

## **2. LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1. Veränderungen des Mammagewebes**

#### **2.1.1. Inzidenz von Mammatumoren bei Hunden**

Mammatumoren stellen die häufigste neoplastische Erkrankung der Hündin dar (MOULTON 1990). Nach SCHNEIDER (1970) erkranken jährlich 0,14% aller Hündinnen und 0,004% aller Rüden. Der prozentuale Anteil der Mammaneoplasien an der Gesamtzahl der Neoplasien ist je nach Untersuchung und Art der zugrundegelegten Gesamtmenge variabel. So liegt der Anteil an Mammatumoren an der Gesamtzahl der zur pathohistologischen Untersuchung eingesandten Tumoren von Hunden beiderlei Geschlechts zwischen 7,6% (BASTIANELLO 1983) und 42,84% (ESKENS 1983). Von den in der Tierärztlichen Hochschule Hannover wegen einer Tumorerkrankung in den Jahren 1993-1995 vorstellig gewordenen Hunden litten 22,9% an Mammatumoren, bezogen auf weibliche Tiere 41,6% (SIMON *et al.* 1996).

Das Durchschnittsalter von an Mammatumoren erkrankten Tieren liegt bei ungefähr 10 bis 11 Jahren, in dieser Altersgruppe tritt die Erkrankung auch am häufigsten auf (FIDLER und BRODEY 1967, GUTBERLET 1994, SIMON *et al.* 1996).

Der Anteil der verschiedenen Rassen am Patientengut variiert je nach Untersuchung. In der Studie von SIMON *et al.* (1996) sind die drei am häufigsten betroffenen Rassen Teckel, Deutscher Schäferhund und Pudel, bei GUTBERLET (1994) Teckel, Terrier und Cocker Spaniel, bei KURZMAN und GILBERTSON (1986) Pudel, Terrier und Deutscher Schäferhund.

#### **2.1.2. Prognose und Bewertung der Dignität von Mammatumoren**

##### *2.1.2.1. Verlauf*

Der postoperative Beobachtungszeitraum für Mammatumorpatientinnen liegt in der Humanmedizin üblicherweise bei zehn Jahren (SPRATT und DONEGAN 1995). Beim Hund sind aussagekräftige Ergebnisse über den Verlauf der Erkrankung viel eher zu erwarten (BOSTOCK 1975). In der Regel wird ein Zeitraum von zwei Jahren gewählt (BOSTOCK 1975, GILBERTSON *et al.* 1983), da in entsprechenden Studien der weit überwiegende Anteil der Hunde, die an den Folgen des Gesäugekrebses starben, das erste Jahr *post operationem* nicht überlebte (BOSTOCK 1975, FANTON und WITHROW 1981). Entsprechendes gilt für die Diagnose von Metastasen (BOSTOCK 1975).

##### *2.1.2.2. Eigenschaften von Mammatumoren als Prognosefaktoren*

Bestimmte Eigenschaften von Mammatumoren sind mit einer schlechteren Prognose verbunden. Aus dieser Kenntnis entwickelte Gradingssysteme zur Bewertung des Malignitätsgrades von Mammakarzinomen gelten in der Humanonkologie als aussagekräftig (LOCHER *et al.* 1984). Um jedoch eine definitive Aussage über den prognostischen Wert eines bestimmten Merkmals von Mammatumoren treffen zu können, muß das Studiendesign diverse Voraussetzungen erfüllen. Vor Durchführung einer solchen definitiven Studie werden deshalb i.d.R. zunächst Pilot-

studien erstellt, um erste Hinweise auf einen eventuellen prognostischen Wert eines zuvor nicht geprüften Merkmals zu erhalten (MCGUIRE 1991).

Für die Beurteilung der Dignität von Mammatumoren von Hunden wurde 1994 von GUTBERLET ein **Wertungspunktesystem** aufgrund histologischer Kriterien erarbeitet. Beurteilt werden am gesamten Tumor: Tumorproliferation, Auftreten vereinzelter Drüsenzellen im Tumorstroma, Anteil soliden oder anaplastischen Wachstums am Gesamtgewebe; an den neoplastischen Zellen: Gesamtzellbild, Gestalt der Einzelzellen, Vorliegen einer Kernwandhyperchromasie, Gestalt und Zahl von Nukleoli, Häufigkeit von Mitosen; am Übergang des Tumors zum Umgebungsgewebe: die Kapsel und Vorliegen von invasivem Wachstum. Mammatumoren, die in dieser Studie eine höhere Punktzahl erhielten, waren mit einer schlechteren Prognose verbunden.

Mammatumoren mit einem **Maximaldurchmesser** von über 5 cm führen beim Hund häufiger zu einem Krankheitsverlauf mit letalem Ausgang als solche mit einem geringeren Durchmesser (BOSTOCK 1976).

Das Auftreten von **Gefäßeinbrüchen** in Mammatumoren des Hundes führt zwar nicht zwingend zu einer Metastasierung, ist aber trotzdem mit einer schlechteren Prognose verbunden (GUTBERLET 1994).

Zwei weitere, in der Humanmedizin diskutierte Prognosefaktoren sind das Vorkommen ausgedehnter **Tumornekrosen** und die **Gefäßdichte im hot spot** des Tumors. Nach PARHAM *et al.* (1988) stellen ausgedehnte Nekrosen in Mammatumoren ein Zeichen für eine schlechtere Prognose dar, FISHER *et al.* (1978) sehen in dem Auftreten von Tumornekrosen jedoch nur ein mit zunehmender Tumorgröße assoziiertes Phänomen. Ähnlich strittig ist die Gefäßdichte im *hot spot*, welche von OBERMAIR *et al.* (1995) als prognostisch aussagekräftig eingestuft wird, von MARINHO *et al.* (1997) jedoch nicht. Nach ARANDA und LAFORGA (1996) besteht keinerlei Zusammenhang zwischen Nekrosen im Tumor und der Gefäßdichte im *hot spot*.

### 2.1.2.3. Lymphknotenmetastasen

Das sicherste Zeichen für Malignität sind Metastasen (WEISS 1984). Lymphknotenmetastasen gehören zu den ersten Zeichen der Generalisation einer Geschwulstkrankheit (GRUNDMANN 1984). Die Lymphdrainage der Mamma erfolgt beim Hund nach SAUTET *et al.* (1992) für die thorakalen Komplexe über das *Lymphocentrum axillare* und für den abdominal kaudalen und den inguinalen Komplex stets über den/die oberflächlichen Inguinallymphknoten. Die Drainage bei den mittleren drei Komplexen kann individuell entweder nur nach axillar oder inguinal oder in beide Richtungen ablaufen, bei den drei kranialen Komplexen zusätzlich auch in den *Lymphonodus sternalis cranialis*. Neueste Untersuchungen belegen jedoch, daß auch inguinal gelegene Tumoren in die kranial gelegenen Lymphknoten metastasieren können (ARNICKE 1999).

Beim Brustkrebs des Menschen gilt der Status der regionären Lymphknoten zum Zeitpunkt der Primäroperation als eines der wichtigsten prognostischen Kriterien (MÜLLER *et al.* 1984, GOLDSTEIN *et al.* 1999). Obwohl die hämatogene Metastasierung von Gesäugetumoren beim Hund häufiger als beim Menschen anzutreffen ist (FIDLER und BRODEY 1967), gibt es auch beim Hund Hinweise darauf, daß an Mammatumoren erkrankte Tiere, bei denen keine Metasta-

sen in jeweils einem untersuchten regionären Lymphknoten festzustellen waren, im Vergleich zu solchen mit Metastasen die erste Mammatumoreroperation länger überleben (BUSCH 1993).

### **2.1.3. Blutgefäße in Mammatumoren**

#### *2.1.3.1. Gefäßversorgung*

Alle Tumoren, die einen Durchmesser von 1-2 mm überschreiten, benötigen eine eigene Gefäßversorgung (FOLKMAN *et al.* 1966), wobei neoplastisches Mammagewebe in der Regel deutlich besser vaskularisiert ist als unverändertes (HORAK *et al.* 1993). Nach BEANEY *et al.* (1984) ist auch der Durchblutungsgrad von Tumoren verglichen mit dem des umgebenden unveränderten Gewebes erhöht. Dem widerspricht MANTYLA (1979). FOX *et al.* (1996) sprechen von einer zwar erhöhten Durchblutungs-, dabei jedoch oft verringerten Perfusionsrate.

Bei den im Tumorgewebe liegenden Gefäßen handelt es sich um inkorporierte Gefäße des Wirtsorganismus und/oder um das Ergebnis intratumoraler Angiogenese, wobei letztere für einen wachsenden Tumor essentiell ist (FOLKMAN 1971). Die Gefäße sind im Tumorgewebe sehr heterogen verteilt und die Versorgung einzelner Areale eines Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen daher uneinheitlich (LESS *et al.* 1991, GUIDI *et al.* 1994, DE JONG *et al.* 1998). Die Angaben über die durchschnittliche Gefäßdichte in Mammatumoren des Menschen variieren von 51,1 Gefäßanschnitten/mm<sup>2</sup> (OBERMAIR *et al.* 1995) bis 137 Gefäßanschnitten/mm<sup>2</sup> (WEIDNER *et al.* 1991), jeweils beurteilt im histologischen Präparat.

Tumorzellen, die einen kritischen Abstand zum sie versorgenden Gefäß überschreiten, fallen durch ungenügende Sauerstoffversorgung der Nekrose anheim oder werden apoptotisch (PARANGI *et al.* 1996). Dies stellt nach PARHAM *et al.* (1988) die Hauptursache für Nekrosen bei wachsenden Mammatumoren dar. Der kritische Abstand beträgt, je nach Sauerstoffspannung im Gefäß, zwischen 60 und 200 µm (TANNOCK und STEEL 1969, HLATKY *et al.* 1994). TANNOCK und STEEL (1969) konnten in einem allotransplantierten Mammatumor der Ratte nicht näher beschriebene Gefäße innerhalb von Nekrosezonen beobachten.

