

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. MATERIAL UND METHODEN

3.1.1. Untersuchte Gewebe

Zur Untersuchung gelangen die Operationspräparate aus Total- oder Teilmammektomien von 84 Hunden, welche aufgrund von Mammaveränderungen im Zeitraum von Ende Februar 1995 bis Ende April 1996 in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin (82 Tiere) bzw. einer privaten Praxis bei Berlin (2 Tiere) operiert wurden. Bei weiteren Eingriffen bei diesen Tieren (aufgrund von Rezidiven oder Tumoren in noch verbliebenen Gesäugekomplexen oder der anderen Milchleiste) werden die entsprechenden Operationspräparate ebenfalls in die Studie einbezogen. Gesäugegewebe von oben genannten Tieren, das bereits vor Februar 1995 entnommen wurde, wird auch untersucht, soweit das Material im Archiv des Instituts für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin (im folgenden "Archiv" genannt) vorhanden ist. Von 27 Tieren liegt Gewebe aus mehreren Operationen und von 57 Tieren von einer Operation vor. Von 76 Tieren ist ausserdem mindestens ein Inguinallymphknoten im Untersuchungsmaterial vorhanden. Die Mammarkomplexe werden in dieser Arbeit wie folgt bezeichnet: T1: thorakal cranialer, T2: thorakal caudaler, A1: abdominal cranialer, A2: abdominal caudaler, I: inguinaler Komplex. Bei Material von Tieren mit nur vier Komplexen bezeichnet T den cranialsten Komplex, A1, A2 und I in dieser Reihenfolge die nach caudal folgenden. Als zu einem bestimmten Komplex gehörig werden auch die Tumoren gezählt, die sich im Gewebe caudal dieses Komplexes bis einschließlich der Hälfte der Strecke zum folgenden Komplex befinden.

Als Testgewebe für die Vorversuche zur histologischen und immunhistochemischen Fibrindarstellung sowie als Positivkontrolle in den Hauptversuchen dient ein Stück einer Arterie eines Hundes mit luminaler Thrombose und Fibrinablagerungen in der Tunica media (Archivmaterial), als Testgewebe für die Vorversuche zur histologischen Fibrindarstellung zusätzlich ein Gewebestück der rupturierten Leber eines Hundes (Archivmaterial). Für die Vorversuche zur immunhistochemischen Fibrindarstellung wird außerdem ein formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Blutkoagulum vom Menschen eingesetzt. Als Testgewebe für die Vorversuche zur Gefäßdarstellung wird Haut-, Leber-, Lungen- und Lymphknotengewebe von Hunden verwendet, für die Vorversuche zur Doppelmarkierung ein stark fibrinpositiver Mammatumor eines Hundes.

3.1.2. Nationale

Anhand der Vorberichte zu den eingesandten Gewebeproben werden die Daten zu Alters-, Rasse- und Geschlechtsverteilung der Hunde erhoben.

3.1.3. Verlauf

Die Tiere werden in ungefähr halbjährlichen Abständen auf das Vorhandensein von weiteren Mammatumoren, Rezidiven und Metastasen untersucht, zumindest wird der Zustand des Tieres telefonisch erfragt. Die Überwachungszeit errechnet sich vom Zeitpunkt der ersten Entnahme

von Mammagewebe bis zum letztmaligen Kontakt mit dem Patienten bzw. dessen Besitzer. Sollte das Tier nicht mehr am Leben sein, wird versucht, die Ursache für den Tod bzw. die Tötung festzustellen. Die Überlebenszeit errechnet sich ebenfalls ab dem Zeitpunkt der ersten Entnahme von Mammagewebe.

3.1.4. Gewebepbearbeitung

Das exzidierte Gesäugegewebe wird unmittelbar bis einige Stunden nach der Entnahme für rund 24 Stunden in 4%igem Formalin fixiert. Anschließend werden folgende Teile des Gewebes in Form von ca. 0,5 cm dicken Scheiben in Paraffin eingebettet: Querschnitte aller tastbaren Veränderungen im Gesäugegewebe (in den meisten Fällen mit einem Anteil makroskopisch unverändert erscheinenden Umgebungsgewebes), Querschnitte über die gesamte Breite des eingesandten Gewebes auf Höhe jeder vorhandenen Zitze sowie mindestens ein Querschnitt jeden vorhandenen Lymphknotens. Das Blutkoagulum vom Menschen und das Testgewebe für die Gefäßdarstellung werden ebenso fixiert und eingebettet.

Die Lage, die Dimensionen und eventuelle Ulzerationen der tastbaren Veränderungen werden notiert. Ist die Größe in der Makroskopie nicht beschrieben, so wird der größte im H.E.-Schnitt gemessene Durchmesser gewertet. Hierzu wird, wie auch bei allen folgenden beschriebenen Längenmessungen am Schnitt, ein ins Mikroskop einzusetzendes Okular mit Raster verwendet.

Veränderungen, die sich aufgrund ihrer Härte nicht mit einem Skalpell zerteilen lassen, werden vor der Bearbeitung für die Paraffineinbettung gemäß ROMEIS (1968) elektrolytisch entkalkt.

Die Gewebepben aus dem Archiv sind bereits formalinfixiert und in Paraffin eingebettet.

3.1.5. Anfertigung und Behandlung von Schnittpräparaten

Von allen Gewebepben wird zunächst je ein Schnitt von 4-6 µm Dicke angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen und routinemäßig gemäß den Anweisungen von BÖCK (1989) H.E. gefärbt.

Von den Gewebepben, die im H.E.-Schnitt Tumoren aufweisen, werden weitere Schnitte von 4-6 µm Dicke angefertigt, auf Silane-beschichtete Objektträger (vgl. Kapitel 8.2., S. 127ff) aufgezogen und bei 37° Celsius im Brutschrank ungefähr 24 Stunden getrocknet. Mit einigen Proben von unverändertem, hyperplastischem oder mit frühen Karzinomstadien durchsetztem Gesäugegewebe sowie einigen Lymphknoten mit oder ohne Metastasen wird ebenso verfahren. Je ein Exemplar dieser Schnitte wird einem immunhistochemischen Fibrinnachweis unterzogen. In Parallelschnitten zu den fibrinpositiven Tumorschnitten erfolgt immunhistochemisch die gleichzeitige Darstellung von Fibrin und Gefäßen. Ein zweiter Satz Parallelschnitte wird mit einer histologischen Technik zur Fibrindarstellung gefärbt. Die Beschreibungen der Färbungen finden sich in Kapitel 3.2.5., S. 44ff.

Von den Testgeweben werden ebenfalls Schnitte von 4-6 µm Dicke angefertigt, auf Silane-beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 37° Celsius im Brutschrank ungefähr 24 Stunden getrocknet.

Die für einige Färbungen benötigten Lösungen Eisenhämatoxylin nach Weigert, Hämatoxylin nach Mayer und Methylgrün (im folgenden als EH bzw. HT bzw. MG bezeichnet) werden gemäß den Anweisungen von BÖCK (1989) hergestellt.

Die erhobenen Daten zu den Tieren und deren Geweben werden mit Hilfe des Computerprogramms FileMaker Pro 3.0 bearbeitet. Zusammenfassende Tabellen finden sich in den Kapiteln 8.3. und 8.4. (S. 130ff bzw. S. 134ff).

3.1.6. Vorversuche zu histologischen Färbetechniken zur Darstellung von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen

3.1.6.1. Einleitung

In den Vorversuchen soll geprüft werden, inwieweit unterschiedliche histologische Färbetechniken geeignet sind, Thrombosierungen und extravasales Fibrin darzustellen. Hierzu werden verschiedene Techniken, die auf unterschiedlichen Farbstoffen und/oder unterschiedlicher Reihenfolge und/oder Zeitdauer des Einsatzes dieser Farbstoffe beruhen, an Schnitten des oben beschriebenen Testgewebes angewendet. Teilweise werden Einwirkzeiten und Farblösungen variiert, um die Färbungen zu optimieren. Soweit nicht anders angegeben, erfolgen die Färbungen bei Raumtemperatur.

3.1.6.2. Bindegewebsfärbung nach LADEWIG (1938)

1. Entparaffinieren: Xylol und absteigende Alkoholreihe
2. Kernfärbung:
 - 5 min EH
 - Spülen in aqua dest.
 - kurzes Differenzieren in HCl-Alkohol
 - kurzes Wässern in Leitungswasser
3. Bindegewebs- und Fibrinfärbung:
 - 3 min 5%ige WPS
 - Spülen in aqua dest.
 - 5 min Ladewig-Farblösung
 - kurzes Spülen in Leitungswasser
 - 1 min Spülen in 96%igem Alkohol (bei leichter Bewegung der Schnitte)
 - kurzes Spülen in absolutem Alkohol
4. Eindecken: über Xylol

3.1.6.3. Picro-Polychromtechnik nach SHOOBRIDGE (1983)

1. Entparaffinieren: Xylol und absteigende Alkoholreihe
2. Vorbehandlung zur Kern-, Bindegewebs- und Fibrinfärbung:
 - 5 bis 10 min Eisenalaun-Lösung
 - 1 min Spülen in fließendem Leitungswasser
 - 1 min Spülen in aqua dest.
3. Kernfärbung:
 - 5 bis 10 min HT
 - 1 min Spülen in fließendem Leitungswasser
 - 15 bis 30 sec Spülen in Säurealkohol
 - 10 bis 15 min Spülen in fließendem Leitungswasser
 - Spülen in aqua dest (50°C)
4. Vorbehandlung zur Bindegewebs- und Fibrinfärbung:
 - 30 min Picro-Formol-Primer (50°C)
 - 5 min Spülen in fließendem Leitungswasser
5. Bindegewebs- und Fibrinfärbung (bei höchstens 20°C):
 - 5 min Färben in WPS-Orange G
 - je 10 Dips in 3 x aqua dest.
 - 5 min Färben in WPS-Säurefuchsin
 - je 10 Dips in 3 x aqua dest.
 - 5 min Färben in WPS-Anilinblau
 - je 10 Dips in 3 x aqua dest.
 - 3 x Spülen in absolutem Alkohol
6. Eindecken: über Xylol

Modifikationen ausser den im Text angegebenen zu variierenden Einwirkzeiten der Eisenalaunlösung und des HT sowie der anschließenden Spülzeiten:

- Der Picro-Formol-Primer wird durch gesättigte wässrige Pikrinsäure (bei 50°C und Raumtemperatur) ersetzt.
- Die Einstellzeit in den Primer wird verkürzt, die anschließende Spülzeit verlängert (15 min Primer und 15 min Spülen, 5 min Primer und 10 min Spülen).
- Spülzeit nach Anwendung des Primers wird auf 10 min verlängert.
- Der Primer wird weggelassen.
- Das Wolframotophosphorsäure-Säurefuchsin wird durch die Biebricher Scharlach/Säurefuchsin/Xylidinponceau-Lösung nach GARVEY *et al.* (1987) ersetzt.

3.1.6.4. kombinierte Elastika-, Fibrin- und Kollagenfärbung nach GARVEY *et al.* (1987)

1. Entparaffinieren: Xylol und absteigende Alkoholreihe
2. Vorbehandlung:
 - 60 min alkoholische Pikrinssäure-Quecksilberchloridlösung
 - Sorgfältiges Spülen in warmem Leitungswasser
3. Kernfärbung:
 - 9 min modifizierte Verhoeff-Farblösung
 - 5 min Spülen in warmem Leitungswasser
4. Bindegewebs- und Fibrinfärbung:
 - 2 min Säuregelb 17-Lösung
 - Spülen in 0,5%iger Essigsäure
 - 5 min Biebricher Scharlach/Säurefuchsin/Xylidinponceau-Lösung
 - Spülen in aqua dest.
 - 10 min 2%ige WPS
 - Spülen in aqua dest.
 - 2 min Anilinblau-Lösung
 - Spülen in 0,5%iger Essigsäure
5. Eindecken: über Xylol

Modifikationen:

- Die Färbung erfolgt ohne Vorbehandlung.
- Die Kernfärbung mit modifizierter Verhoeff-Farblösung wird auf 6 min verkürzt.

