4.4.3.2. Mögliche Ursachen und Bedeutung von Thrombosierungen.....	104
5. ZUSAMMENFASSUNG	106
6. SUMMARY	109
7. SCHRIFTTUM	112
8. ANHANG	126
8.1. Abkürzungen	126
8.2. Rezepte.....	127
8.3. Daten der Tiere	130
8.4. Daten der Tumoren	134
8.5. Auflistung der verwendeten Geräte und Substanzen	145