#### *2.1.3.2. Besonderheiten intratumoraler Blutgefäße*

Untersuchungen an experimentellen Mammatumoren von Versuchstieren haben ergeben, daß die Gefäßarchitektur dieser Neoplasien von der normalen Gewebes in einigen Punkten abweicht. Kapillaren zeigen einen durchschnittlich weit größeren Durchmesser als in unverändertem Gewebe und sind teilweise dilatiert oder sinusoidal (VOGEL 1965, LESS *et al.* 1991). Der Durchmesser der Arteriolen ist besonders in großen Tumoren stark variabel, und es gibt diverse atypische Ausbildungen der Gefäßarchitektur wie Trifurkationen und Schleifenbildungen. Eine geordnete Gefäßhierarchie fehlt. Arteriolen und Venolen können durch dünne und permeable Wände ähnliche Eigenschaften wie Kapillaren annehmen (LESS *et al.* 1991), welche wiederum teilweise die Eigenschaften von Venolen aufweisen (DVORAK *et al.* 1996). Auch an den Gefäßen spontaner Mammakarzinome der Frau können Endothelveränderungen in Form von Hypertrophie und Hyperplasie, nicht näher bezeichnete Verletzungen und Nekrosen beobachtet werden, welche meist vereinzelt auftreten, teilweise jedoch auch einzelne Gefäße über längere Strecken begleiten (DVORAK *et al.* 1981).

Eine zu einer Obstruktion führende Kompression kleiner Gefäße durch das umgebende Gewebe ist in neovaskularisierten Tumoren häufig anzutreffen (FOLKMAN 1996).

Blutgefäße in experimentellen Mammakarzinomen sind hyperpermeabel, ebenso vermutlich die Gefäße spontaner Mammakarzinome (BROWN *et al.* 1988a). Intratumorale Gefäße enthalten eine große Zahl an *vesiculo-vacuolar organelles* (VVOs), die für den transendothelialen Transport von Makromolekülen verantwortlich sind (DVORAK *et al.* 1996).

### 2.1.3.3. Folgen atypischer Gefäßeigenschaften

Als Folgen dieser atypischen Gefäßeigenschaften treten in verschiedenen Tumoren Plättchen- und Erythrozytenaggregation, sowie innerhalb des Tumors wechselnder Hämatokrit, Blutdruck und Blutsauerstoffgehalt auf (LESS *et al.* 1991, Übersichten bei JAIN 1988, VAUPEL *et al.* 1989). Der Hämatokrit und somit die Blutviskosität sind in Mammatumoren gegenüber dem umgebenden Normalgewebe erhöht, besonders in den Tumorkapillaren (SEVICK und JAIN 1989). Durch den verringerten Blutdruck kann es zu Gefäßkollaps, Stase und Blutflußumkehr kommen, was zu einer Tumorphoxie und -nekrose führen kann (JAIN 1988). DEWHIRST *et al.* (1992) wiesen zum Tumorzentrum hin abnehmende perivaskuläre Sauerstoffspannung in Mammatumoren von Ratten nach. Das häufige Auftreten hypoxischer Areale in Tumoren führt FOLKMAN (1996) primär auf intratumorale Gefäßkompressionen zurück.

Durch Hyperpermeabilität der Gefäße kommt es in Mammatumoren zu einer gegenüber dem Normalgewebe verstärkten Extravasation von Plasma (BROWN *et al.* 1988a). Dieser Effekt ist tumorassoziiert und betrifft das unveränderte Nachbargewebe nicht (DVORAK 1986) oder nur in unmittelbarer Umgebung des Tumors (SHOJI *et al.* 1998). Die Ursache liegt vor allem in einer vermehrten Aktivität der VVOs in den Endothelzellen (DVORAK *et al.* 1996) und ist, zumindest was die Extravasation von Makromolekülen betrifft, nicht durch interzelluläre Spalten des Gefäßendothels bedingt (DVORAK *et al.* 1995). Als Folge einer extremen Extravasation kann es in den Gefäßen zur Stase kommen (DVORAK *et al.* 1979). Es ist in Tumormodellen auch eine Verminderung der Extravasation errechnet worden, welche darauf zurückgeführt wird, daß besonders in zentralen Bereichen von Neoplasien der interstitielle Druck erhöht ist (JAIN und BAXTER 1988).

## **2.2. Das Blutgerinnungssystem**

### **2.2.1. Das Fibrinogenmolekül**

Das im Plasma in reichlicher Menge vorhandene Fibrinogen ist die direkte Vorstufe des Endproduktes der Blutgerinnung, des Fibrins. Fibrinogen stellt ein in der Wirbeltierevolution hochkonserviertes Molekül dar. Es konnte im Plasma aller darauf untersuchten Vertebratenspezies festgestellt werden, nicht jedoch bei Nonvertebraten. Das Verhalten des Fibrinogenmoleküls bei Gerinnung und Fibrinolyse ist bei den verschiedenen Spezies sehr ähnlich, ebenso sein molekularer Aufbau: es besteht aus drei nicht-identischen Polypeptidketten ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette), welche jeweils doppelt vorliegen und mit Disulfidbrücken zum Fibrinogendimer verknüpft sind. Die Großbuchstaben stehen für die Fibrinopeptide A und B, die sich am aminoterminalen Ende der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette befinden. An den  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Ketten befinden sich die Stellen, an denen im Verlauf der Gerinnung die Quervernetzung zum unlöslichen Fibrin erfolgt (DOOLITTLE 1987).

Die Molekulargewichte der einzelnen Ketten und der Fibrinogenspaltprodukte von Mensch und Hund sind sehr ähnlich (CHEN *et al.* 1975, WOLLING und MISCHKE 1995). Auch die Aminosäuresequenzen des Fibrinogenmoleküls weisen bei diesen Spezies teilweise weitgehende Homologien auf, dies gilt z.B. für die  $\beta$ -Kette (BIRKEN *et al.* 1975).

## 2.2.2. Gerinnung und Fibrinolyse

### 2.2.2.1. Blutgerinnung

Die Blutgerinnung stellt eine Abfolge proteolytischer Reaktionen an den im Blut im Überschuß vorhandenen Gerinnungsfaktoren dar, welche im Plasma in ihrer inaktiven Zymogenform vorliegen. Bei Aktivierung der Gerinnungskaskade erfolgt durch eine proteolytische Reaktion die Umwandlung aus der inaktiven Zymogenform in eine aktive Protease, welche wiederum die nächste proteolytische Reaktion katalysiert und somit den nächsten Gerinnungsfaktor aktiviert. Die Auslösung der Blutgerinnungskaskade kann intrinsisch (in der Blutbahn) oder extrinsisch (nach Gewebsverletzung) erfolgen. Beides mündet nach der Aktivierung des Faktors X in dieselbe Endstrecke ein. Letztlich wird durch die Umwandlung des inaktiven Prothrombins in das aktive Thrombin eine Reaktion katalysiert, bei der vom im Plasma gelösten Fibrinogen die Fibrinopeptide A und B abgespalten werden. Durch die dadurch geänderte Konformation und elektrische Ladung der entstandenen Fibrinmonomere erfolgt die Spontanpolymerisation zu Fibrinpolymeren. Anschließend wird das Fibrinpolymer durch kovalente Quervernetzung zu dem Produkt stabilisiert, welches gemeinhin als Fibrin angesprochen wird (zur Übersicht siehe TROY 1988, DOOLITTLE 1987). Das zentrale Ereignis der Thrombinbildung kann nur dann in nennenswertem Maße ablaufen, wenn eine für die Bildung des Prothrombinasekomplexes (aus dem aktivierten Faktor X und einem nichtenzymatischen Cofaktor unter Anwesenheit von  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen) geeignete Oberfläche zur Verfügung steht, wie z.B. die Membran der Thrombozyten (TRACY *et al.* 1981).

Bei der Frau besteht durch die hormonellen Veränderungen nach Erlöschen der zyklischen Ovarialfunktion eine tendenziell erhöhte Gerinnungsbereitschaft (Übersicht bei STEVENSON 1996). Auch bei der Hündin kann dies durch Sexualhormone, vornehmlich Progesteron, hervorgerufen werden, während Östrogene die Blutgerinnung nicht beeinflussen (GÜNZEL-APEL *et al.* 1997).

### 2.2.2.2. Fibrinolyse

Das Fibrinolyse-System stellt den gegenregulatorischen Mechanismus zur Blutgerinnung dar. Beide Vorgänge laufen im Organismus ständig parallel ab. Das zentrale Ereignis der Fibrinolyse ist die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin, welches wiederum den Abbau von Fibrin katalysiert. Wie bei der Gerinnung gibt es auch hier ein intrinsisches und ein extrinsisches System, verschiedene Aktivatoren und Inhibitoren (zur Übersicht siehe HIMMELREICH und RIESS 1991). Durch Plasmin wird zunächst unter anderem ein Teil der  $\beta$ -Kette des Fibrins abgespalten (KOEHN *et al.* 1983).

Mittels Aktivierung der Fibrinolyse beschleunigt Fibrin seinen eigenen Abbau (HOYLAERTS *et al.* 1982). Die Fibrin(ogen)spaltprodukte X und Y führen zu einer Feedbackhemmung der Blut-

gerinnung (MARDER und SHULMAN 1969), das Fragment D erhöht *in vitro* die Gefäßpermeabilität (GE *et al.* 1991).

Neutrophile Granulozyten beeinflussen die Fibrinolyse. Das von ihnen gebildete Enzym Elastase bewirkt einen beschleunigten Abbau der  $\alpha$ -Kette des Fibrins, was allerdings den stimulierenden Effekt des Fibrins für seinen eigenen Abbau mindert (BACH-GANSMO *et al.* 1994). Zusätzlich unterstützen membrangebundene Proteasen die Wirkung von Plasmin (ADAMS *et al.* 1995).