3.1.6.5. Martius Yellow - Scarlet Red - Anilin Blue (MSB) - Technik nach LENDRUM *et al.* (1962), modifiziert nach PUSEY und EDWARDS (1978)

1. Entparaffinieren: Xylol und absteigende Alkoholreihe
2. Vorbehandlung:
 - 1 h gesättigte Quecksilberchloridlösung (60°C)
 - Spülen in heißem Leitungswasser
3. Kernfärbung:
 - 5 min Cölestinblau-Lösung
 - Spülen in Leitungswasser
 - 5 min HT
 - Spülen in aqua dest.
 - Differenzieren in Säurealkohol
 - Spülen in Leitungswasser
 - Spülen in 95%igem Alkohol
4. Bindegewebs- und Fibrinfärbung:
 - 2 min Naphtolgelb-Lösung
 - Spülen in 95%igem Alkohol
 - Spülen in Leitungswasser
 - 10 min Kristallponceau 6R
 - Spülen in aqua dest.
 - 5 min 1%ige WPS
 - Spülen in Leitungswasser
 - 5 min Anilinblau-Lösung
 - kurz Spülen in aqua dest.
 - kurz Spülen in absolutem Alkohol
5. Eindecken: über Xylol

3.1.6.6. Methode zur Auswertung der Vorversuche zu den histologischen Färbetechniken

Die Ergebnisse der verschiedenen Färbungen und ihrer Modifikationen werden verglichen bezüglich Deutlichkeit der Darstellung von Fibrin allgemein, Unterscheidbarkeit von Fibrin verschiedenen Alters und Darstellung umgebender Gewebestrukturen.

3.1.7. Vorversuche zur Immunhistochemie

3.1.7.1. Einleitung

Alle Versuche zur Immunhistochemie werden bei Raumtemperatur mit der APAAP-Methode nach CORDELL *et al.* (1984) mit den von WALTER (1999) mitgeteilten Modifikationen vorgenommen. Zur Ermittlung der jeweils optimalen Methode zur Darstellung des zu bestimmenden Antigens werden in den Vorversuchen die Antikörperverdünnung und die Vorbehandlung modifiziert. Untersucht werden jeweils ein Schnitt des oben beschriebenen Testgewebes und eine Negativkontrolle, in der der Primärantikörper durch inaktiviertes Normalserum der Tierart ersetzt ist, aus welcher der Antikörper gewonnen wurde. Auch ein Schnitt der oben beschriebenen Positivkontrolle wird mitgeführt.

Die Deckgläser der frisch eingedeckten Schnitte werden größtenteils für einige Stunden mit Bleiklötzchen beschwert und anschließend mit handelsüblichem farblosem Nagellack umrahmt.

3.1.7.2. Allgemeines Schema für die Durchführung der APAAP-Methode

1. Entparaffinieren:
 - 20 min Xylol
 - 15 min Aceton
 - 15 min Aceton/TBS 1:1
2. 2 x 10 min Spülen in TBS
3. nur bei Antigenen, die maskiert vorliegen: Vorbehandlung je nach Antigen und Antikörper. Sonst nach Schritt 2 weiter mit Schritt 4.
4. 30 min verdünnter Primärantikörper
5. nur bei Antikörpern, die nicht aus der Maus stammen: 30 min verdünnter Antikörper zur Mausifikation. Sonst nach Schritt 4 direkt weiter mit Schritt 6.
6. 30 min verdünnter Brückenantikörper
7. 30 min verdünnter APAAP-Komplex
8. 15 min verdünnter Brückenantikörper
9. 15 min verdünnter APAAP-Komplex
10. 30 min Entwickeln
11. 2x5 min Spülen in TBS
12. Gegenfärben:
 - 1 min Hämalaun konzentriert
 - 1 min Bläuen in Wasser
13. Eindecken in Kaisers Glyceringelatine und Trocknen

Für die Schritte 4-9 werden die Schnitte auf Coverplates[®] aufgezogen und in die Sequenza[®]-Färbestation eingesetzt. Nach den Schritten 3-9 erfolgt jeweils eine fünfminütige Spülung der Schnitte mit TBS.

3.1.7.3. Immunhistochemische Darstellung von Fibrin (Fibrin-Einfachmarkierung)

Es soll ein Antikörper ermittelt werden, der mit Fibrin von Hunden im formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebsschnitt reagiert. Hierzu wird der in Kapitel 2.4.3.5.2., S. 22 vorgestellte AK no.350 in verschiedenen Verdünnungen zwischen 1:20 und 1:200 an Schnitten des oben beschriebenen Testgewebes in der APAAP-Methode eingesetzt. Als Positivkontrolle dienen Schnitte des Blutkoagulums vom Menschen.

Das Gewebe wird verschiedenen Vorbehandlungen zur Antigendemaskierung ausgesetzt:

- ohne Vorbehandlung,
- 10 min 0,1%ige Protease (37°C),
- 2 x 5 min Mikrowellengerät bei 600 W,
- 3 x 5 min Mikrowellengerät bei 600 W,
- 20 min Autoklav bei 1 bar.

Für die Mikrowellengerät- und die Autoklavbehandlung werden jeweils fünf Schnitte in eine Sigma-Kunststoffküvette mit Citrat-Puffer (pH 6,0) und einigen Siedesteinchen eingestellt. Bei der Mikrowellenbehandlung wird verdampfter Puffer nach jeweils 5 min aufgefüllt. Nach den Methoden mit Hitzebehandlung werden die Schnitte für 20-30 min zur Abkühlung in den Kunststoffküvetten belassen.

Als Chromogen in der Entwicklerlösung dient Fast Red TR Salz.

Die Gegenfärbung erfolgt mit HT, das in verschiedenen Einwirkzeiten getestet wird, und anschließendem Bläuen in fließendem Leitungswasser.

3.1.7.4. Immunhistochemische Darstellung von Gefäßen

Zur Darstellung der Gefäßendothelien mit der APAAP-Methode wird der in Kapitel 2.4.3.6. (S. 22) erwähnte gegen den von-Willebrand-Faktor gerichtete Antikörper (im folgenden AK vWF genannt) in der Verdünnung 1:400 eingesetzt. Dieser ist zur Darstellung von Blut- bzw. Blut- und Lymphgefäßen (nach zweiminütiger bzw. zehnminütiger Vorbehandlung des Gewebes in 0,1%iger Protease bei 37°C) in Mammatumoren von Hunden geeignet (GUTBERLET 1994). An je einem Schnitt des Testgewebes wird nach einer dieser Vorbehandlungen die genannte Gefäßdarstellung vorgenommen, bei einem weiteren nach Vorbehandlung im Mikrowellengerät für 2 x 5 min bei 600 W.

Als Chromogen in der Entwicklerlösung dient Fast Red TR Salz.

3.1.7.5. Gleichzeitige immunhistochemische Darstellung von Fibrin und Gefäßen (Doppelmarkierung)

Bei der Doppelmarkierung werden die Schritte 4-11 des allgemeinen Schemas für die Durchführung der APAAP-Methode (vgl. Kapitel 3.1.7.2., S. 29) mit einem anderen verdünnten Primärantikörper und einem anderen Chromogen zur Entwicklung wiederholt. Bei einer Doppelmarkierung kann nur eine Vorbehandlungsmethode eingesetzt werden.

Ziel der Doppelmarkierung ist hier die Darstellung von Fibrin und Gefäßen in einem Schnitt. Hierzu werden als Primärantikörper AK no.350 und AK vWF eingesetzt. Sowohl die Abfolge der beiden Primärantikörper als auch die der Chromogene der Entwicklerlösungen (Fast Red TR Salz und Fast Blue BB Salz) wird variiert. Als Gegenfärbung werden verschiedene Kernfärbungen getestet: 10 min MG, 40 sec HT mit anschließendem Bläuen, EH in verschiedenen Einwirkzeiten und mit unterschiedlicher nachfolgender Differenzierungszeit in HCl-Alkohol.

3.1.7.6. Methode zur Auswertung der Vorversuche zur Immunhistochemie

Die Schnitte der verschiedenen Modifikationen der Fibrin-Einfachmarkierung werden untersucht und verglichen bezüglich Intensität der Anfärbung des Antigens, Spezifität der Darstellung (Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen als dem gewünschten Antigen und Vergleich mit den Ergebnissen aus der histologischen Fibrindarstellung), Hintergrund (unspezifische allgemeine Anfärbung von Gewebe) und Gewebeerhalt.

Durch den Vergleich der Schnitte der Einfachmarkierung zur Gefäßdarstellung wird ermittelt, ob eine Vorbehandlung im Mikrowellengerät zu den gleichen Ergebnissen führt wie eine Vorbehandlung mit Protease.

Bei den Schnitten der Doppelmarkierung werden die Auswirkungen der verschiedenen Abfolgen der beiden Primärantikörper und der Chromogene der Entwicklerlösungen sowie der verschiedenen Arten der Gegenfärbung verglichen.

3.1.8. Rezepte der Lösungen für die immunhistochemischen Verfahren und histologischen Färbungen sowie Verzeichnis der verwendeten Geräte und Reagenzien

In Kapitel 8.2., S. 127ff finden sich die Rezepte der Lösungen für die immunhistochemischen Verfahren und histologischen Färbungen sowie in Kapitel 8.5., S. 145, ein Verzeichnis der verwendeten Geräte und Reagenzien.

3.1.9. Hauptversuche

Für die Hauptversuche werden die in Kapitel 3.1.6 und 3.1.7, S. 25ff und 29ff aufgeführten Färbeanleitungen entsprechend den Ergebnissen der Vorversuche modifiziert. Diese modifizierten Arbeitsabläufe sind in Kapitel 3.2.5. (S. 44ff) beschrieben.

3.1.10. Untersuchung der H.E.-Schnitte

3.1.10.1. Untersuchung auf Veränderungen, Diagnosen

Schnitte von Mammagewebe werden lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein und die Art von Veränderungen untersucht.

Zunächst wird vermerkt, ob es sich um unverändertes, nicht neoplastisch verändertes oder neoplastisch verändertes Gewebe handelt. Als Mammatumoren im engeren Sinne (i.e.S.) gelten dabei die Neoplasien, die eindeutig aus Drüsenzellen oder Myoepithel der Mamma hervorgehen, die übrigen werden als Mammatumoren im weiteren Sinne (i.w.S.) bezeichnet, da sie zwar im Mammagewebe liegen, aber nicht oder nicht eindeutig aus diesem Parenchym hervorgegangen sind.

Die Klassifikation von verändertem Gewebe erfolgt in Anlehnung an die WHO-Klassifikation (HAMPE und MISDORP 1974) und die Arbeit von GUTBERLET (1994).

In der vorliegenden Studie wurden folgende Arten von Veränderungen diagnostiziert:

nichtneoplastische Veränderungen:

Hyperplasie, Fibrose, Zyste, Narbe, Entzündungen;

neoplastische Veränderungen:

Mammatumoren i.w.S.:

- benigne: Osteofibrom;
- semimaligne: Basalzellentumor;
- maligne: gering differenziertes solides Karzinom, Plattenepithelkarzinom, Lymphosarkom, Fibrosarkom;

Mammatumoren i.e.S.:

- benigne: Adenom, Adenom mit Myoepithelhyperplasie, Myoepitheliom
- maligne: frühe Karzinomstadien (*Carcinoma in situ*), Adenokarzinom, Adenokarzinom mit Myoepithelhyperplasie, solides Karzinom, solides Karzinom mit Myoepithelhyperplasie, anaplastisches Karzinom, scirrhöses Karzinom, Myoepithelkarzinom, komplexes Karzinom, Karzinosarkom.

Der Zusatz "mit Myoepithelhyperplasie" beschreibt eine nichtmaligne Proliferation des Myoepithels, welche gleichzeitig mit der Drüsenepithelneoplasie auftritt. Im komplexen Karzinom sind sowohl der drüsige als auch der myoepitheliale Anteil des Gewebes maligne entartet. Als Karzinosarkome werden Tumoren bezeichnet, in denen zusätzlich zur malignen Drüsenepithelneoplasie ein maligner mesenchymaler Anteil auftritt.

Die Schnitte der Lymphknoten werden auf das Vorhandensein von Tumorzellemboli oder Metastasen untersucht. Liegen von einer Milchleiste mehrere Inguinallymphknoten vor, so wird als Lymphknotenstatus für diese Leiste der Status des Lymphknotens mit dem erfahrungsgemäß prognostisch schlechtesten Zustand vermerkt.

3.1.10.2. Wertungspunkte

Um den Grad der Malignität der bösartigen Mammatumoren i.e.S. darzustellen, erhalten diese Wertungspunkte nach dem von GUTBERLET (1994) erarbeiteten Schema.

3.1.10.3. Nekrose

Alle Neoplasien werden nach Vorkommen und Menge von Nekrosen im Tumor semiquantitativ in vier Gruppen eingeteilt. Hierzu wird die geschätzte Größe der Nekroseareale in Beziehung zur geschätzten gesamten Tumorfläche bewertet. Gewebefreie Gebiete wie Zysten Hohlräume werden nicht mitbewertet. Eine ähnliche Einteilung verwenden auch andere Autoren (z.B. PARHAM *et al.* 1992 für Mammatumoren vom Menschen), ohne dabei jedoch das Verhältnis von Tumorfläche und Nekrosefläche zu berücksichtigen.

Nekrosegruppe 0: keine Nekrose.

Nekrosegruppe 1: geringgradige Nekrose: höchstens eine kleine Gruppe nekrotischer Zellen im Tumor.

Nekrosegruppe 2: mäßige Nekrose: nekrotische Zellcluster über den Tumor verteilt oder Feld/er von Nekrose, die insgesamt weniger als ein Zehntel der gesamten Tumorfläche ausmachen.

Nekrosegruppe 3: massive Nekrose: Feld/er von Nekrose ohne erhaltene Zellstrukturen, die insgesamt mindestens ein Zehntel der gesamten Tumorfläche ausmachen.

3.1.10.4. Blutung

Alle Neoplasien werden nach Vorkommen und Menge von Blutungen im Tumor in vier Gruppen eingeteilt.

Blutungsgruppe 0: keine Blutung.

Blutungsgruppe 1: geringgradige Blutung: einzelne oder kleine Gruppen von Erythrozyten an einer oder mehreren Stellen des Tumors, oder eine größere Erythrozytengruppe an einer Stelle des Tumors.

Blutungsgruppe 2: mäßige Blutung: größere Gruppen von Erythrozyten an mehreren Stellen des Tumors.

Blutungsgruppe 3: massive Blutung: große Gruppen von Erythrozyten an verschiedenen Stellen des Tumors, schon in Lupenvergrößerung (40fach) auffällig.

3.1.10.5. eitrige Entzündung

Eine eitrige Entzündung liegt für die Auswertung erst dann vor, wenn sich im Gewebsschnitt des Tumors viele neutrophile Granulozyten als große Gruppe/n oder als viele kleine, über den Tumor verteilte Gruppen befinden.

3.1.10.6. Angiosis carcinomatosa

Es wird festgestellt, ob *Angiosis carcinomatosa* oder der Verdacht hierauf vorliegt.

3.1.11. Untersuchung der Schnitte der Spezialdarstellungen

3.1.11.1. Fläche des ausgewerteten Tumorgewebes

Um einen Eindruck von der Fläche des ausgewerteten Gewebes der Tumoren zu erhalten, werden die maximale Breite und Höhe desselben in mm gemessen und die Tumoren nach dem Produkt dieser Zahlen in fünf Flächengruppen eingeteilt.

Flächengruppe 1: maximale Breite mal maximale Höhe < 3.

Flächengruppe 2: maximale Breite mal maximale Höhe > 3 -16.

Flächengruppe 3: maximale Breite mal maximale Höhe >16 - 64.

Flächengruppe 4: maximale Breite mal maximale Höhe >64 -196.

Flächengruppe 5: maximale Breite mal maximale Höhe > 196.

3.1.11.2. Vorhandensein einer Kapsel

Es wird festgestellt, ob der Tumor eine im Schnitt erhaltene und auswertbare Kapsel hat.

3.1.11.3. Vorhandensein von Fibrin

Untersucht wird hierzu zunächst der Schnitt der Fibrin-Einfachmarkierung. Es wird festgestellt, ob intra- oder extravasal gelegenes Fibrin nachzuweisen ist. Im positiven Falle wird die genaue Lage bestimmt: liegt es im Tumor oder im nichtneoplastischen Gewebe? Bei Lage im Tumor: liegt es in der Kapsel, im übrigen Stroma oder an / in einer Nekrose? Befindet es sich in Kontakt zu einer Blutung? Areale, welche unmittelbar an ulzerierte Stellen grenzen, werden nicht bewertet.

3.1.11.4. Thrombosierungen in Tumoren

Der Schnitt der Fibrin-Einfachmarkierung wird auf thrombosierte Gefäße untersucht. Gefäße in Arealen, welche unmittelbar an ulzerierte Stellen grenzen, werden nicht bewertet. Das Gefäßlumen braucht nicht vollständig von Fibrin ausgefüllt zu sein. Um postoperativ gebildetes Fibrin auszuschließen, muß das Fibrin dabei entweder wandständig oder in der Shoobridge-Färbung als älteres Fibrin zu identifizieren sein. Ist die Lage des Fibrins in Bezug auf ein Gefäßlumen nicht eindeutig zu erkennen, so wird die entsprechende Stelle im doppelmarkierten Parallelschnitt aufgesucht und beurteilt.

Nach der Zahl der Thrombosierungen erfolgt eine Einteilung in vier Thrombosierungsgruppen (thr 0 bis thr 3+) Für die Einteilung der Tumoren in die Thrombosierungsgruppen 2+ und 3+ wird die Zahl der Thrombosierungen in Beziehung zur Größe der ausgewerteten Tumorfläche gesetzt.

- thr 0: keine Thrombosierungen.
- thr 1+: ein einzelnes thrombosiertes Gefäß im Tumor.
- thr 2+: bis zwei thrombosierte Gefäße in Flächengruppe 1.
bis drei thrombosierte Gefäße in Flächengruppe 2.
bis sechs thrombosierte Gefäße in Flächengruppe 3.
bis zehn thrombosierte Gefäße in Flächengruppe 4.
bis 20 thrombosierte Gefäße in Flächengruppe 5.
- thr 3+: ab drei thrombosierte Gefäße in Flächengruppe 1.
ab vier thrombosierte Gefäße in Flächengruppe 2.
ab sieben thrombosierte Gefäße in Flächengruppe 3.
ab elf thrombosierte Gefäße in Flächengruppe 4.
ab 21 thrombosierte Gefäße in Flächengruppe 5.

Neben der genauen Lage des betroffenen Gefäßes wird auch dessen Typ bzw. Größe vermerkt. Als Kapillaren gelten alle Gefäße ungeachtet ihres Durchmessers, die lediglich aus einer Schicht Endothel bestehen, als mittlere Gefäße alle jene mit mehrschichtiger Wand und einem Durchmesser unter 50 µm, die mit einem größeren Durchmesser gelten als große Gefäße. In der Literatur ist beschrieben, daß ab 50 µm Durchmesser Arteriolen eine *Lamina elastica* aufweisen, Venolen eine *Lamina muscularis* (KRSTIC 1984).

3.1.11.5. extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren

Areale positiver Fibrindarstellung in der Fibrin-Einfachmarkierung gelten in der vorliegenden Arbeit als extravasale Fibrinablagerungen, wenn sie sich außerhalb von Gefäßen befinden, jedoch nicht in Zysten, Alveolen o.ä. liegen. Auch hier erfolgt wieder eine Einteilung in vier Gruppen (evf 0 bis evf 3+)

- evf 0: keine extravasalen Fibrinablagerungen
- evf 1+: bis insgesamt 1500 µm² extravasale Fibrinablagerungen
- evf 2+: über insgesamt 1500 µm² extravasale Fibrinablagerungen, die aber in der Lupenvergrößerung (40fach) nicht sehr auffällig erscheinen
- evf 3+: schon in der Lupenvergrößerung (40fach) auffällige Fibrinablagerungen, die große Teile des Tumors einnehmen oder sich an vielen Stellen finden.

3.1.11.6. fibrinpositive Makrophagen

Finden sich im Tumor Gruppen von Makrophagen mit positiver Fibrindarstellung, so wird dies vermerkt.

3.1.11.7. Gefäßdichte

Bei den Tumoren, von denen eine Endothelzellendarstellung durch AK vWF vorliegt, wird die Gefäßdichte im Tumor geschätzt. Als Gefäß gelten alle vWF-positiven Zellen oder Zellaggregate, die von anderen abgesetzt liegen, die Erkennbarkeit eines Gefäßlumens ist nicht nötig (GUIDI *et al.* 1994, WEIDNER *et al.* 1991). Lumina ohne Kontakt zu positiven Zellen gelten als Artefakte (WEIDNER *et al.* 1991, OBERMAIR *et al.* 1995). Der gesamte Tumor wird bei mittlerer Vergrößerung (100fach) betrachtet und nach der Gefäßdichte semiquantitativ in eine von vier Gruppen eingeteilt. Bei ungleichmäßiger Vaskularisierung wird der Durchschnittseindruck bewertet; man erhält so einen Eindruck von der Vaskularisierung des Tumors und vermeidet eine reine Bewertung des *hot spots*, wie sie zur Bewertung des Grades der Neovaskularisierung eingesetzt wird (GUIDI *et al.* 1994).

Gefäßdichtegruppe 0: nicht vaskularisiert (keine Gefäße im Tumor)

Gefäßdichtegruppe 1: gering vaskularisiert

Gefäßdichtegruppe 2: mäßig vaskularisiert

Gefäßdichtegruppe 3: stark vaskularisiert

Bei jeweils fünf Vertretern der Gruppen 1, 2 und 3 werden bei starker Vergrößerung (400fach) die Gefäße im Tumor ausgezählt. Anschließend wird die Tumorfläche vermessen und die Zahl der Gefäße pro mm² berechnet.

3.1.12. Zusammenhänge zwischen Merkmalen / statistische Tests

Je zwei Merkmale der Mammatumoren i.e.S. werden zueinander in Beziehung gesetzt. Diese sind für die Einzeltumoren: Thrombosierungsgruppe / evf-Gruppe; Thrombosierungsgruppe bzw. evf-Gruppe / Geschlecht des Tieres, Alter des Tieres, Lage des Tumors, Tumorgroße, Ulkus, eitrige Entzündung, fibrinpositive Makrophagen, Nekrosegruppe, Blutungsgruppe, *Angiosis carcinomatosa*, Gefäßdichtegruppe, Klassifikation, Wertungspunkte, Lymphknotenstatus bzw. Krankheitsverlauf; Gefäßdichtegruppe / Nekrosegruppe. Außerdem werden für den Tumor mit der höchsten Punktwertung und den Tumor der höchsten evf- bzw. Thrombosierungsgruppe jeder Mammaleiste die Merkmalspaare Thrombosierungsgruppe bzw. evf-Gruppe/ Lymphknotenstatus gebildet und für den Tumor mit der höchsten Punktwertung und den Tumor der höchsten evf- bzw. Thrombosierungsgruppe jeden Tieres das Merkmalspaar Thrombosierungsgruppe bzw. evf-Gruppe / Schicksal des Tieres.

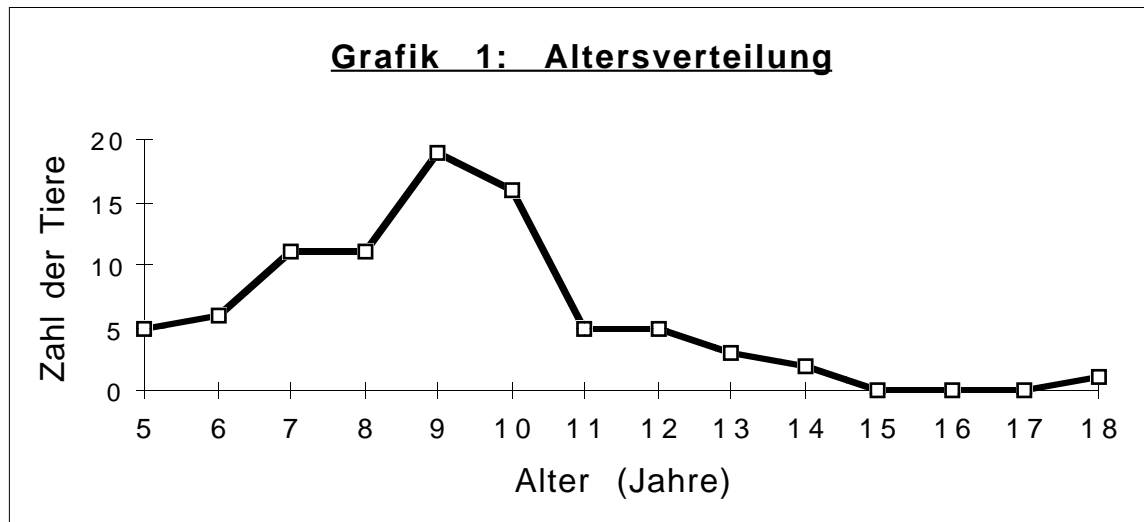
Zur Feststellung, ob zwischen den beiden Merkmalen der Merkmalspaare Thrombosierungsgruppe bzw. evf-Gruppe / Wertungspunkte bzw. Alter des Tieres bzw. Tumorgröße und Tumorgröße / Nekrosegruppe ein Zusammenhang nachweisbar ist, wird der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Anschließend folgen gegebenenfalls paarweise Vergleiche mit dem Mann-Whitney-Test mit α -Adjustierung nach Bonferroni, wie von SACHS (1992) beschrieben. Für die übrigen Merkmalspaare wird der bei SACHS (1992) beschriebene χ^2 - Test nach Pearson durchgeführt. Zur Feststellung, an welcher Stelle ein gegebenenfalls vermuteter statistischer Zusammenhang besteht, werden gemäß der Empfehlung von BÜHL und ZÖFEL (1998) die Standardresiduen betrachtet. Die Testergebnisse werden im Sinne der explorativen Statistik interpretiert. Die Tests werden mit Hilfe des Computerprogramms SPSS Version 8 durchgeführt.