### 2.2.2.3. *intravasale Gerinnung*

#### 2.2.2.3.1. *Ursachen und Voraussetzungen*

Intravasale Gerinnung und die daraus folgenden Thrombosierungen sind ein abnormales Produkt des physiologischen Vorgangs der Blutgerinnung (DOOLITTLE 1987). Voraussetzung für die Entstehung von Thrombosierungen ist, daß prothrombotische Aktivitäten gegenüber den physiologisch vorhandenen antithrombotischen überwiegen oder das antithrombotische System gestört ist (LUZZATO und SCHAFER 1990).

Schon VIRCHOW (1856) erkannte, daß als auslösende Faktoren für die intravasale Gerinnung, und somit für die Thrombusbildung, mechanische Effekte (insbesondere rheologische), gerinnungsfördernde Blutbestandteile und/oder Schäden der Gefäßwand verantwortlich sein können.

Eine gestörte Rheologie führt zu verstärkter Blut-Gefäßwand-Interaktion und verhindert eine schnelle Verdünnung und Entfernung aktivierter Gerinnungsfaktoren, wodurch es zu intravasaler Gerinnung kommen kann (LUZZATO und SCHAFER 1990).

Ein gesundes Endothel wirkt antithrombotisch durch die Bereitstellung von heparinähnlichen Substanzen, Antithrombin III und t-PA. An geschädigten Endothelien kommt es zur Anlagerung von Thrombozyten und nachfolgender Fibrineinlagerung zwischen die Blutplättchen (LUZZATO und SCHAFER 1990). Eine reine Endothelverletzung mit Verlust der Zellintegrität ohne gleichzeitige oder vorhergehende Aktivierung der Gerinnung von anderer Seite reicht für eine Thrombusbildung nach Ansicht anderer Autoren jedoch vermutlich nicht aus (DRAKE *et al.* 1989). Unter hypoxischen Bedingungen wird im Endothel das dynamische Gleichgewicht aus Pro- und Antithrombose in Richtung der Prothrombose gekippt, ein Effekt, der durch Reoxygenierung noch verstärkt wird (GERTLER *et al.* 1991).

Nach neueren Untersuchungen führt Hypoxie wahrscheinlich zu intravasalen Fibrinablagerungen, indem Makrophagen zur Produktion des Faktor-VII-Aktivators *tissue factor* (TF) (LAWSON *et al.* 1997, YAN *et al.* 1998) und des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors 1 (PAI 1) (PINSKY *et al.* 1998) angeregt werden.

#### 2.2.2.3.2. *Aufbau und Kinetik von Thrombosierungen*

Der Hauptbestandteil von frischen Thrombosierungen ist Fibrin (BINI *et al.* 1987, BOOTH und BENNETT 1994), dessen Anteil am Thrombus umso höher ist, je gestörter die Rheologie in dem betroffenen Gefäß ist (MUSTARD *et al.* 1987). Allerdings bestehen im Fibrinanteil der

Thrombosierungen interindividuelle Unterschiede, die teilweise mehr als 500% betragen (ORVIM *et al.* 1996).

Untersuchungen an Schweinen und Kaninchen mit experimentell erzeugten Thrombosierungen haben gezeigt, daß diese zunächst vor allem aus Blutplättchen bestehen, welche durch ein feines Fibrinnetz verbunden sind. Der Fibrinanteil nimmt dann rapide zu, bis er nach sieben Stunden ein Maximum erreicht. Nach zwei Tagen nimmt der Fibringehalt langsam wieder ab. Nach spätestens 19 Tagen ist der Thrombus organisiert, es ist kein Fibrin mehr vorhanden (JØRGENSEN *et al.* 1967). Experimentell beim Hund verursachte großen Thromben werden je nach Lage des Gerinnsels innerhalb der ersten drei Stunden nach der Thrombogenese bereits zu einem Drittel bis zur Hälfte durch Fibrinolyse wieder aufgelöst, wenn der Thrombus in Kontakt zu ungeronnenem Blut steht. Der weitere Abbau erfolgt weitaus langsamer. Ob und wann das Tier nach Thrombusinduktion getötet wurde, ist von nur geringem Einfluß auf die Thrombolyserate (MOSER *et al.* 1973).

Im Gegensatz zu echten Thromben bestehen postmortal bzw. post operationem in exzidiertem Gewebe entstandene Gerinnsel vorwiegend aus Erythrozyten (HARMS und LEHMANN 1969) und weisen keine Wandhaftung auf.

#### 2.2.2.4. extravasale Gerinnung

Unter physiologischen Bedingungen findet sich im Gewebe eine geringe, kaum nachweisbare Menge an Fibrinogen und kein Fibrin. Gelangt eine gegenüber dem Normalen erhöhte Menge von Plasma in den extravasalen Raum, so wird dort durch den Kontakt von im Plasma enthaltenem Fibrinogen und Gerinnungsfaktoren mit dem Gewebe die Gerinnungskaskade ausgelöst (DVORAK *et al.* 1984). Diese mündet in der Bildung von Fibrin, sofern im Gewebe Strukturen vorhanden sind, deren Oberfläche die Bildung des Prothombinasekomplexes ermöglicht (vgl. Kapitel 2.2.2.1, S. 6). Spezielle Prokoagulantien oder eine erhöhte Menge an Gerinnungsfaktoren scheinen bei der extravasalen Gerinnung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (DVORAK *et al.* 1985). In jüngster Zeit wird vermutet, daß Gewebshypoxie durch Suppression der Fibrinolyse die extravasale Fibrinbildung unterstützt (PINSKY *et al.* 1998).

### **2.3. Krebserkrankung und das Blutgerinnungssystem**

#### **2.3.1. Einleitung**

Schon 1872 wies TROUSSEAU erstmals auf die Beeinflussung des Blutgerinnungssystems durch neoplastische Erkrankungen hin, als er das häufige Auftreten von Thrombosierungen großer Venen der unteren Extremität bei Krebspatienten beschrieb. Heute kann als gesichert gelten, daß es sich dabei nicht um ein tumorassoziertes Epiphänomen handelt, sondern vielmehr dem Gerinnungssystem eine gewisse Bedeutung bei Wachstum und Ausbreitung der Tumorerkrankung zukommt (DVORAK 1987, COSTANTINI und ZACHARSKI 1993, DONATI 1995).

## 2.3.2. systemische Blutgerinnungsstörungen bei neoplastischen Erkrankungen

### 2.3.2.1. klinisch manifeste Blutgerinnungsstörungen

Systemische Blutgerinnungsstörungen können bei Krebskranken sowohl in Form erhöhter Blutungsneigung als auch in Form erhöhter Thromboseneigung klinisch manifest werden (GOODNIGHT 1974) und sind bei dieser Patientengruppe die zweithäufigste Todesursache (AMBRUS *et al.* 1975). Entsprechende Gerinnungsabweichungen sind auch bei an Krebs erkrankten Hunden wohlbekannt, wenn auch klinisch manifeste Thrombosen seltener aufzutreten scheinen (O'KEEFE und COUTO 1988, ROGERS 1992).

Beim Menschen können Thrombosierungen großer Venen auf eine okkulte Krebserkrankung hinweisen (BARON *et al.* 1998, SØRENSEN *et al.* 1998), für den Brustkrebs ist dieser Zusammenhang jedoch nicht nachweisbar (SØRENSEN *et al.* 1998). Entsprechende Komplikationen, welche bei Patientinnen mit klinisch manifestem Brustkrebs auftreten, werden von WEISS *et al.* (1981) als Nebenwirkung der Chemotherapie interpretiert. Trotz einer in vielen Fällen labordiagnostisch nachgewiesenen Hyperkoagulabilität konnte bei keinem der Hunde, welche STOCKHAUS (1998) untersuchte (vgl. Kapitel 2.3.2.2., S. 9f), klinisch oder pathologisch-anatomisch bzw. -histologisch eine Thrombose oder Mikrothromben diagnostiziert werden.

Die erhöhte Blutungsneigung der Krebspatienten ist meist Folge einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG); diese Komplikation ist bei an Brustkrebs erkrankten Frauen recht häufig (KIES *et al.* 1980) und auch in Einzelfällen bei Hündinnen mit Gesäugetumoren beschrieben worden (SLAPPENDEL *et al.* 1972, FELDMAN *et al.* 1981, KAMMERMANN *et al.* 1971, SUSANECK *et al.* 1983). Hypokoagulabilität kann durch einen erhöhten Verbrauch an Gerinnungsfaktoren und Plättchen vorgetäuscht werden, ohne daß eine DIG auftritt, wenn entstehende Mikrothromben sofort wieder aufgelöst werden (SLAPPENDEL *et al.* 1972).

### 2.3.2.2. Veränderungen labordiagnostisch nachweisbarer Gerinnungsparameter

Bei der weitaus überwiegenden Zahl der Krebspatienten, welche keine klinischen Blutgerinnungsstörungen zeigen, sind dennoch ein oder mehrere labordiagnostisch nachweisbare Gerinnungsparameter gegenüber der Norm verändert, meist in Richtung einer Hyperkoagulopathie. Dies gilt für den Menschen (SUN *et al.* 1979) ebenso wie für den Hund (MADEWELL *et al.* 1980, O'DONNELL *et al.* 1981). Eine detaillierte Übersicht über die Veränderung von Gerinnungsparametern bei neoplastischen Erkrankungen liefert STOCKHAUS (1998).

In der Literatur finden sich uneinheitliche Angaben über Veränderungen der Gerinnungsparameter beim Brustkrebs des Menschen. Die Plasmawerte von D-Dimer, einem Fibrinabbauprodukt, sind bei Mammatumorpatientinnen gegenüber der Norm signifikant erhöht (NEISES *et al.* 1993). 95% der von SUN *et al.* (1979) untersuchten Brustkrebspatientinnen zeigten eine labordiagnostisch nachweisbare Koagulopathie. Hingegen fanden MCCULLOCH *et al.* (1990) keine entsprechenden signifikanten Veränderungen.

Die detaillierteste Arbeit über die Veränderungen von Gerinnungsparametern bei Hunden, welche an Mammakarzinomen leiden, stammt von STOCKHAUS (1998), der 60 Tiere untersuchte. Bei zwei Dritteln der Hunde war mindestens einer der durchgeführten Gerinnungstests



abnormal. Davon hatten 15% ausschließlich hypokoagulatorische, 47,5% sowohl hypo- als auch hyperkoagulatorische und 37,5% ausschließlich hyperkoagulatorische Abweichungen. Die Häufigkeit und Komplexität der Gerinnungsstörungen stieg dabei mit der Tumorprogression. Das relative Risiko einer Gerinnungsabweichung war vom Myoepithelgehalt des Tumors und intratumoralen Blutungen unabhängig, stieg jedoch bei Tieren mit großen Tumoren, Metastasen oder mit Tumoren mit Kapseldurchbruch an, bei Hunden mit Tumoren mit Nekrosen sogar stark.

### **2.3.3. Produkte von Zellen in Mammatumoren mit potentieller Wirkung auf Blutgerinnung, Fibrinolyse oder Endothelzellen**

#### *2.3.3.1. Einleitung*

Viele Tumoren des Menschen und der Tiere haben die potentielle Fähigkeit, durch Produkte aus dem Tumorparenchym oder -stroma direkt in das Blutgerinnungs-/Fibrinolyse-System einzugreifen. So kann z.B. über Bildung von Substanzen wie dem Blutgerinnungsfaktor X, dem Faktor-X-Aktivator *cancer procoagulant* (CP) oder TF die Gerinnungskaskade ausgelöst werden. Einige Neoplasien fördern die Plättchenaggregation. Auch das Fibrinolyse-System wird von diversen Tumoren durch die Bildung der Plasminogenaktivatoren uPA und tPA oder deren Inhibitoren PAI 1 und PAI 2 beeinflusst. Durch Bildung von *vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor* (VPF/VEGF) in Tumorzellen oder Tumorgefäßendothelzellen kann die Permeabilität der Tumorgefäße gesteigert und die Blutgerinnung indirekt beeinflusst werden. Es existieren verschiedene Untersuchungen über das Vorkommen dieser Eigenschaften bei spontanen Mammatumoren des Menschen und der Tiere sowie bei Mammakarzinomzelllinien. Ergebnisse aus Untersuchungen über gerinnungsbeeinflussende Eigenschaften von Mammakarzinomzellen in Kultur können jedoch anzuchtabhängig variieren (BARENDZ-JANSON *et al.* 1998).

#### *2.3.3.2. direkte Aktivierung der Gerinnungskaskade*

In der Literatur herrscht Einigkeit darüber, daß maligne Neoplasien der Mamma prokoagulatorisch wirken können, unklar ist jedoch, was genau diese Eigenschaft bewirkt.

**Faktor X** kann in Tumorzellen von spontanen Mammakarzinomen des Menschen nachgewiesen werden, nicht jedoch in unverändertem oder benigne verändertem Mammagewebe. Es ist nach Ansicht der Untersucher jedoch auch möglich, daß es sich um Faktor X aus dem Plasma handelt, welcher durch CP aktiviert wurde (COSTANTINI *et al.* 1991b).

**CP** findet sich bei der Mehrzahl der an Brustkrebs erkrankten Frauen im Serum (KOZWICH *et al.* 1994) und kann auch in isolierten Mammatumorzellen nachgewiesen werden (ZUCHELLA *et al.* 1993). Nach GRIGNANI *et al.* (1988) stellt CP die alleinige Ursache für die prokoagulatorischen Eigenschaften der von ihnen untersuchten Mammakarzinome des Menschen dar.

Verschiedene Untersuchungen von Mammatumoren und unverändertem Mammagewebe des Menschen auf **TF** führten zu widersprüchlichen Ergebnissen: In den von COSTANTINI *et al.* (1991b) untersuchten Proben konnte kein TF dargestellt werden. SHOJI *et al.* (1998) wiesen TF im Endothel von Tumorgefäßen nach, ebenso CONTRINO *et al.* (1996) die zusätzlich TF in

maligne neoplastischen Zellen fanden, nicht jedoch in benignen Veränderungen und deren Gefäßen. Sie sehen in TF nicht nur die Ursache für die erhöhte Gerinnungsbereitschaft bei Brustkrebspatientinnen, sondern auch einen Angiogenesemarker. Zusätzlich weisen sie auf die Möglichkeit hin, daß die TF-Produktion in Endothelien die Tumorzellmigration in die Gefäße fördern könnte. LUTHER *et al.* (1996) hingegen konnten keinen Unterschied in der TF-Menge in Epithel- und Myoepithelzellen in maligne und benigne verändertes Mammagewebe nachweisen. VRANA *et al.* (1996) stellten zwar eine nur geringe Erhöhung der TF-Menge in Karzinomzellen im Vergleich mit normalen Epithelzellen fest, jedoch fanden sie eine deutliche Korrelation zwischen dem Vorkommen von TF in Stromazellen des Tumors und dessen Invasivität.

PASQUALINI *et al.* (1997), die Kulturen von Mammarkarzinomzellen der Maus untersuchten, weisen auf die Möglichkeit hin, daß die gerinnungsfördernden Eigenschaften von Mammatumoren durch von den neoplastischen Zellen gebildete **Oberflächenproteinasen** bedingt sein könnten.

#### 2.3.3.3. Plättchenaggregation

Verschiedene Zelllinien von Mammatumoren von Menschen beschleunigen *in vitro* die Plättchenaggregation (AL-MONDHIRI *et al.* 1983, BELLOC *et al.* 1995). Aggregierte Plättchen können über die **platelet-derived procoagulant activity** zur Thrombinbildung führen (AL-MONDHIRI *et al.* 1983) und das Tumorwachstum durch die Ausschüttung von **platelet-derived growth factor** (HARA *et al.* 1980) fördern. Über verschiedene, teils ungeklärte Mechanismen begünstigen die aggregierten Plättchen ausserdem die Tumorinvasivität und die Angiogenese (BELLOC *et al.* 1995).

#### 2.3.3.4. Beeinflussung der Fibrinolyse

Dem Fibrinolysesystem wird eine entscheidende Rolle bei der Tumorinvasion zugesprochen, da die gezielte Ausschüttung von Plasminogenaktivatoren und -inhibitoren einen gerichteten Matrixabbau in Richtung der Tumorausbreitung erlaubt (JÄNICKE *et al.* 1994). PAI 1 spielt ausserdem möglicherweise eine Rolle bei der Angiogenese (GRØHNDAHL-HANSEN *et al.* 1993). Hohe Werte von PAI 1 und uPA im Cytosol von Mammatumorzellen der Frau sind mit einer schlechteren Prognose korreliert (GRØHNDAHL-HANSEN *et al.* 1993, BOUCHET *et al.* 1994), ebenso niedrige Werte von PAI 2 (BOUCHET *et al.* 1994).

Über das Vorkommen von Plasminogenaktivatoren und ihren Inhibitoren in malignen und benignen Mammatumoren der Frau herrscht Uneinigkeit in der Literatur. Die meisten Untersucher fanden in maligne entartetem Mammagewebe größere Mengen an **uPA** als in benigne verändertes Gewebe (JÄNICKE *et al.* 1994, NEISES *et al.* 1993, COSTANTINI *et al.* 1991a, SUMIYOSHI *et al.* 1992). Einen entsprechenden Unterschied stellten COSTANTINI *et al.* (1991a) auch für **tPA** fest, nicht jedoch SUMIYOSHI *et al.* (1992). DAMJANOVICH *et al.* (1994) hingegen fanden in gutartigen und bösartigen Mammaveränderungen sowohl gleiche Mengen an tPA als auch an uPA. **PAI 1** konnte von JÄNICKE *et al.* (1994), SUMIYOSHI *et al.* (1992) und COSTANTINI *et al.* (1991a) in Karzinomen der Mamma in größerer Menge als in Fibroadenomen nachgewiesen werden. Von gegenteiligen Ergebnissen berichten DAMJANOVICH *et al.* (1994). Nach SUMIYOSHI *et al.* (1992) weisen Mammarkarzinome ausserdem einen hohen Gehalt an **PAI 2** auf.

Unter hypoxischen Bedingungen kommt es auf der Oberfläche von Mammakarzinomzellen von Menschen *in vitro* zu einer verstärkten Ausbildung von Rezeptoren für uPA, was vermutlich die Invasivität dieser Zellen erhöht (GRAHAM *et al.* 1999).

#### 2.3.3.5. Tumorzellprodukte mit Wirkung auf Endothelzellen

In gut vaskularisierten Karzinomen der Brustdrüse wird von den neoplastischen Zellen eine wesentlich größere Menge an VPF/VEGF gebildet als von neoplastischen Zellen in schlecht vaskularisierten Mammatumoren oder von unveränderten Zellen des Gangepithels. Bei erstgenannten Neoplasien bilden die kapillären Endothelzellen zudem eine große Zahl an VPF/VEGF-Rezeptoren aus (BROWN *et al.* 1995). Die Bildung von VPF/VEGF in Mammakarzinomzellen *in vitro* wird durch Hypoxie unabhängig von der Umgebungsazidität angeregt, wobei starke Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien bestehen (SCOTT *et al.* 1998). VPF/VEGF wird unter hypoxischen Bedingungen auch von unveränderten Fibroblasten aus der Mamma des Menschen gebildet, besonders, wenn diese tumorös entartet ist (HLATKY *et al.* 1994). Die permeabilitätssteigernde Wirkung von VPF/VEGF beruht vermutlich auf einer Aktivierung der VVOs (QU-HONG *et al.* 1995, Übersicht bei DVORAK *et al.* 1999, vgl. Kapitel 2.1.3.3., S. 5). VPF/VEGF führt zudem *in vitro* in Endothelzellen zur Bildung von uPA, tPA und PAI 1 (PEPPER *et al.* 1991) und TF (ZUCKER *et al.* 1998). Für letzteres wird von SHOJI *et al.* (1998) anhand der Ergebnisse von Untersuchungen an Zellkulturen und Gewebeproben von Mammakarzinomen der Frau jedoch der umgekehrte Zusammenhang vermutet. VPF/VEGF wirkt vermutlich ausserdem stark proangiogenetisch (SENGER *et al.* 1996, SHOJI *et al.* 1998).