Der Fehler erster Art wird mit $\alpha = 5\%$ festgesetzt ($p < 0,05$).

3.2. ERGEBNISSE

3.2.1. Alters-, Rassen- und Geschlechtsverteilung

Das Alter der untersuchten Tiere zum Zeitpunkt der ersten Entnahme von Mammagewebe variiert von 5,0 bis 18,42 Jahren (vgl. Grafik 1).



Das durchschnittliche Alter liegt bei 9,34 Jahren (vgl. Tabelle 1). Die Rassenverteilung und das durchschnittliche Alter der Tiere der einzelnen Rassen ergibt sich aus Tabelle 1.

Alle Tiere (100%) sind weiblich, davon sind 20 (23,81%) kastriert.

Tabelle 1:
Rassenverteilung und durchschnittliches Alter der untersuchten Tiere (n=84)

<i>Rasse(n)</i>	<i>Zahl der Tiere dieser Rasse(n)</i>	<i>durchschnittliches Alter bei erster Operation</i>
Mischling	26 Tiere (30,95%)	9,98 Jahre
Teckel	15 Tiere (17,86%)	9,56 Jahre
Yorkshire Terrier	8 Tiere (9,52%)	8,24 Jahre
Deutscher Schäferhund	6 Tiere (7,14%)	9,76 Jahre
übrige Terrier (außer Yorkshire Terrier)	5 Tiere (5,95%)	8,34 Jahre
Pudel	4 Tiere (4,76%)	9,41 Jahre
Cocker Spaniel	3 Tiere (3,57%)	9,39 Jahre
Boxer	2 Tiere (2,38%)	9,50 Jahre
kleiner Münsterländer	2 Tiere (2,38%)	9,04 Jahre
Setter	2 Tiere (2,38%)	9,37 Jahre
Shi-Tzu	2 Tiere (2,38%)	10,50 Jahre
Afghane, Beagle, Chihuahua, kaukasischer Owtscharka, Labrador, Pinscher, Rottweiler, Saluki, Siberian Husky	je 1 Tier (1,19%)	8,03 Jahre
gesamt	84 Tiere (100%)	9,34 Jahre

3.2.2. Ergebnis der Verlaufsuntersuchung

Bei Abschluß der Studie sind 55 Tiere (65,48% aller Hunde) am Leben. Die durchschnittliche Überwachungszeit liegt bei 26,2 Monaten. Bei 23 dieser Tiere wurde der angestrebte Überwachungszeitraum von zwei Jahren um einen bis sieben Monate unterschritten. Die überwiegende Zahl der noch lebenden Hunde (45 Tiere oder 81,82% der noch lebenden Hunde) zeigt keine weiteren Mammatumoren, Metastasen oder Rezidive.

27 Hunde (32,14% aller Tiere) sind innerhalb des Überwachungszeitraums gestorben oder getötet worden.

Bei acht dieser Tiere (29,63% der Tiere, die nicht mehr am Leben sind bzw. 9,52% aller Tiere) erfolgte die Tötung aufgrund von Mammatumoren bzw. deren Metastasen. Die erste Operation wurde dabei um durchschnittlich 28,4 Monate überlebt. Vier der acht Tiere wurden innerhalb der ersten eineinhalb Jahre nach der ersten Operation getötet (nach 1,5, 2, 11,5 bzw. 14 Monaten), die übrigen überlebten ungefähr zwei Jahre (24 bzw. 26 Monate) bzw. deutlich länger (48 bzw. 100 Monate). Fünf der acht Tiere waren mehrmals mammektomiert oder teilmammektomiert worden. Der Überlebenszeitraum nach der letzten bzw. einzigen Operation betrug bei den acht Tieren, welche aufgrund der Mammatumorerkrankung starben oder getötet wurden, zwischen einem und 14 Monaten.

Keines der 11 Tiere (13,10% aller Tiere), die vor Abschluß der Studie aufgrund anderer Ursachen starben oder getötet wurden, überlebte die erste Operation um mehr als zwei Jahre. Von den Tieren, bei denen die Todes- bzw. Tötungsursache nicht bekannt ist, überlebten zwei länger als zwei Jahre (26 bzw. 36 Monate).

Eine Übersicht der Daten zum Schicksal der Tiere bietet Tabelle 2 (S. 40).

3.2.3. Lymphknotenstatus

Bei 51 Tieren (60,71%) werden nach Beurteilung der H.E.-gefärbten Schnittpräparate alle vorliegenden Lymphknoten als frei von Metastasen oder Tumorzellemboli eingestuft. Bei elf Tieren (13,10%) besteht in mindestens einem Lymphknoten Verdacht auf Tumorzellemboli, bei 5 Tieren (5,95%) finden sich in mindestens einem Lymphknoten definitiv Tumorzellemboli. Acht Tiere (9,52%) weisen Tumormetastasen in mindestens einem Inguinallymphknoten auf.

Tabelle 2:
Schicksal, Überwachungszeitraum, Alter und Tumoranzahl der untersuchten Tiere (n=84)

<i>Schicksal / Krankheitsverlauf des Tieres</i>	<i>Zahl der Tiere (% der Gesamt- patienten- zahl)</i>	<i>durch- schnittliche Über- wachungs-/ Überlebens- zeit nach erster Operation in Monaten (Min-Max)</i>	<i>durch- schnittliches Alter zum Zeitpunkt der ersten Operation in Monaten (Min-Max)</i>	<i>durch- schnittliche Anzahl von Mamma- tumoren i. e. S. (Min- Max)**</i>
am Leben (gesamt)	55 (65,48%)	26,2 (17-56)	8,76 (5,0-14,0)	3,6 (0-13)
ohne neue Mammatumoren, Rezidive oder klinisch feststellbare Metastasen	45 (53,57%)	25,6 (17-54)	8,76 (5,0-14,0)	3,8 (0-13)
zeigt Rezidive oder neue Mammatumoren	6 (7,14%)	29,7 (21-56)	8,47 (5,58-12,0)	3,8 (3-7)
hat Verdacht auf Fernmetastasen	2 (2,38%)	31,0 (26-36)	9,41 (8,83-10,0)	1,5 (1-2)
Gesundheitszustand in bezug auf Mammatumoren unbekannt	2 (2,38%)	23,5 (22-25)	8,99 (8,83-9,15)	1
gestorben oder getötet (gesamt)	27 (32,14%)	17,8 (0*-100)	10,33 (7,17-18,42)	2,8 (0-9)
aufgrund von Mammatumoren/ -Metastasen	8 (9,52%)	28,4 (1,5-100)	9,87 (8,0-14,0)	3,9 (1-7)
nicht aufgrund von Mamma- tumoren	11 (13,10%)	12,5 (0*-24)	10,47 (7,42-13,0)	2,6 (0-9)
ohne neue Mammatumoren, Rezidive oder klinisch feststellbare Metastasen	6 (7,14%)	12,3 (1-21)	9,76 (7,42-12,0)	1,8 (0-3)
hatte neue Mammatumoren	2 (2,38%)	17,0 (15-19)	11,79 (11-12,58)	5,0 (1-9)
Gesundheitszustand in bezug auf Mammatumoren unbekannt	2 (2,38%)	14,8 (5,5-24)	10,03 (9,0-11,07)	2,0 (1-3)
während der ersten Operation getötet	1 (1,19%)	0*	13,0	4
Ursache unbekannt	8 (9,52%)	14,5 (0,75-36)	10,57 (7,17-18,42)	2,0 (0-8)
Verbleib unbekannt	2 (2,38%)	entfällt	11,9 (11,0-12,38)	2,0 (1-3)
gesamt	84 (100%)	22,9 (0*-100)	9,34 (5,0-18,42)	3,3 (0-13)

Max: höchster Wert; Min: niedrigster Wert

* Tier wurde *intra operationem* getötet

** Tumoren i.w.S. und Mammatumoren i.w.S. werden nicht mitgezählt. Tiere, von denen nur Tumoren i.w.S. oder Mammatumoren i.w.S. vorliegen, erhalten die Tumoranzahl "0".

3.2.4. Ergebnisse der Vorversuche

3.2.4.1. Histologische Färbetechniken zur Darstellung von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen

3.2.4.1.1. Ergebnis der Färbung nach Ladewig

Bei dieser Färbung erscheint Fibrin jeden Alters leuchtend zinnoberrot. Obwohl diese Farbe einen guten Kontrast zur Färbung anderer Gewebestrukturen darstellt, ist das Auffinden kleiner Fibrinmengen problematisch und eine Interpretation ist nicht immer eindeutig möglich.

3.2.4.1.2. Ergebnis der Färbung nach Shoobridge

Mit Hilfe dieser Färbung kann Fibrin verschiedenen Alters im Gewebsschnitt gut dargestellt werden. Allerdings ist auch hier das Auffinden kleiner Fibrinmengen schwierig. Da das Fibrin verschiedene Farbtöne annimmt, ist die Unterscheidung zu anderen Gewebebestandteilen teilweise zweifelhaft.

Ein optimales Färbeergebnis erhält man, wenn die Schnitte für 5 min, also deutlich kürzer als in der Literatur angegeben, in den Primer eingestellt und anschließend 10 min, also länger als in der Literatur angegeben, in fließendem Leitungswasser gespült werden. Es spielt keine Rolle, ob der Picro-Formol-Primer oder gesättigte wässrige Pikrinsäure verwendet wird und ob die Temperatur des Primers bei 50°C oder Raumtemperatur liegt. Mit dieser Technik erscheint das Fibrin je nach Alter zunächst ungefärbt (sehr frisches Fibrin) und in diesem Zustand allenfalls zu vermuten, dann gelborange, orangerot, scharlachrot und schließlich blaurot bis blau wie Kollagen. Es ist dann von diesem nicht unterscheidbar. Erythrozyten erscheinen strahlend gelb.

Eine Vorbehandlung mit Picro-Formol-Primer für 30 min mit anschließender Spülzeit von 5 min, wie in der Literatur mitgeteilt, führt zu gelbstichiger und dadurch nicht sehr kontrastreicher Gewebeanfärbung. Auch bei Färbung ohne Primer verliert das Fibrin an Kontrast zur Umgebung, der Schnitt wird insgesamt dunkler und sehr rotstichig, die Erythrozyten sind unauffällig. Der Einsatz einer roten Farbstoffmischung statt des WPS-Säurefuchsin verschlechtert die unterschiedliche Farbgebung von Fibrin verschiedenen Alters.

3.2.4.1.3. Ergebnis der Färbung nach Garvey et al.

In dieser Färbung stellt sich Fibrin in verschiedenen Violetttönen dar. Das Gewebe ist sehr dunkel und kontrastarm gefärbt, was sich auch bei Verkürzung der Einstellzeit in die modifizierte Verhoeff-Färbelösung kaum ändert. Die Färbung ohne Vorbehandlung führt zu noch dunkleren und kontrastärmeren Schnitten. Aufgrund der Dunkelheit und Kontrastarmut kann mit dieser Methode Fibrin allenfalls dann identifiziert werden, wenn es in großer Menge vorliegt.

3.2.4.1.4. Ergebnis der Färbung nach Pusey und Edwards

Bei dieser Färbung wird Fibrin leuchtend rosarot angefärbt. Auch einige Bestandteile des Bindegewebes nehmen ähnliche Farbtöne an, was eine Interpretation der Färbung sehr schwierig gestaltet.

3.2.4.2. Ergebnisse der Vorversuche zur Immunhistochemie

3.2.4.2.1. Ergebnis der Vorversuche zur Fibrin-Einfachmarkierung

Die Vorbehandlung der Schnitte im Mikrowellengerät für 2 x 5 min bei 600 W und eine Antikörperverdünnung von 1:50 erweisen sich als optimal. Mit dieser Methode stellt sich Fibrin leuchtend rot und spezifisch dar. Alle diejenigen Stellen des Schnittes, welche in histologisch gefärbten Schnitten fibrinpositiv erscheinen, reagieren stark fibrinpositiv in der Fibrin-Einfachmarkierung, wobei sich die Immunhistochemie bei der Darstellung kleiner Mengen und feiner Fibrinfasern und -stränge den histologischen Techniken deutlich überlegen zeigt. Bei der Thrombusbeurteilung läßt sich teilweise nicht zweifelsfrei erkennen, ob das Fibrin sich innerhalb eines Gefäßes befindet. Zwischen den Färbeergebnissen für Fibrin des Hundes und des Menschen in der Positivkontrolle konnte kein Unterschied festgestellt werden. Es ist keinerlei Hintergrundfärbung des Gewebes vorhanden, teilweise jedoch ist Serum hellrosa angefärbt. In wenigen Schnitten sind kleine Fast-Red-Partikel verteilt. Der Gewebeerhalt ist bezüglich der Deutlichkeit von Zellkernen und Zellgrenzen sehr gut. Allerdings lösen sich einige Gewebeteile bei der Vorbehandlung im Mikrowellengerät ab. Diese gehen verloren oder legen sich auf ein benachbartes Gewebeteil wieder an, was eine Beurteilung des betroffenen Gebietes verhindert. In der Negativkontrolle zeigt sich keinerlei Anfärbung.

Eine längere Vorbehandlung im Mikrowellengerät verbessert das Färbeergebnis nicht, führt aber zu deutlich mehr Verlusten durch Abschwimmen. Bei Vorbehandlung im Autoklaven wird Fibrin zwar ebenso stark angefärbt wie bei der Mikrowellenvorbehandlung, ist aber nicht klar zur Umgebung abgegrenzt (verwaschen) und der Hintergrund erscheint schwach rosa. Der Gewebeerhalt ist etwas schlechter als nach der Mikrowellenbehandlung. Die Vorbehandlung mit Protease führt zu einer sehr schwachen Fibrinfärbung bei gleichzeitig recht starker Hintergrundfärbung, der Gewebeerhalt ist mäßig. In Schnitten ohne Vorbehandlung ist keine Fibrinanfärbung erkennbar. Hintergrund und Gewebeerhalt der Negativkontrollen entsprechen jeweils diesen Ergebnissen.

Ist die Verdünnung des AK no.350 stärker als 1:50, so wird die Fibrindarstellung zunehmend blasser. Bei geringerer Verdünnung wird sie nicht deutlicher, es zeigt sich aber zunehmend Hintergrundanfärbung.

Bei Gewebsschnitten, deren Deckglas mit Nagellack umrahmt wurde, befindet sich im Vergleich mit den Nichtumrahmten nach einigen Tagen deutlich weniger Luft im Spaltraum zwischen Deckglas und Objektträger.

Für eine optimale Gegenfärbung der Schnitte werden diese für 40 sec in Hämatoxylin nach Mayer eingestellt, gefolgt von mindestens dreiminütigem Bläuen in fließendem Leitungswasser. Dies führt zu deutlicher, hell blau-violetter Zellkerndarstellung, erkennbarer Darstellung anderer Strukturen und klarem Kontrast zum Rot des Fibrins, ohne dies zu überdecken (vgl. Abbildungen 1-4, S. 53 und 54).

3.2.4.2.2. Ergebnis der Vorversuche zur immunhistochemischen Darstellung von Gefäßen

Sowohl die Vorbehandlung der Schnitte mit Protease als auch im Mikrowellengerät führt zu einer deutlichen Anfärbung der Endothelien, teilweise findet sich eine positive Darstellung auch in den Gefäßlumina. Eine Vorbehandlung der Schnitte mit Protease resultiert in etwas kräftigerer Farbgebung als eine Vorbehandlung im Mikrowellengerät, aber auch in mäßiger Hintergrundfärbung besonders des Bindegewebes. Mikrowellenvorbehandelte Schnitte weisen keinerlei Hintergrundfärbung auf.

Die nach Mikrowellenvorbehandlung dargestellten Gefäße entsprechen weitgehend denen nach zweiminütiger Proteasevorbehandlung, bei welcher nach GUTBERLET (1994) Blutgefäße deutlich und Lymphgefäße kaum dargestellt werden.

3.2.4.2.3. Ergebnis der Vorversuche zum immunhistochemischen Nachweis zweier Antigene in einem Gewebsschnitt (Doppelmarkierung)

Die Darstellung des ersten Primärantikörpers durch Fast Blue BB Salz und des zweiten durch Fast Red TR Salz erweist sich als vorteilhaft gegenüber der umgekehrten Reihenfolge, da das jeweils zuerst eingesetzte Chromogen etwas von dem danach eingesetzten mitgetönt wird und einen Violetstich erhält. Die Farbe des zur Darstellung des zweiten Primärantikörpers gewählten Chromogens entspricht hingegen der in einer Einfachmarkierung. Das leuchtende Rot von mit Fast Red TR Salz dargestellten Strukturen setzt sich gegen einen violetten Farbton sehr viel deutlicher ab als das Dunkelblau von mit Fast Blue BB Salz dargestellten Strukturen. Da Fibrin in der Einfachmarkierung mit Fast Red TR Salz gefärbt wird, wird die Kombination AK no.350 / Fast Red TR Salz beibehalten. Somit wird AK no.350 als zweiter Primärantikörper eingesetzt, AK vWF als erster.

Als Gegenfärbung erweist sich Eisenhämatoxylin nach Weigert für 2 min mit nachfolgender Differenzierung in HCl-Alkohol für 1 min als optimal. Zellkerne erscheinen kräftig dunkelgrau, übrige Gewebestandteile sind hellgrau gefärbt. Längeres Einstellen in die Farblösung oder kürzere Differenzierung resultiert in einer zu dunklen Färbung der Schnitte. Bei kürzerem Einstellen in diese Farblösung oder längerem Differenzieren der Schnitte verliert die Darstellung an Kontrast. Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer bzw. Methylgrün verleiht den Zellkernen eine violette bzw. kräftig blautürkise Farbe. Diese Farblösungen sind für die Gegenfärbung ungeeignet, da es keinen deutlichen Kontrast zu den mit Fast Blue BB Salz bei der Doppelmarkierung dargestellten Gefäßen gibt. Nach BÖCK (1989) ist Methylgrün zudem instabil und muß in synthetische Medien eingedeckt werden, in denen sich die verwendeten Chromogene lösen würden.

Bei Darstellung mit der resultierenden optimalen Methode erscheint Fibrin sowohl in den thrombosierten Gefäßen als auch extravasal in den meisten Fällen leuchtend rot, die Gefäßendothelien violett. Einige Thrombi und extravasale Fibrinablagerungen reagieren jedoch nicht nur mit AK no.350, sondern auch mit AK vWF. Es ist keine Hintergrundfärbung festzustellen.

3.2.5. Durchführung der Hauptversuche

Aus den Ergebnissen der Vorversuche ergeben sich folgende Durchführungen der Hauptversuche:

3.2.5.1. Durchführung der histologischen Darstellung von Fibrin im Hauptversuch

Modifizierte Färbung nach Shoobridge (Änderungen gegenüber den Anweisungen in der Literatur sind durch Fettung kenntlich gemacht.):

1. Entparaffinieren: Xylol und absteigende Alkoholreihe
2. Vorbehandlung zur Kernfärbung:
 - 10 min Eisenalaun-Lösung
 - 1 min Spülen in fließendem Leitungswasser
 - 1 min Spülen in aqua dest.
3. Kernfärbung:
 - 7 min Hämatoxylin nach Mayer
 - 1 min Spülen in fließendem Leitungswasser
 - 30 sec Spülen in Säurealkohol
 - 10 min Spülen in fließendem Leitungswasser
 - kurz Spülen in aqua dest.
4. Vorbehandlung zur Bindegewebs- und Fibrinfärbung:
 - 5 min gesättigte wässrige Pikrinsäure**
 - 10 min** Spülen in fließendem Leitungswasser
5. Bindegewebs- und Fibrinfärbung (bei höchstens 20°C):
 - 5 min Färben in WPS-Orange G
 - je 10 Dips in 3 x aqua dest.
 - 5 min Färben in WPS-Säurefuchsin
 - je 10 Dips in 3 x aqua dest.
 - 5 min Färben in WPS-Anilinblau
 - je 10 Dips in 3 x aqua dest.
 - 3 x Spülen in absolutem Alkohol
6. Eindecken: über Xylol

3.2.5.2. Durchführung der immunhistochemischen Darstellung von Fibrin im Hauptversuch

APAAP-Einfachmarkierung (Die für den eingesetzten Antikörper bei Anwendung der in der Literatur beschriebenen APAAP-Methode nötige ermittelte Vorbehandlung und Verdünnung ist unterstrichen dargestellt. Änderungen gegenüber den Anweisungen in der Literatur sind durch Fettaufzeichnung kenntlich gemacht.):

1. Entparaffinieren:
20 min Xylol
15 min Aceton
15 min Aceton/TBS 1:1
2. 2 x 10 min Spülen in TBS
3. Vorbehandlung:
2 x 5 min Einstellen in Mikrowellengerät bei 600 W (je fünf Schnitte in einer Kunststoffkuvette mit Citratpuffer (pH 6,0) und einigen Siedesteinchen, verdampften Puffer jeweils nach 5 min auffüllen.)
30 min Abkühlen
4. 30 min Primärantikörper: AK no.350 in der Verdünnung 1:50
5. 30 min verdünnter Brückenantikörper
6. 30 min verdünnter APAAP-Komplex
7. 15 min verdünnter Brückenantikörper
8. 15 min verdünnter APAAP-Komplex
9. 30 min Entwickeln (Chromogen: Fast Red TR Salz)
10. 2x5 min Spülen in TBS
11. Gegenfärben:
40 sec Einstellen in Hämatoxylin nach Mayer
> 3 min Bläuen in Wasser
12. Eindecken in Kaisers Glyceringelatine und **Deckgläschen nach der Trocknung mit farblosem Nagellack umrahmen**

Für die Schritte 4-8 werden die Schnitte auf Coverplates[®] aufgezogen und in die Sequenza[®]-Färbestation eingesetzt. Nach den Schritten 3-8 erfolgt jeweils eine fünfminütige Spülung der Schnitte mit TBS.

3.2.5.3. Durchführung der immunhistochemischen Darstellung von Gefäßen im Hauptversuch

In den Hauptversuchen werden Gefäße nur im Rahmen der Doppelmarkierung dargestellt.

3.2.5.4. Durchführung der Doppelmarkierung im Hauptversuch

APAAP-Doppelmarkierung (Die ermittelte optimale Reihenfolge der Antikörper und Chromogene ist durch Unterstreichung kenntlich gemacht. In der Literatur nicht in dieser Art mitgeteilte Schritte sind durch Fettung gekennzeichnet.):

- 1.-3. wie Schritte 1-3 in Kapitel 3.2.5.2., S. 45
4. 30 min erster Primärantikörper: AK vWF in der Verdünnung 1:400
5. 30 min Mausifikation: verdünntes Maus-Anti-Rabbit IgG
- 6.-9. wie Schritte 5-8 in Kapitel 3.2.5.2., S. 45
10. 30 min Entwickeln (Chromogen: Fast Blue BB Salz)
11. 2x5 min Spülen in TBS
12. 30 min zweiter Primärantikörper: AK no.350 in der Verdünnung 1:50
- 13.-16. wie Schritte 5-8 in Kapitel 3.2.5.2., S. 45
17. 30 min Entwickeln (Chromogen: Fast Red TR Salz)
18. 2x5 min Spülen in TBS
19. Gegenfärben:
2 min Einstellen in Eisenhämatoxylin nach Weigert
1 min Differenzieren in HCl-Alkohol
12. Eindecken in Kaisers Glyceringelatine und **Deckgläschen nach der Trocknung mit farblosem Nagellack umrahmen**

Für die Schritte 4-9 und 12-16 werden die Schnitte auf Coverplates[®] aufgezogen und in die Sequenza[®]-Färbestation eingesetzt. Nach den Schritten 3-9 und 12-16 erfolgt jeweils eine fünfminütige Spülung der Schnitte mit TBS.