#### 2.3.4. Blutgerinnungssystem und Metastasierung

Das Blutgerinnungssystem spielt eine Schlüsselrolle bei der hämatogenen Metastasierung von Tumoren. An Mammatumorzelllinien konnte gezeigt werden, daß das Metastasierungspotential der verschiedenen Zelllinien mit einer stärkeren Ausprägung der proaggregatorischen und prokoagulatorischen Eigenschaften der Zellen zunimmt (PASQUALINI *et al.* 1997).

Im Blut schwimmende Tumorzellen sind von einem Fibrinmantel umgeben (KINJO 1978). Dieser schützt die Zellen möglicherweise vor dem Kontakt mit zytotoxischen Killerzellen der Wirtsabwehr (GORELIK *et al.* 1984, GUNJI und GORELIK 1988) und ist wahrscheinlich für die Haftung von Tumorzellemboli am Gefäßendothel und somit für die Möglichkeit der Metastasenbildung verantwortlich (KINJO 1978, AMIRKHOSRAVI und FRANCIS 1995). Andere Autoren meinen, daß die Metastasierungsrate fibrinunabhängig durch die vermehrte Anwesenheit bestimmter Gerinnungsfaktoren erhöht wird (MCCULLOCH und GEORGE 1988).

#### 2.3.5. extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren

##### 2.3.5.1. Voraussetzungen und mögliche Ursachen

Da Tumoren mit Ausnahme von einigen gut differenzierten Leberneoplasien kein Fibrin oder Fibrinogen synthetisieren, muß extravasal in Tumoren vorliegendes Fibrin vor Ort aus dem im Blut zirkulierenden Fibrinogen gebildet worden sein (DVORAK 1986). Für die Bildung von Fibrin im Tumorgewebe gelten grundsätzlich die gleichen Voraussetzungen wie im Normalgewebe (vgl. Kapitel 2.2.2.4., S. 8).

Die benötigte verstärkte Extravasation von Plasma tritt in den meisten Tumoren auf (zur Übersicht s. NAGY *et al.* 1988, vgl. Kapitel 2.1.3.3., S. 5) und stellt den limitierenden Schritt der intratumoralen Fibrinogenese dar (DVORAK 1987). Nach SHOJI *et al.* (1998) kann sich die Wirkung der vom Tumor gebildeten permeabilitätssteigernden Cytokine auch auf sein Umgebungsgewebe erstrecken und zu Fibrinablagerungen am Übergang vom Tumor- zum Umgebungsgewebe führen.

Die ausserdem für die Fibrinbildung essentielle Fähigkeit zur Auslösung der Gerinnungskaskade stellt keine von Tumorzellen neu erworbene Eigenschaft dar, sondern ist eine fundamentale Eigenschaft vieler Zellen des unveränderten Gewebes (DVORAK 1986). Für die extravasale Gerinnung dürften zudem die prokoagulatorischen Eigenschaften der in den meisten Tumoren vorhandenen nichtentarteten Zellen des Stromas ausreichen (DVORAK 1987). In diesen nimmt in Mammakarzinomen die Bildung von TF mit dem Tumorwachstum zu (VRANA *et al.* 1996). Nach anderer Ansicht besteht die Möglichkeit, daß Makrophagen durch Produktion von TF für die Gerinnung in Mammatumoren zumindestens teilweise, wenn nicht ausschließlich, verantwortlich sind (VRANA *et al.* 1996, SHOJI *et al.* 1998). Im Tierversuch konnte eine Fibrinbildung in Normalgewebe durch hypoxieinduzierte TF-Bildung in Makrophagen provoziert werden (YAN *et al.* 1998).

Einen kritischen Punkt in der Bildung extravasalen Fibrins in Tumoren stellt die Verfügbarkeit einer Oberfläche zur Bildung des Prothrombinasekomplexes dar (VANDEWATER *et al.* 1985, vgl. Kapitel 2.2.2.1., S. 6). Da im Tumorgewebe keine Thrombozyten vorhanden sind, die potentiell diese Aufgabe erfüllen könnten, wird diese von den Tumorzellen selbst übernommen (DVORAK 1986, DVORAK 1987). Eine zusätzliche Möglichkeit zur Fibrinbildung am Übergang vom Tumor- zum Normalgewebe besteht in einer Permeabilitätserhöhung der Gefäße in unmittelbarer Umgebung des Tumors mit nachfolgender Gerinnung des ausgetretenen Fibrinogens (SHOJI *et al.* 1998).

### *2.3.5.2. Kinetik der extravasalen Fibrinbildung in Tumoren*

Die Nettoakkumulation extravasalen Fibrins in Tumoren ist von den drei ständig parallel ablaufenden Vorgängen Extravasation, Gerinnung und Fibrinolyse abhängig (DVORAK 1986, COSTANTINI und ZACHARSKI 1993, DAMJANOVICH *et al.* 1994).

An experimentellen Hepatokarzinomen konnte gezeigt werden, daß der Fibrinogeninflux in Tumorgewebe den in Normalgewebe um das 5-10fache übersteigt (DVORAK *et al.* 1984). In das Tumorgewebe eingeströmtes Fibrinogen gerinnt sehr schnell zu quervernetztem Fibrin und wird rasch wieder abgebaut bzw. durch neugebildetes Fibrin ersetzt (BROWN *et al.* 1988b; DVORAK *et al.* 1984). Da der Efflux von Fibrin und Fibrinogen verglichen mit dem anderer Plasmaproteine gering ist, kommt es zur Fibrinakkumulation (DVORAK *et al.* 1984). Fibrinogeninflux und -umsatz im Tumor sind konstant (BROWN *et al.* 1988b), der die aktuelle Fibrinmenge in Tumoren hauptsächlich bestimmende Faktor ist die Fibrinolyse (DVORAK *et al.* 1984).

### 2.3.5.3. Vorkommen von extravasalen Fibrinablagerungen in Tumoren

#### 2.3.5.3.1. Einleitung

In normalem Gewebe befindet sich nur sehr wenig oder kein Fibrin (vgl. Kapitel 2.2.2.4., S. 8). Dies trifft auch auf unverändertes und nichtneoplastisch verändertes Milchdrüsengewebe der Frau zu (DVORAK *et al.* 1981, COSTANTINI *et al.* 1991b).

1958 wurde erstmals durch O'MEARA auf die Möglichkeit extravasaler Fibrinablagerungen in Tumoren hingewiesen. Erst durch die Einführung der Immunhistochemie wurde der Fibrinnachweis im Gewebe zweifelsfrei möglich (vgl. Kapitel 2.4., S. 19ff). Seither sind einige Tumoren, besonders des Menschen, auf das Vorhandensein von Fibrin untersucht worden. Nach DVORAK (1987) steigt die Menge extravasalen Fibrins in Tumoren mit dem Grad der Tumordesmoplasie und ist in Neoplasien desselben Typs stets ähnlich. Ein Zusammenhang zwischen der Dignität eines Tumors und der Menge der Fibrinablagerungen besteht nach Ansicht von DVORAK (1986) nicht.

#### 2.3.5.3.2. extravasale Fibrinablagerungen in Spontantumoren des Hundes

Die neben Ergebnissen aus der vorliegenden Untersuchung (GOLOMBIEWSKI *et al.* 1997) einzige publizierte Untersuchung über Fibrinablagerungen in einem **Mammatumor** des Hundes stammt von MCEVOY *et al.* (1996). Sie wiesen in einer benignen Neoplasie der Mamma einer Hündin mittels Immunfluoreszenz extravasal gelegenes Fibrin nach, welches sich gleichmäßig verteilt und ohne Bezug zu bestimmten Strukturen im Stroma befand.

Neben der oben erwähnten Mammaneoplasie wurden auch ein **Magen-** und ein **Bronchialkarzinom** von Hunden von MCEVOY *et al.* (1996) auf Fibrinablagerungen untersucht. Während sich in dem Magenkarzinom besonders um Drüsenepithelklumpen herum eine große Menge an Fibrin fand, war das Bronchialkarzinom fibrinnegativ.

#### 2.3.5.3.3. extravasale Fibrinablagerungen in Spontantumoren des Menschen

Die Angaben über Vorkommen und Verteilung extravasal gelegenen Fibrins in **Mammatumoren** des Menschen sind teilweise widersprüchlich. DVORAK *et al.* (1981) stellten mit Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie in allen 14 Adenokarzinomen und vier von fünf Fibroadenomen ihrer Studie Fibrin dar. Dieses befindet sich größtenteils am Übergang vom Tumor- zum unveränderten Gewebe. Teils liegt es auch an Nekroserändern oder als fibrilläres Netzwerk zwischen Bündeln von Kollagen und Fett oder umgibt einige peripher gelegene Tumorzellnester. In zentralen Tumorarealen befindet sich nur wenig oder gar kein Fibrin. Areale, in denen sich viele Lymphozyten aufhalten, sind meist fibrinnegativ. Auch CONTRINO *et al.* (1996) konnten in allen sieben untersuchten malignen Mammaneoplasien immunhistochemisch intratumorales Fibrin nachweisen, welches meist perivaskulär liegt. Benigne Veränderungen sind in dieser Untersuchung hingegen fibrinnegativ. Zu anderen Ergebnissen gelangten COSTANTINI *et al.* (1991b), welche immunhistochemisch zehn Adenokarzinome und zwei Fibroadenome der Mamma auf Fibrin und Fibrinogen untersuchten. Sie fanden in keiner der bearbeiteten Neoplasien Fibrin, in den malignen Veränderungen jedoch große Mengen an Fibrinogen.

Neben Neoplasien der Mamma wurden auch diverse andere Tumoren des Menschen immun-histochemisch auf das Vorhandensein und die Lage von extravasalen Fibrinablagerungen untersucht. In 80% der ihnen vorliegenden verschiedenen **Lungenkarzinome** konnten SHOJI *et al.* (1998) extravasal gelegenes Fibrin nachweisen, welches in der Mehrzahl im Stroma und dort meist perivaskulär liegt. Tumorzellassoziertes Fibrin trat in nur 16% der Fälle auf. Bei einer Untersuchung von **Tumoren der Pleura** zeigten acht von neun malignen Mesotheliomen und eine von drei benignen Veränderungen Fibrin im Stroma, meist am invasiv wachsenden Rand der Neoplasie gelegen, bei einem Teil der malignen Tumoren auch als Einzelstränge innerhalb des Tumors (IDELL *et al.* 1995). Auch in **malignen Non-Hodgkin-Lymphomen der Milz** liegt Fibrin vor allem am Rand der Tumoren (HEUSERMANN und BRANDENBURG 1985), ebenso in **Nierenkarzinomen** (WOJTUKIEWICZ *et al.* 1990a) und **Glioblastomen** (BARDOS *et al.* 1996).

Sehr wenig bzw. kein Fibrin, aber viel Fibrinogen findet sich im Stroma von **malignen Melanomen** (WOJTUKIEWICZ *et al.* 1990b) bzw. **Prostatakarzinomen** (WOJTUKIEWICZ *et al.* 1991). Auch **Kolonkarzinome** sind fibrinnegativ (WOJTUKIEWICZ *et al.* 1989).

#### *2.3.5.3.4. extravasale Fibrinablagerungen in experimentellen Tumoren bei Versuchstieren*

In **Mammakarzinomen**, welche subcutan in Mäuse eingepflanzt wurden, konnten BROWN *et al.* (1988a) unter Verwendung radioaktiv markierten Fibrinogens eine Anreicherung von Fibrin nachweisen. Auch in transplantierten präneoplastischen Mammahyperplasien findet eine solche Anreicherung, wenn auch in geringerem Maße, statt.

Die detailliertesten Arbeiten über extravasale Fibrinablagerungen in Neoplasien stammen aus Untersuchungen von Tumoren zweier **Hepatokarzinom**-Zelllinien unterschiedlicher Malignität, die subcutan in Meerschweinchen herangezüchtet wurden. Tumoren der geringer malignen Variante bestehen kurz nach der Implantation in das Wirtstier schnell aus bis zu 80% Fibrin, welches innerhalb der folgenden Tage durch eine Art Granulationsgewebe komplett ersetzt wird. Der Fibringehalt der bösartigeren Tumoren liegt bei 10%, dieses wird aber nicht "organisiert" und findet sich am Übergang zum unveränderten Wirtsgewebe (DVORAK *et al.* 1979). Der Fibringehalt der Tumoren übersteigt den von Normalgewebe im Falle der geringer bzw. höher malignen Tumorvariante um das 48-117fache bzw. um das 16-28fache (DVORAK *et al.* 1984).

#### *2.3.5.4. Bedeutung extravasaler Fibrinablagerungen in Tumoren*

Das Vorhandensein von Fibrinablagerungen im Tumorgewebe heißt nicht zwingend, daß ihm Bedeutung in der Tumorbilogie zukommt. Es könnte sich auch lediglich um ein entnahme- oder bearbeitungsbedingtes Artefakt oder ein durch Gewebsthromboplastine bedingtes nekroseassoziiertes Epiphänomen handeln (DVORAK 1986). Ersteres würde gleiche Ergebnisse bei allen auf diese Art gewonnenen Gewebeproben verursachen, letzteres läßt sich gegebenenfalls durch Lagebestimmung des Fibrins beantworten (COSTANTINI und ZACHARSKI 1993). Es gibt viele Hinweise, daß extravasale Fibrinablagerungen eine wichtige Rolle beim Tumorstadium spielen (DVORAK 1986, Übersichten bei COSTANTINI und ZACHARSKI 1993, NAGY *et al.* 1988). Entsprechende Theorien werden heute gemeinhin auf alle die Tumoren angewendet, bei denen sich Fibrin in größerer Menge im Stroma befindet (IDELL *et al.* 1995, SHOJI *et*

al. 1998), so auch von DVORAK *et al.* (1981) auf Karzinome und Fibroadenome der Brustdrüse der Frau. Letzterem widersprechen jedoch COSTANTINI *et al.* (1991b) aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse (vgl. Kapitel 2.3.5.3.3., S. 14f).

Im Tumorstroma gelegenes Fibrin dient als Schutz vor der **Immunabwehr des Wirtsorganismus**, indem es eine für Entzündungszellen des Wirtsorganismus schwer überwindbare Barriere zwischen unverändertem und entartetem Gewebe bildet (DVORAK *et al.* 1979, DVORAK 1986). Die Ursache vermutet DVORAK (1986) darin, daß eine hohe Fibrinkonzentration, wie sie in Tumoren vorliegt, die Migrationsfähigkeit von Entzündungszellen herabsetzt. Zusätzlich erschwert eine Fibrinhülle um neoplastische Zellen deren Zerstörung durch Killerzellen (vgl. Kapitel 2.3.4., S. 12).

Fibrin kann auch einen gegenteiligen Effekt auf die Immunabwehr haben. Es induziert in Endothelzellen die Bildung von Interleukin-8, welches positiv chemotaktisch auf Leukozyten wirkt (QI *et al.* 1995).

Für die zentripetale Ausbreitung einer Neoplasie ist die Bildung eines sie versorgenden Stromas essentiell (vgl. Kapitel 2.1.3.1., S. 4). Besonders das am Übergang vom Tumor- zum Normalgewebe liegende Fibrin fungiert als **provisorische Matrix**, die schrittweise in Analogie zur Wundheilung durch reifes Stroma mit Kollagen und Gefäßen ersetzt wird (DVORAK *et al.* 1979, DVORAK 1986). Die zur Kollagenbildung benötigten Fibroblasten reagieren auf das Fibrin positiv chemotaktisch (DVORAK 1986).

Im normalen, reifen Stroma kann keine Endothelzellmigration und somit keine Angiogenese stattfinden. Fibrin dient nicht nur als Trägersubstanz für die **Einsprossung neuer Gefäße**, sondern hat zudem einen direkten pro-angiogenetischen Effekt (DVORAK *et al.* 1995). *In vitro* bewirkt Fibrin Vereinzeln und Migration von Endothelzellen aus einem *monolayer* (KADISH *et al.* 1979) und beschleunigt die Formung von Kapillaren, indem sich die Endothelzellen um Fibrinfasern herum anordnen, welche anschließend unter Zurücklassung eines Lumens abgebaut werden (OLANDER *et al.* 1985).

Mit Anstieg des Polymerisationsgrades und des Fibronektin Gehaltes behindert Fibrin zunehmend die **Migrationsfähigkeit von Makrophagen** (DVORAK 1986, LANIR *et al.* 1988). Fibrin beeinflusst außerdem die **Blutgerinnung**, indem es über Aktivierung von tPA die Fibrinolyse steigert (vgl. Kapitel 2.2.2.2., S. 6f) und (*in vitro*) in Endothelzellen die Expression von TF induziert (CONTRINO *et al.* 1997).

## 2.3.6. Thrombosierungen in Tumoren

### 2.3.6.1. Voraussetzungen und mögliche Ursachen

Thrombosierungen in Tumoren benötigen für ihre Entstehung grundsätzlich die gleichen Voraussetzungen wie Thrombosierungen im übrigen Organismus (vgl. Kapitel 2.2.2.3.1., S. 7). Als eine mögliche Ursache für die Entstehung der von ihnen beobachteten Fibrinablagerungen in Tumorgefäßen nennen WOJTUKIEWICZ *et al.* (1991) (vgl. Kapitel 2.3.6.2.1., S. 17) einen Mechanismus, bei dem die Tumorzellen durch Cytokinproduktion das Endothel des Wirts in Richtung einer Gerinnungsförderung beeinflussen. Auch CLAUSS *et al.* (1990) entwickelten nach *in-vitro*-Versuchen mit Endothelzellen ähnliche Vermutungen.

### 2.3.6.2. Vorkommen von Thrombosierungen in Tumoren

#### 2.3.6.2.1. Einleitung

Neben der oben beschriebenen disseminierten intravasalen Gerinnung, von der Organe ausserhalb des Tumors betroffen sind (vgl. Kapitel 2.3.2.1., S. 9), kann es auch zur Bildung von ausschließlich intratumoralen Thrombosierungen kommen. Der gezielten histologischen Untersuchung von Spontantumoren der Tiere und des Menschen auf Thrombosierungen ist bisher und vor allem in jüngerer Zeit allerdings wenig Aufmerksamkeit gewidmet worden.