3.2.6. Untersuchte Tumoren

Von den 84 Tieren, welche aufgrund von Mammaneoplasien operiert wurden, litten drei (3,57% aller Tiere) lediglich an Tumoren i.w.S. (je ein Abszeß, eine chronische interstitielle Mastitis und eine Phlegmone mit Hyperplasie des Mammagewebes). Bei zwei Tieren (2,38% aller Tiere) finden sich ausschließlich Mammatumoren i.w.S. (in einem Fall ein Lymphosarkom, in dem anderen zwei gering differenzierte solide Karzinome und ein Basalzelltumor). Von den übrigen 79 Tieren (94,05%) liegt wenigstens ein Mammatumor i.e.S. vor.

Von drei dieser 79 Tiere (3,57% aller Tiere) stammen sowohl je ein oder zwei Mammatumor(en) i.w.S. als auch ein oder mehrere Mammatumoren i.e.S. Im ersten Fall sind dies ein Fibrosarkom und ein benigner Mammatumor i.e.S., im zweiten Fall ein Plattenepithelkarzinom, zwei maligne und zwei benigne Mammatumoren i.e.S. und im dritten Fall ein Plattenepithelkarzinom, ein Osteofibrom, sechs maligne und ein benigner Mammatumor i.e.S.

76 Tieren (90,48% aller Tiere) wurden ausschließlich Mammatumoren i.e.S. entnommen. 58 dieser Tiere zeigen einen oder mehrere maligne Mammatumoren i.e.S. und keine benignen Neoplasien, eines lediglich einen benignen Mammatumor i.e.S. und die übrigen 17 Tiere sowohl mindestens einen malignen als auch mindestens einen benignen Mammatumor i.e.S.

Von den 57 Tieren (67,86% aller Tiere), welche an mehreren neoplastischen Veränderungen der Mamma litten, liegen bei der Mehrzahl (41 Tiere oder 71,93% der Tiere mit mehreren Neoplasien) Tumoren verschiedener Klassifikationen zur Untersuchung auf Fibrin vor.

Es ergibt sich folgende Verteilung der Diagnosen der neoplastischen Veränderungen der Mamma:

Mammatumoren i.w.S. (insgesamt acht Tumoren):

- benigne (ein Tumor): ein Osteofibrom;
- semimaligne (ein Tumor): ein Basalzellentumor;
- maligne (sechs Tumoren): je zwei gering differenzierte solide Karzinome und Plattenepithelkarzinome sowie je ein Lymphosarkom und Fibrosarkom.

Mammatumoren i.e.S. (insgesamt 269 Tumoren):

- benigne (32 Tumoren): 13 Adenome, zehn Adenome mit Myoepithelhyperplasie und neun Myoepitheliome;
- maligne (237 Tumoren): 122 Adenokarzinome mit Myoepithelhyperplasie, 88 Adenokarzinome, zehn komplexe Karzinome, vier solide Karzinome, je drei überwiegend anaplastische Karzinome mit vereinzelter Alveolenbildung, Myoepithelkarzinome, scirrhöse Karzinome und Karzinosarkome sowie ein solides Karzinom mit Myoepithelhyperplasie.

Bei 20 Tieren (23,81% aller Tiere) finden sich ausserdem frühe Karzinomstadien.

Bei sieben Tieren (8,33% aller Tiere) liegen nicht von allen bei diesem Tier im H.E.-Präparat vorhandenen Tumortypen Exemplare für die Untersuchung auf Fibrin vor. Bei einem Tier (1,19%) konnte der bösartigste Tumor nicht auf Fibrin untersucht werden. Von acht Hunden (9,52%) fehlen Präparate von Operationen, welche vor Beginn der Studie durchgeführt worden waren.

3.2.7. Gefäßdichte

Die Auszählung der Gefäße von je fünf Vertretern der verschiedenen Gefäßdichtegruppen ergibt folgende Ergebnisse:

Gefäßdichtegruppe 1: im Mittel 8,5 Gefäßanschnitte/mm² (5,4 bis 13,0; Median: 7,8).

Gefäßdichtegruppe 2: im Mittel 19,5 Gefäßanschnitte/mm² (13,6 bis 27,4; Median: 16,5).

Gefäßdichtegruppe 3: im Mittel 69,9 Gefäßanschnitte/mm² (35,8 bis 131,1; Median: 52,2).

3.2.8. Nachweis von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen in Inguinallymphknoten

Die Ergebnisse des Fibrinnachweises in den Inguinallymphknoten von 33 Tieren (39,29% aller Tiere) aus 35 Operationen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Es werden 20 Lymphknoten, welche im H.E.-Präparat frei von Metastasen oder Tumorzellemboli erscheinen, auf das Vorhandensein von Fibrin untersucht. Zwölf Lymphknoten sind frei von Fibrin. In acht Lymphknoten zeigt sich Fibrin in Form extravasaler Ablagerungen. Diese befinden sich in zwei dieser Lymphknoten in Kontakt mit Blutungen, in vier Lymphknoten sind nur ein oder zwei kleine Ablagerungen zu finden, und in zwei Lymphknoten finden sich diverse Ablagerungen.

Drei von vier untersuchten Lymphknoten, bei denen der Verdacht auf Tumorzellemboli besteht, sind fibrinnegativ. Ein Lymphknoten zeigt zwei kleine extravasale Fibrinablagerungen.

Vier Lymphknoten, in welchen im H.E.-Präparat Tumorzellemboli zu erkennen sind, werden untersucht. Zwei Lymphknoten sind frei von Fibrin. In je einem finden sich eine kleine extravasale Fibrinablagerung bzw. einige kleine extravasale Fibrinablagerungen und ein thrombosiertes großes Gefäß.

Sieben Lymphknoten mit im H.E.-Präparat sichtbaren Metastasen werden untersucht. In zwei Lymphknoten finden sich kleine extravasale Fibrinablagerungen. Fünf Lymphknoten weisen sowohl Thrombosierungen als auch extravasale Fibrinablagerungen auf: zwei Lymphknoten zeigen kleine extravasale Fibrinablagerungen und zwischen einem und vier thrombosierte Gefäße unterschiedlicher Größe, in den übrigen beiden Lymphknoten treten vor allem innerhalb der Metastase einige nekroseassoziierte Fibrinablagerungen und Thrombosierungen auf sowie ein bzw. drei thrombosierte(s) Gefäß(e) im verbliebenen Lymphknotengewebe bzw. in dessen Umgebung.

Tabelle 3:
Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Inguinallymphknoten (n=33)

<i>Lymphknotenstatus im H.E.-Präparat</i>	<i>frei von Fibrin</i>	<i>evf</i>	<i>thr</i>	<i>evf und thr</i>
	Zahl der Lymphknoten (% der Lymphknoten mit diesem Status)			
keine Metastasen oder Emboli (n=20)	12 (60,00%)	8 (40,00%)	-	-
Verdacht auf Tumorzellemboli (n=4)	3 (75,00%)	1 (25,00%)	-	-
mit Tumorzellemboli (n=4)	2 (50,00%)	1 (25,00%)	-	1 (25,00%)
mit Metastase (n=7)	-	2 (28,57%)	-	5 (71,43%)

evf: extravasale Fibrinablagerung(en); thr: Thrombosierung(en)

3.2.9. Nachweis von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen in nichtneoplastischem Mammagewebe

3.2.9.1. unverändertes Mammagewebe

Von 70 Hunden (83,33% aller Tiere) wird unverändertes Mammagewebe auf das Vorhandensein von Fibrin untersucht. Bei 55 Tieren kann kein Fibrin im Normalgewebe nachgewiesen werden. In acht Fällen finden sich eine oder mehrere extravasale Fibrinablagerungen, welche bei sechs Tieren stets und bei einem Tier zur Hälfte blutungsassoziiert auftreten. Bei sechs dieser acht Tiere können nur je eine oder zwei kleine Fibrinablagerungen dargestellt werden, bei zwei Tieren treten mehr als fünf Fibrinablagerungen auf. Bei sieben Tieren treten Thrombosierungen auf. Bei fünf dieser sieben Tiere ist je ein Gefäß betroffen, bei einem Tier zwei Gefäße in Tumornähe und bei einem weiteren Tier acht Gefäße in Tumornähe (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in nichtneoplastischem Mammagewebe und frühen Mammakarzinomstadien

<i>Art des Mammagewebes</i>	<i>frei von Fibrin</i>	<i>evf</i>	<i>thr</i>	<i>evf und thr</i>
	Zahl der Tiere, von denen Proben vorlagen (% aller Tiere dieser Gruppe)			
unverändert (n=70)	55 (78,57%)	8 (11,43%)	7 (10,00%)	-
hyperplastisch oder fibrotisch (n=35)	32 (91,43%)	2 (5,71%)	1 (2,86%)	-
entzündet, Gewebe sonst unverändert (n=3)	1 (25,00%)	3 (75,00%)	-	-
frühe Karzinome (n=20)	19 (95,00%)	1 (5,00%)	-	-

evf: extravasale Fibrinablagerung(en); thr: Thrombosierung(en)

3.2.9.2. nichtneoplastisch verändertes Mammagewebe

Hyperplastisches und/oder fibrotisches Mammagewebe liegt von 35 Tieren (41,67% aller Tiere) vor. In 32 dieser Proben findet sich kein Fibrin. In einer der Proben kann eine thrombosierte Kapillare dargestellt werden, in einer weiteren zwei kleine extravasale Fibrinablagerungen an einer Blutung. Bei einem Tier mit Mastitis im hyperplastischen Mammagewebe finden sich diverse extravasale Fibrinablagerungen. Auch in zwei Fällen von purulenter Mastitis und einem Fall von abszedierender Mastitis bei ansonsten unverändertem Mammagewebe können eiterassoziierte Fibrinablagerungen beobachtet werden, nicht jedoch im Falle einer chronisch interstitiellen Mastitis bei ansonsten unverändertem Mammagewebe (vgl. Tabelle 4).

3.2.10. Nachweis von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen in Mammagewebe im frühen Karzinomstadium

Von 20 Hunden (23,81% aller Tiere) wird Gewebe mit frühen Mammakarzinomstadien untersucht. Diese sind in nur einem Fall, welcher mit einer Mastitis einhergeht, mit extravasalen Fibrinablagerungen assoziiert (vgl. Tabelle 4).

3.2.11. Nachweis von Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Mammatumoren i.w.S.

Zum Vorkommen von extravasalen Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in Mammatumoren i.w.S. vgl. Tabelle 5. Zwei Drittel der malignen Tumoren weisen extravasale Fibrinablagerungen und mindestens eine Thrombosierung auf, während die beiden als benigne bzw. semimaligne klassifizierten Neoplasien frei davon sind.

Tabelle 5:
Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Mammatumoren i.w.S. (n=8)

		<i>Thrombosierungsgruppe</i>			
		0	1+	2+	3+
<i>evf-Gruppe</i>	0	Osteofibrom, Basalzelltumor, 2 gering differenzierte solide Karzinome	-	-	-
	1+	-	-	-	-
	2+	-	Lymphosarkom	-	Fibrosarkom
	3+	-	-	Plattenepithelkarzinom	Plattenepithelkarzinom

3.2.12. Nachweis von Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Mammatumoren i.e.S.

3.2.12.1. Vorhandensein von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen

Es werden 269 Mammatumoren i.e.S. von 79 Tieren untersucht. Bei 164 Tumoren (60,97% der Mammatumoren i.e.S.) verläuft der Fibrinnachweis negativ, in den übrigen 105 Tumoren (39,03%) kann Fibrin in Form von extravasalen Ablagerungen und/oder Thrombi dargestellt werden. Mehr als drei Viertel der Tumoren, die massive Fibrinablagerungen aufweisen, sind auch von vielen Thrombosierungen betroffen und umgekehrt. Ausschließlich extravasale Fibrinablagerungen, aber keine Thrombosierungen liegen in sieben Tumoren (2,60%) vor, 20 Tumoren (7,43%) sind von Thrombosierungen, nicht aber von extravasalen Fibrinablagerungen betroffen (vgl. Tabelle 6). Der χ^2 -Test weist auf einen Zusammenhang zwischen Thrombosierungs- und evf-Gruppe eines Tumors hin.