#### 2.3.6.2.2. Thrombosierungen in Spontantumoren des Hundes

Auf Thrombosierungen in **Mammatumoren** des Hundes gibt es bis auf die Ergebnisse der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchung (GOLOMBIEWSKI *et al.* 1997) nur einen indirekten Hinweis von O'DONNELL *et al.* (1981). Sie stellten bei mehr als der Hälfte der von ihnen untersuchten 53 Hunde mit verschiedenen Neoplasien eine verkürzte Überlebenszeit der Blutplättchen fest. Bei 44% der Tiere mit Adenokarzinomen war diese auf weniger als die Hälfte des Normalwertes reduziert, so auch bei mindestens einem Mammatumorpatienten. Als eine mögliche Ursache wird ein in den Tumorgefäßen lokalisierter Plättchenverbrauch genannt. SUSANECK *et al.* (1983) ziehen als Auslöser der von ihnen beobachteten DIG bei Hunden mit inflammatorischen Mammakarzinomen (vgl. Kapitel 2.3.2.1., S. 9) eine Stase in den Tumoren in Betracht, welche durch Obstruktionen tumornaher Lymphgefäße oder Endothelschäden von Tumorgefäßen bedingt sein könnte.

STOCKHAUS (1998) interpretiert die Ergebnisse der Blutuntersuchungen von Hunden mit Mammatumoren in seiner Studie (vgl. Kapitel 2.3.2.2., S. 9f) dahingehend, daß keinerlei Hinweise für einen signifikanten intratumoralen Fibrinogenverbrauch vorlägen.

Histologisch verifiziert wurden Thrombosierungen in sonstigen Tumoren des Hundes bisher nur in **Neoplasien der Gefäße**. RISHNIW und LEWIS (1994) wiesen in einem Hämangiosarkom eines Jack-Russel-Terriers diverse Thrombosierungen in den Gefäßen nach, ebenso HARGIS und FELDMAN (1991) in sieben von zehn untersuchten Hämangiomen und Hämangiosarkomen von Hunden.

Indirekte Hinweise auf intratumorale Thrombosierungen fanden O'DONNELL *et al.* (1981) (vgl. Kapitel 2.3.6.2., S. 17) und MADEWELL *et al.* (1980). Letztere vermuten aufgrund ihrer Ergebnisse aus der labordiagnostischen Untersuchung des Blutes von 100 an verschiedenen **Malignomen** erkrankten Hunden eine im Tumor lokalisierte intravasale Verbrauchs-koagulopathie bei einer nicht genau benannten geringen Zahl dieser Tiere. Die Art des Primärtumors der betroffenen Individuen wird nicht mitgeteilt.

#### 2.3.6.2.3. Thrombosierungen in Spontantumoren des Menschen

Die einzige konkrete Aussage über das Vorkommen von Thrombosierungen in **Mammatumoren** des Menschen stammt von DVORAK *et al.* (1981). Sie stellten bei der elektronen- und lichtmikroskopischen Untersuchung von Gefäßen in Mammakarzinomen der Frau zwar Endothelschäden fest (vgl. Kapitel 2.1.3.2., S. 4f), diese waren jedoch nur selten von Thrombosierungen begleitet, wobei genauere Angaben über deren Zahl und Lage fehlen.



CONTRINO *et al.* (1996) betonen die theoretische Möglichkeit von Thrombosierungen in malignen Mammatumoren, auch wenn sie solche nicht zweifelsfrei nachweisen konnten, da dargestelltes Fibrin nicht eindeutig Gefäßlumina zuzuordnen war. Auch NEISES *et al.* (1993), die im Blut von Brustkrebspatientinnen eine erhöhte Menge des Fibrinabbauproduktes D-Dimer fanden, ziehen als Ursache eine im Tumor lokalisierte intravasale Gerinnung in Betracht.

Intratumorale Thrombi in größerer Zahl wurden beim Menschen lediglich im Rahmen eines Kasabach-Merrit-Syndroms bei Patienten mit **Hämangiomen** (WARREL *et al.* 1983) oder **kaposiformen Hämangioendotheliomen** (ZUKERBERG *et al.* 1993) beschrieben.

WOJTUKIEWICZ *et al.* (1991) stellten in benignen und malignen **Prostataveränderungen** Fibrinablagerungen an einigen Gefäßwänden fest. Die betroffenen Gefäße konnten dabei keinen bestimmten Gewebestrukturen zugeordnet werden und standen nicht in Kontakt mit Nekrosen.

#### *2.3.6.2.4. Thrombosierungen in experimentellen Tumoren bei Versuchstieren*

TANNOCK und STEEL (1969) konnten mittels radioaktiv markierter Erythrozyten in zwei allo-transplantierten **Adenokarzinomen der Mamma** der Ratte diverse Gefäße darstellen, in denen es zur Hämostase gekommen war. Als Auslöser hierfür vermuten sie durch Thrombi oder Kompression verursachte Gefäßobstruktionen oder einen verlangsamten Blutfluß aufgrund von Kollateralen.

DVORAK *et al.* (1979) untersuchten zwei Varianten von subcutan in Meerschweinchen herangezogenen **Hepatokarzinomen** elektronen- und lichtmikroskopisch auf Gefäßveränderungen. In Tumoren der geringer malignen Variante stellten sie bei einigen Gefäßen Dilatationen, massive Füllung mit Erythrozyten und Endothelnekrosen fest, jedoch nur sehr vereinzelt Thrombosierungen.

#### *2.3.6.3. mögliche Folgen von Thrombosierungen in Tumoren*

Thrombosierungen können zur Obstruktion von Tumorgefäßen führen und besitzen somit das Potential, Areale des Tumors von der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen abzuschneiden (CLAUSS *et al.* 1990). Einen entsprechenden Zusammenhang vermuten MUSIANI *et al.* (1996) auch für bestimmte Mammakarzinome der Maus, welche durch genetische Veränderungen verschiedene Cytokine produzieren: In diesen Tumoren finden sich Thrombosierungen in kleinen und mittelgroßen intratumoralen Gefäßen und nekrotische Areale. Die Nekrosen sind dabei umso ausgeprägter, je mehr Thrombosierungen im Tumor vorliegen. Auch im Tierexperiment durch TNF $\alpha$ -Gabe in ursprünglich von Menschen stammenden Mammatumoren ausgelöste Thrombosierungen haben Nekrose und Apoptose von Tumorzellen zur Folge (DE KOSSODO *et al.* 1995). DVORAK *et al.* (1981) beschreiben in Mammakarzinomen der Frau Koagulationsnekrosen in der Art, wie sie auf ischämischer Basis entstehen, führen diese aber nicht auf Thrombusbildung sondern auf Endothelschäden zurück (vgl. Kapitel 2.1.3.2., S. 4f). Auch FISHER *et al.* (1978) berichten von infarktähnlichen Nekrosen in Mammatumoren der Frau, ohne eine Ursache hierfür gefunden zu haben.

## **2.4. Darstellung von extravasalem Fibrin und Thrombosierungen im Gewebsschnitt**

### **2.4.1. Einleitung**

Durch die Darstellung von Fibrin kann sowohl das Vorhandensein und die Lage extravasaler Fibrinablagerungen im Tumorgewebe als auch die Anzahl und die Lage von Thrombosierungen festgestellt werden. Hierzu stehen histologische und immunhistochemische Methoden zur Verfügung. Die alleinige Anwendung histologischer Färbetechniken zur Fibrindarstellung ist besonders zum Nachweis extravasalen Fibrins wegen dessen teilweise nicht eindeutiger Abgrenzbarkeit zu anderen Gewebestrukturen problematisch (DVORAK 1986, COSTANTINI und ZACHARSKI 1993).

### **2.4.2. histologische Färbetechniken**

#### *2.4.2.1. Mechanismus und Interpretation histologischer Färbungen*

Bei den histologischen Färbemethoden liegen je nach Art der darzustellenden Substanz und des verwendeten Farbstoffs verschiedene Mechanismen der Farbstoffbindung vor. Diese können chemischer oder elektrostatischer Natur sein oder sind auf physikalische Eigenschaften des Gewebes zurückzuführen. Oft spielen auch alle diese Komponenten zusammen. Zur Identifizierung von Gewebestandteilen müssen Farbreaktion, morphologisches Verhalten und Lage der Strukturen gemeinsam beurteilt werden (BÖCK 1989).

#### *2.4.2.2. Darstellung von Fibrin mit histologischen Färbetechniken*

Die in der Literatur beschriebenen Färbungen zur Darstellung von Fibrin sind Polychromfärbungen im Sinne der Definition von SHOOBRIDGE (1983). Sie dienen der gleichzeitigen Darstellung verschiedener Komponenten des Bindegewebes und beruhen auf der Verwendung negativ geladener (saurer) Farbstoffe. Nach einer Kernfärbung werden jeweils ein oder mehrere kleinemolekulare gelbe bzw. orangefarbene, ein oder mehrere mittelmolekulare rote und ein großmolekularer blauer Farbstoff zur Bindegewebs- und Fibrinfärbung eingesetzt. In allen Techniken wird auch Wolframatophosphorsäure (im folgenden WPS genannt) verwendet. Diese gilt als "farbloser Farbstoff" (BAKER 1958) und wird seit den dreissiger Jahren zur Intensivierung und Fixierung der Farbstoffe in Polychromfärbungen genutzt (SHOOBRIDGE 1983). Bei einigen Techniken werden die Schnitte in verschiedenen Lösungen vorbehandelt, um die Farbbrillanz der Bindegewebs- und Fibrinfärbung zu erhöhen.

Die Farbstoffe verteilen sich im Gewebsschnitt vermutlich hauptsächlich aufgrund elektrostatischer Phänomene (BÖCK 1989) und der Molekülgröße (BÖCK 1989, LENDRUM *et al.* 1962). Ersteres erklärt die Wichtigkeit des sauren pHs bei der Färbung, letzteres die des Faktors Zeit: bei zu langer Einwirkzeit können auch größermolekulare Farbstoffe in engmaschige Texturen eindringen und deren Anfärbung verändern (LENDRUM *et al.* 1962), gleichzeitig werden Farbmoleküle durch WPS wieder aus dem Gewebe verdrängt (SHOOBRIDGE 1983). Durch gleiche pH-Werte und Temperaturen in allen Farbbädern wird verhindert, daß aus einmal gefärbten Strukturen im weiteren Verlauf der Färbung Farbstoff wieder ausgewaschen wird (SHOOBRIDGE 1983).