Bei 26 Tieren (32,91% aller Tiere mit Mammatumoren i.e.S.) liegen in keinem der untersuchten Tumoren extravasale Fibrinablagerungen oder Thrombosierungen vor, bei 53 Tieren (67,09%) ist wenigstens ein Tumor von mindestens einer extravasalen Fibrinablagerung oder mindestens einem thrombosierten Gefäß betroffen.

Tabelle 6:
Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Mammatumoren i.e.S. (n=269)

		<i>Thrombosierungsgruppe</i>				Summe	
		0	1+	2+	3+		
		Anzahl der Tumoren (% der Mammatumoren i.e.S.)					
<i>evf-Gruppe</i>	0	164 (60,97%)	12 (4,46%)	7 (2,60%)	1 (0,37%)	184 (68,40%)	85 (31,60%)
	1+	5 (1,86%)	4 (1,49%)	17 (6,29%)	4 (1,49%)	30 (11,15%)	
	2+	2 (0,74%)	4 (1,48%)	8 (2,97%)	4 (1,49%)	18 (6,69%)	
	3+	-	1 (0,37%)	7 (2,60%)	29 (10,78%)	37 (13,75%)	
	Summe	171 (63,57%)	21 (7,81%)	39 (14,50%)	38 (14,13%)		
		98 (36,43%)					

3.2.12.2. Art und Lage von extravasalen Fibrinablagerungen

In 85 Mammatumoren i.e.S. können extravasale Fibrinablagerungen dargestellt werden (vgl. Tabelle 6, S. 51), welche sich als vereinzelte, meist dünne Stränge oder Flecken unterschiedlicher Größe im Tumorstroma finden (vgl. Abbildungen 1-3, S. 53 und 54).

Bei 65 dieser Tumoren ist eine Kapsel vorhanden. In fünf Fällen (7,69% aller Mammatumoren i.e.S. mit extravasalen Fibrinablagerungen und Kapsel) treten extravasale Fibrinablagerungen ausschließlich dort auf, in neun Fällen (13,85%) in der Kapsel und im übrigen Tumor und in 51 Tumoren (78,46%) ausschließlich im sonstigen Tumorgewebe (vgl. Kapitel 8.4., S. 134ff).

67 der Mammatumoren i.e.S. mit extravasalen Fibrinablagerungen sind von Nekrosen betroffen. Bei gut einem Sechstel dieser Tumoren sind die extravasalen Fibrinablagerungen ausschließlich auf die nekrotischen Areale beschränkt, bei knapp der Hälfte der Tumoren mit extravasalen Fibrinablagerungen und Nekrosen findet sich ein Teil der extravasalen Fibrinablagerungen in Nekrosekontakt, andere im vitalen Tumorgewebe. Im übrigen Drittel besteht kein Kontakt von Nekrose und Fibrinablagerung. In Tumoren mit vielen extravasalen Fibrinablagerungen liegen diese häufig in Nekrosekontakt (vgl. Tabelle 7 und Abbildung 1, S. 53).

Tabelle 7:

Lage von extravasalen Fibrinablagerungen in Mammatumoren i.e.S. mit Nekrosen (n=67)

Lage der extravasale(n) Fibrinablagerung(en) (n=Zahl der Tumoren; % der Tumoren mit evf und Nekrose)	evf-Gruppe		
	1+ Zahl der Tumoren (% der Tumoren in dieser Beziehung zur Nekrose)	2+	3+
nur an/in Nekrose (n=12; 17,91%)	4 (33,33%)	1 (8,33%)	7 (58,33%)
teils in Nekrosekontakt (n=33; 49,25%)	1 (3,03%)	5 (15,15%)	27 (81,81%)
nicht in Nekrosekontakt (n=22; 32,84%)	12 (54,55%)	7 (31,82%)	3 (13,64%)

Bei 74 der Mammatumoren i.e.S. der evf-Gruppen 1+ bis 3+ finden sich Blutungen. In zehn Fällen (13,51% aller Mammatumoren i.e.S. mit extravasalen Fibrinablagerungen und Blutungen) ist das extravasale Fibrin ausschließlich blutungsassoziiert zu finden, in 34 Tumoren (45,95%) kommt extravasales Fibrin sowohl in Kontakt mit Blutungen als auch unabhängig davon vor (vgl. Abbildung 2, S. 53), und in 28 Fällen (37,84%) besteht in der untersuchten Schnittebene nie Kontakt von extravasalen Fibrinablagerungen mit Blutungen (vgl. Kapitel 8.4., S. 134ff).

In den Gewebsschnitten von 50 Mammatumoren i.e.S. liegt ein Teil des extravasalen Fibrins direkt perivaskulär (vgl. Abbildung 3, S. 54 und Kapitel 8.4., S. 134ff). In der Hälfte dieser Tumoren befindet sich ein Großteil dieser perivaskulären Fibrinablagerungen in nekrotischen Arealen. In gut einem Fünftel kann nur jeweils eine direkt perivaskuläre Fibrinablagerung dargestellt werden.

3.2.12.3. Größe und Lage von thrombosierte Gefäßen

In 98 Mammatumoren i.e.S. können Thrombosierungen dargestellt werden (vgl. Abbildungen 3 und 4, S. 54). In 34 dieser Tumoren (34,69% aller Mammatumoren i.e.S. mit Thrombosierungen) sind ausschließlich Kapillaren betroffen, in neun Tumoren (9,18%) ausschließlich mittlere und/oder große Gefäße. Sowohl thrombosierte Kapillaren als auch mittlere und/oder große Gefäße finden sich in 55 Fällen (56,12%), wobei in gut zwei Dritteln dieser Tumoren die Zahl der thrombosierte Kapillaren die der thrombosierte sonstigen Gefäße übersteigt (vgl. Kapitel 8.4., S. 134ff). Zur Verteilung der Thrombosierungsgruppen vgl. Tabelle 8.

Tabelle 8: Gefäßgröße und Thrombosierungsgruppe in Mammatumoren i.e.S. mit Thrombosierungen (n=98)

<i>betroffene(s) Gefäß(e)</i>	<i>Thrombosierungsgruppe</i>		
	1+	2+	3+
	Zahl der Tumoren (% aller Tumoren mit Thrombosierungen)		
nur Kapillare(n)	15 (15,31%)	16 (16,33%)	3 (3,06%)
Kapillare(n) und mittlere(s) Gefäß <u>oder</u> Kapillare(n) und große(s) Gefäß(e)	-	15 (15,31%)	14 (14,29%)
Kapillare(n), mittlere(s) <u>und</u> große(s) Gefäß(e)	-	5 (5,10%)	21 (21,43%)
nur mittlere(s) Gefäß(e)	4 (4,08%)	2 (2,04%)	-
nur großes Gefäß	2 (2,04%)	-	-
nur mittleres und großes Gefäß	-	1 (1,02%)	-

In den 78 Mammatumoren i.e.S. der Thrombosierungsgruppen 1+ bis 3+, welche eine Kapsel aufweisen, sind in 14 Fällen (17,95% aller Mammatumoren i.e.S. mit Thrombosierungen und Kapsel) die thrombosierte Gefäße ausschließlich in der Kapsel zu finden, in 38 Fällen (48,72%) ausschließlich im übrigen Tumorstroma. In den verbleibenden 26 Tumoren (33,33%) sind die Thrombosierungen sowohl in der Kapsel als auch im übrigen Tumor lokalisiert (vgl. Kapitel 8.4., S. 134ff).

In 71 der Mammatumoren i.e.S. mit Thrombosierungen treten Nekrosen auf. In einem Tumor (1,41% aller Mammatumoren i.e.S. mit Thrombosierungen und Nekrose) stehen alle thrombosierte Gefäße in Kontakt mit der Nekrose, in 44 Fällen (61,97%) sind die Thrombosierungen ausschließlich ausserhalb der nekrotischen Areale lokalisiert. 26 Tumoren (36,62%) weisen thrombosierte Gefäße sowohl ausserhalb von nekrotischem Gewebe als auch in Kontakt damit auf (vgl. Kapitel 8.4., S. 134ff).

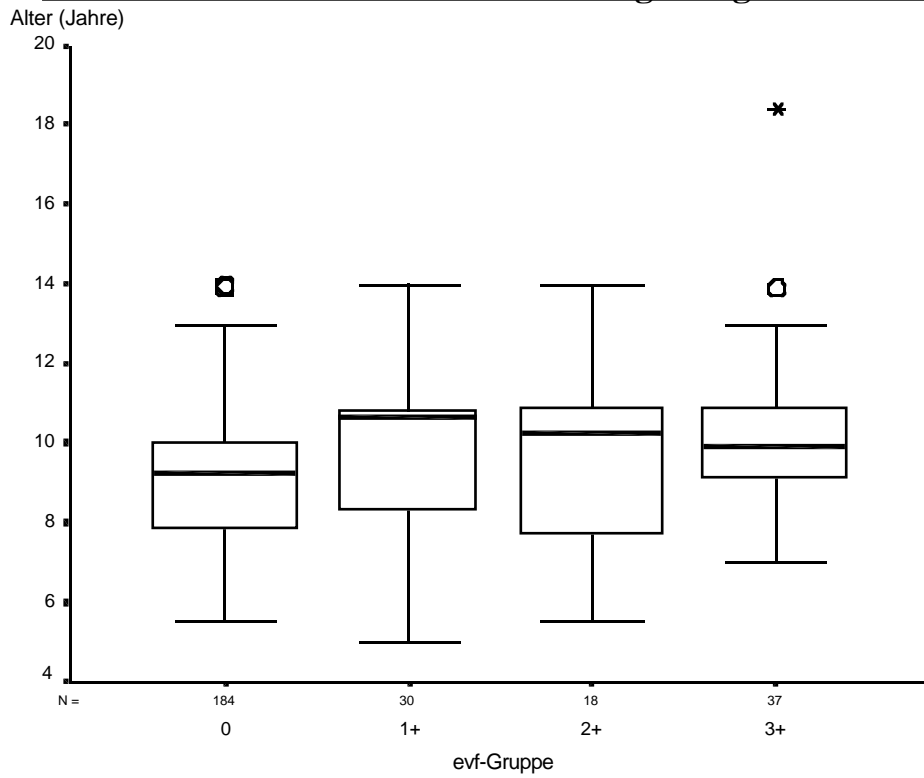
In 78 Mammatumoren i.e.S. treten Thrombosierungen und Blutungen auf. In 28 dieser Fälle (35,90% aller Mammatumoren i.e.S. mit Thrombosierungen und Blutungen) finden sich Blutungen neben einigen der thrombosierte Gefäße, in den übrigen 50 Tumoren (64,10%) stehen die thrombosierte Gefäße nicht in räumlichem Zusammenhang mit den Blutungen (vgl. Kapitel 8.4., S. 134ff).