Die Farbstoffe können simultan oder sukzedan nach aufsteigender Molekülgröße eingesetzt werden. Beim simultanen Färben können sich verschiedene Farbstoffe in den Gewebestrukturen teilweise mischen, beim sukzedanen wird diese Gefahr dadurch vermindert, daß die kleinemolekularen Farbstoffe die engmaschigen Texturen des Gewebsschnitts ausfüllen, bevor größermolekulare Farbstoffe hinzukommen. Es ergibt sich somit eine deutlichere Farbverteilung (SHOOBRIDGE 1983).

Auch das färberische Verhalten des Fibrins wird anscheinend vor allem durch physikalische Eigenschaften und weniger durch chemische Bindungsphänomene bestimmt (LENDRUM *et al.* 1962, SHOOBRIDGE 1983). So ist das Fibrin im frischgebildeten Zustand von sehr dichter Textur und kann somit nur saure Farbstoffe kleiner Molekülgröße halten. Durch Auflockerung im Rahmen eines Alterungsprozesses entwickelt es die Fähigkeit, auch größere saure Farbstoffmoleküle zu halten (LENDRUM *et al.* 1962). So erklärt sich die schwierige Abgrenzbarkeit alten Fibrins zu einigen großmolekulare Farbstoffe annehmenden Kollagentypen (LENDRUM *et al.* 1962, SHOOBRIDGE 1983), es ergibt sich aber bei sukzedaner Farbstoffanwendung die Möglichkeit, Fibrin unterschiedlichen Alters voneinander unterscheiden zu können (PUSEY und EDWARDS 1978, GARVEY *et al.* 1987, SHOOBRIDGE 1983).

### **2.4.3. Immunhistochemie**

#### *2.4.3.1. Mechanismus immunhistochemischer Darstellungsmethoden*

Ziel der immunhistochemischen Techniken ist der eindeutige Nachweis und die Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebsschnitten mittels spezifischer markierter Antikörper (DENK 1989). Hierzu stehen verschiedene Techniken zur Verfügung, bei denen zunächst ein Primärantikörper an das nachzuweisende Antigen bindet und dieser nachfolgend sichtbar gemacht wird (BOENISCH 1989b).

Besonders sensitiv sind die Enzym-Immunkomplexmethoden. Die hierbei eingesetzten Enzym-anti-Enzym-Immunkomplexe bestehen aus einem Antigen (Enzym) und dem dagegen gerichteten Antikörper und können durch eine Substratreaktion sichtbar gemacht werden. Die Verbindung zwischen dem Primärantikörper und dem Enzym-anti-Enzym-Immunkomplex erfolgt durch einen im Überschuß zugesetzten Sekundär- oder Brückenantikörper. So kann der Brückenantikörper gleichzeitig an den Primärantikörper und an den Antikörper des Enzym-anti-Enzym-Immunkomplexes binden. Voraussetzung ist, daß die beiden letztgenannten Antikörper aus derselben Spezies stammen und der Brückenantikörper gegen die Immunglobuline dieser Spezies gerichtet ist (BOENISCH 1989b).

#### *2.4.3.2. die APAAP-Methode*

Die 1984 von CORDELL *et al.* beschriebene alkalische Phosphatase / anti-alkalische Phosphatase (APAAP) Methode zählt zu den Enzym-Immunkomplexmethoden.

Hierbei bindet ein monoklonaler Primärantikörper aus der Maus an das nachzuweisende Antigen. Anschließend wird ein Brückenantikörper (aus dem Kaninchen, gegen die Maus gerichtet) zugesetzt, gefolgt vom APAAP-Enzym-Antienzym-Immunkomplex. Die letztgenannten beiden Schritte können zur Verstärkung des Effektes wiederholt werden. In den Verdünnungspuffern der Antikörper enthaltenes fetales Kälberserum minimiert die unspezifische Bindung der Anti-

körper an andere Strukturen des Gewebsschnittes. Die Sichtbarmachung des APAAP-Enzymkomplexes erfolgt durch Zugabe einer Substrat-Chromogen-Mischung (Naphtolphosphat-Ester und farbloses Diazoniumsalz). Es kommt zu einer Enzym-Substrat-Reaktion, deren Produkt sich mit dem Chromogen zu einem unlöslichen Azofarbstoff verbindet. Zur Blockade eventuell vorhandener endogener alkalischer Phosphatase wird Levamisol zugegeben (BOENISCH 1989a).

#### 2.4.3.3. *immunhistochemischer Nachweis zweier Antigene in einem Gewebsschnitt (Doppelmarkierung)*

Zur gleichzeitigen Darstellung zweier verschiedener Antigene kann die APAAP-Methode zweimal nacheinander am selben Gewebsschnitt durchgeführt werden, wofür zwei verschiedene Entwicklersubstrate für die beiden nachzuweisenden Antigene eingesetzt werden (CORDELL *et al.* 1984). Dieses Verfahren wird im folgenden als "Doppelmarkierung" bezeichnet.

#### 2.4.3.4. *Antigenmaskierung und -demaskierung*

Formalinfixierung und weitere Behandlungen von Gewebe, wie z.B. das Einbetten in Paraffin, können durch Vernetzung von Proteinen zu einer "Maskierung" von Antigenen im Präparat führen, welche dann im Präparat nicht mehr ohne weiteres immunhistochemisch nachgewiesen werden können. Die Protein-Sekundärstruktur des Antigens wird dabei aber nicht verändert, sondern im Gegenteil "eingeschlossen" und so vor Denaturierung geschützt (MASON und O'LEARY 1991).

Die Maskierung der Epitope kann bei einigen Antigenen durch proteolytische Verdauung (BROZMAN 1978) oder Hitzebehandlung im Mikrowellengerät (SHI *et al.* 1991) bzw. im Autoklaven (SHIN *et al.* 1991) rückgängig gemacht werden. Obwohl die meisten Antigene vor allem von einer Hitzebehandlung profitieren, muß für jedes Antigen die optimale Vorbehandlung einzeln ermittelt werden (PILERI *et al.* 1997). Auch Unterschiede in der Gewebefixation können zu unterschiedlichen Ergebnissen beim Einsatz desselben Antikörpers führen (SHOJI *et al.* 1998).

#### 2.4.3.5. *immunhistochemische Darstellung von Fibrin*

##### 2.4.3.5.1. *immunhistochemische Darstellung von Fibrin von Hunden*

Spezifische Antikörper gegen Fibrin von Hunden sind nicht im Handel erhältlich. Der einzige Hinweis über den Einsatz eines kommerziell erhältlichen Antikörpers gegen Fibrin von Menschen an Geweben von Hunden stammt von den Erkenntnissen der vorliegenden Untersuchung (GOLOMBIEWSKI *et al.* 1997).

Einige Antikörper gegen Fibrin von Menschen oder "*fibrin-related immunogenes*" sind aber bereits beim Hund eingesetzt worden, z.B. nach Radiomarkierung zum *in-vivo*-Nachweis von Thrombosierungen beim Hund (ROSEBROUGH *et al.* 1985), oder zum Nachweis von Fibrin in Gefrierschnitten dreier Tumoren von Hunden (ein benigner Mammatumor, ein Magen- und ein Bronchialkarzinom) mittels Immunfluoreszenz (MCEVOY *et al.* 1996, vgl. Kapitel 2.3.5.3.2., S. 14). EDGELL *et al.* (1996) stellten bei zwei von vier untersuchten gegen "*fibrin-related immunogenes*" von Menschen gerichtete Antikörpern eine starke Kreuzreaktion

mit Fibrin von Hunden fest. Untersuchungen über die Möglichkeit des Einsatzes solcher Antikörper an Paraffinschnitten von Geweben von Hunden fehlen.

#### 2.4.3.5.2. *immunhistochemische Darstellung von Fibrin von Menschen*

Die meisten Beschreibungen über den Nachweis von Fibrin in Geweben von Menschen basieren auf dem Einsatz von Antikörpern am Gefrierschnitt. Über Anwendung eines kommerziell erhältlichen Anti-Fibrin-Antikörpers\* an Schnitten von formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe berichten IDELL *et al.* (1995), die Neoplasien der Pleura von Menschen untersuchten (vgl. Kapitel 2.3.5.3.3., S. 14f). Dieser Antikörper ist vorwiegend gegen die  $\beta$ -Kette des Fibrins von Menschen gerichtet. Er reagiert deshalb nur mit Fibrin, nicht mit Fibrinogen, bei dem eine B $\beta$ -Kette vorliegt (vgl. Kapitel 2.2.1., S. 5).

#### 2.4.3.6. *immunhistochemische Darstellung von Gefäßen in Mammatumoren*

Der Nachweis von Gefäßen in Mammatumoren wird von den meisten Untersuchern mittels immunhistochemischer Endotheldarstellung vorgenommen. Beim Menschen werden hierzu meist Antikörper gegen F VIII rA (GUIDI *et al.* 1994, MARINHO *et al.* 1997) oder gegen den von-Willebrand-Faktor (CONTRINO *et al.* 1996) eingesetzt. Der von-Willebrand-Faktor spielt eine Rolle bei der Plättchenaggregation. Er wird in Endothelzellen synthetisiert und von diesen nach abluminal abgegeben, wo er in Form unlöslicher Aggregate verbleibt (WU *et al.* 1996). Auch zur Darstellung von Gefäßen in Mammatumoren von Hunden erwies sich ein Antikörper gegen von-Willebrand-Faktor als geeignet (GUTBERLET 1994).

---

\* Antikörper no. 350; American diagnostica, Greenwich, CT, USA; im folgenden AK no.350 genannt.