3.2.13. Zusammenhang zwischen Fibrinnachweis in Mammatumoren i.e.S. und anderen Parametern

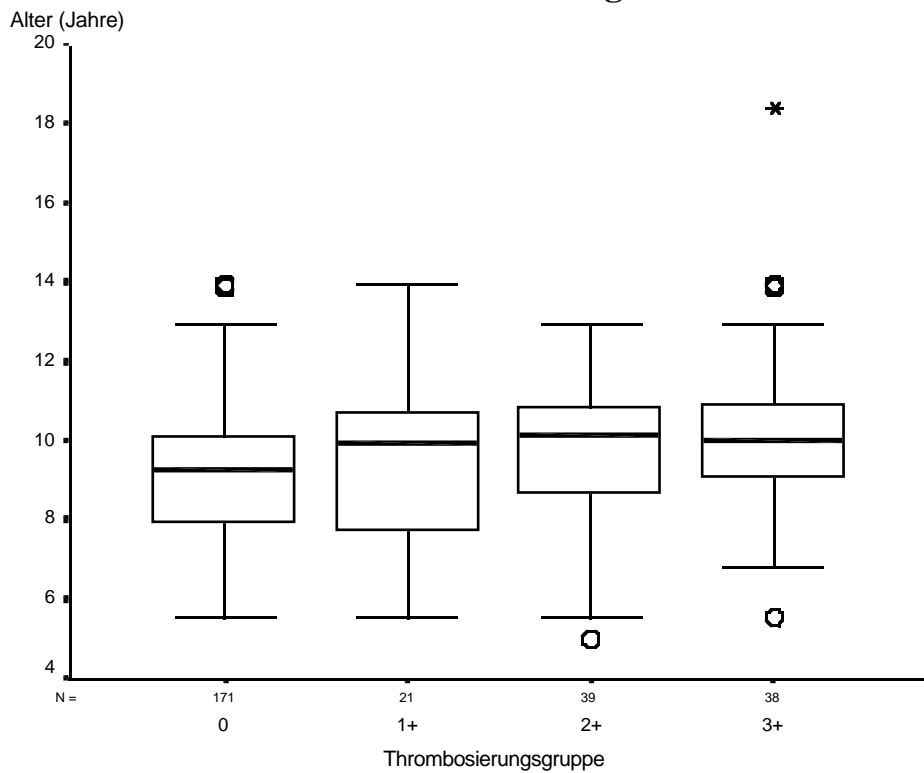
3.2.13.1. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren und Nationale

Das durchschnittliche Alter der Tiere, bei denen alle untersuchten Mammatumoren i.e.S. fibrin-negativ waren, liegt bei 8,85 Jahren (jüngstes Tier: 5,66 Jahre, ältestes Tier: 12,83 Jahre). Das durchschnittliche Alter der Tiere, bei denen in mindestens einem Tumor mindestens eine Thrombosierung oder eine extravasale Fibrinablagerung zu finden war, liegt bei 9,56 Jahren (jüngstes Tier: 5,0 Jahre, ältestes Tier: 18,42 Jahre). In Grafik 2a (S. 57) ist das Alter der Wirtstiere zum Zeitpunkt der jeweils ersten Mammatumoroperation in Beziehung zur evf-Gruppe der Tumoren dargestellt, in Grafik 2b (S. 57) in Beziehung zur Thrombosierungsgruppe. Der Kruskal-Wallis-Test erkennt einen Zusammenhang zwischen dem Alter des Tieres zum Zeitpunkt der ersten Operation und der Thrombosierungsgruppe bzw. der evf-Gruppe seiner Tumoren, vermutlich da fibrinnegative Tumoren häufiger von jüngeren Tieren stammen. Auch wenn man nur die Tumoren betrachtet, die tatsächlich aus der ersten Operation stammen, ist das Ergebnis ähnlich.

Grafik 2a: extravasale Fibrinablagerungen und Alter



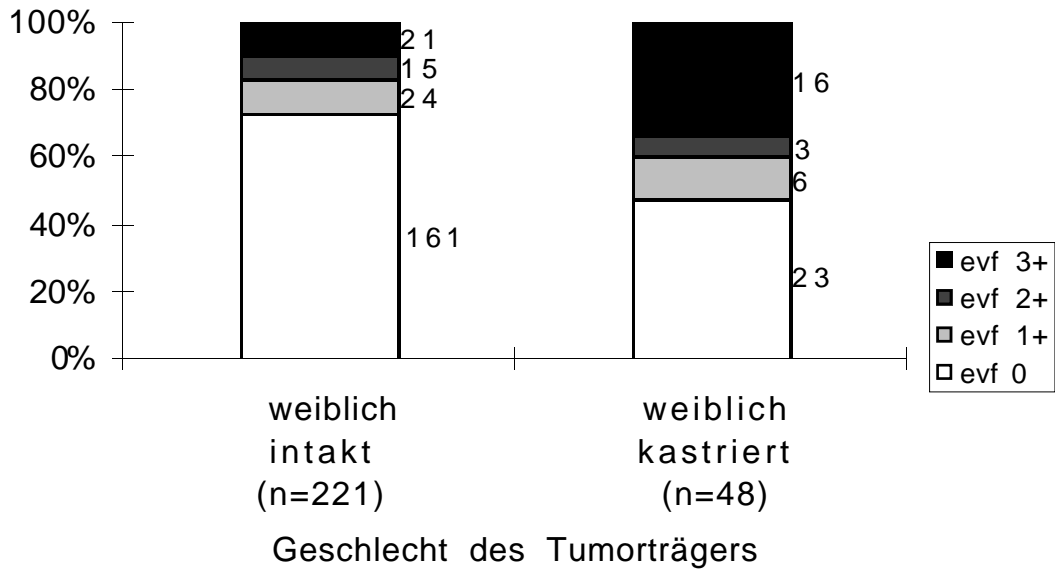
Grafik 2b: Thrombosierungen und Alter



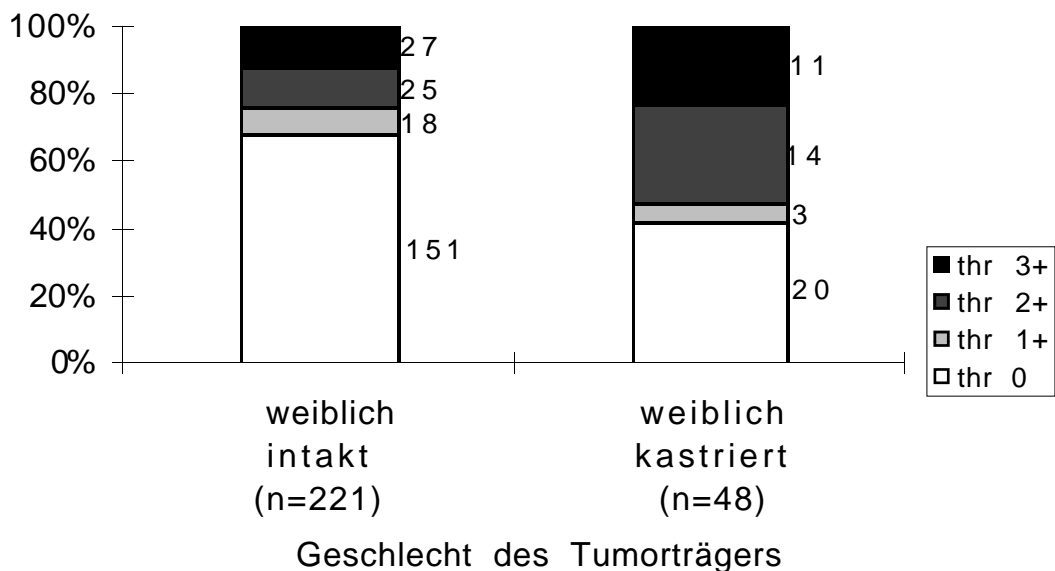
Von den weiblich kastrierten Tieren zeigen vier (21,05% aller weiblich kastrierten Tiere mit Mammatumoren i.e.S.) ausschliesslich fibrinnegative Mammatumoren i.e.S., bei den übrigen 15 (78,95%) kann in mindestens einem Mammatumor i.e.S. mindestens eine Thrombosierung oder extravasale Fibrinablagerung dargestellt werden. Von den weiblich intakten Tieren zeigen 22 (36,67% aller weiblich intakten Tiere mit Mammatumoren i.e.S.) ausschließlich fibrinnegative Tumoren, während bei den übrigen 38 (63,33% aller weiblich intakten Tiere mit Mammatumoren i.e.S.) in mindestens einem Mammatumor i.e.S. wenigstens eine Thrombosierung oder extravasale Fibrinablagerung vorliegt.

In den Grafiken 3a und 3b (S. 59) ist dargestellt, welches Geschlecht die Hündinnen haben, denen die Tumoren der einzelnen evf- und Thrombosierungsgruppen entnommen wurden. 221 Tumoren stammen von nichtkastrierten Hündinnen, 48 von kastrierten. In allen evf- und Thrombosierungsgruppen überwiegen die Tumoren der nichtkastrierten Tiere. Während jedoch bei den Tumoren ohne Thrombosierungen bzw. ohne extravasale Fibrinablagerungen jeweils rund sieben Mal mehr Tumoren von intakten als von kastrierten Hündinnen stammen, sind es bei den Tumoren der Gruppen thr 3+ bzw. evf 3+ nur zweieinhalb Mal bzw. knapp eineinhalb Mal so viele. Nach den Ergebnissen der χ^2 -Tests besteht sowohl zwischen der Thrombosierungsgruppe als auch der evf-Gruppe eines Tumors und dem Geschlecht des Wirtstieres vermutlich ein Zusammenhang.

Grafik 3a: extravasale Fibrinablagerungen und Geschlecht



Grafik 3b: Thrombosierungen und Geschlecht



Bei den drei am häufigsten in der Studie vertretenen Rassen ergibt sich folgendes Bild: von 15 Teckeln weisen fünf (33,33% aller Teckel) in keinem der untersuchten Mammatumoren i.e.S. extravasale Fibrinablagerungen oder Thrombosierungen auf, von 13 Terriern sechs (46,15% aller Terrier) und von sechs Deutschen Schäferhunden drei (50% aller Deutschen Schäferhunde). Von den 25 Mischlingen sind es neun (36,00% aller Mischlinge)(vgl. Kapitel 8.3. und 8.4., S. 130ff bzw. S. 134ff).

Tabelle 9 gibt Auskunft darüber, von welchen Rassen die Tumoren ohne Thrombosierungen bzw. extravasale Fibrinablagerungen und die der Gruppen thr 3+ und evf 3+ stammen. Mit Ausnahme des Deutschen Schäferhundes, bei dem vergleichsweise viele Tumoren massive Fibrinablagerungen oder viele Thrombosierungen zeigen, liegen die prozentualen Anteile der Tumoren der einzelnen evf- und thr-Gruppen jeweils in ähnlichen Bereichen.

Tabelle 9: Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren von Hunden verschiedener Rassen

<i>Rasse</i> (n=Zahl der Tumoren von Tieren dieser Rasse)	thr 0 Zahl der Mammatumoren i.e.S. von Tieren dieser Rasse (% aller Tumoren von Tieren dieser Rasse)	evf 0	thr 3+	evf 3+
Teckel (n=49)	29 (59,18%)	33 (67,35%)	7 (14,29%)	8 (16,33%)
Terrier (n=27)	16 (59,26%)	19 (70,37%)	5 (18,52%)	4 (14,81%)
Deutscher Schäferhund (n=16)	10 (71,43%)	9 (64,29%)	3 (21,43%)	4 (28,57%)
sonstige und Mischling (n=179)	116 (64,80%)	123 (68,72%)	23 (12,85%)	21 (11,73%)

3.2.13.2. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen bei Tieren mit multiplen Mammatumoren i.e.S.

Von 55 Tieren (65,48% aller Tiere bzw. 69,62% der Tiere mit Mammatumoren i.e.S.) liegt mehr als ein Mammatumor i.e.S. zur Untersuchung vor. Die Verteilung der Tumoren mit und ohne Thrombosierungen bzw. extravasale Fibrinablagerungen auf die Hunde ist heterogen. Annähernd zwei Drittel dieser Tiere litten sowohl an Tumoren ohne Thrombosierungen als auch an Tumoren, in denen mindestens eine Thrombosierung zu finden ist (vgl. Tabelle 10). Entsprechendes gilt für die extravasalen Fibrinablagerungen (vgl. Tabelle 11). Bei jeweils ungefähr der Hälfte dieser Tiere tritt auch mindestens ein Tumor der höchsten Thrombosierungs- bzw. evf-Gruppe (thr 3+ bzw. evf 3+) auf.

Tabelle 10: Tumoren mit und ohne Thrombosierungen bei Tieren mit multiplen Mammatumoren i.e.S. (n=55)

Zahl der Tumoren	<u>Thrombosierungen in</u>				
	keinem Tumor	einem Teil der Tumoren: in			allen Tumoren
		bis zu 1/3	>1/3 bis 2/3	>2/3	
	Zahl der Tiere (% der Tiere mit dieser Zahl von Tumoren)				
2 (n=16)	4 (25,00%)	entfällt	9 (56,25%)	entfällt	3 (18,75%)
3 (n=15)	7 (46,67%)	3 (20,00%)	3 (20,00%)	entfällt	2 (13,33%)
4-5 (n=9)	-	1 (11,11%)	6 (66,67%)	1 (11,11%)	1 (11,11%)
6-7 (n=7)	3 (42,86%)	1 (14,28%)	3 (42,86%)	-	-
8-13 (n=8)	-	4 (50,00%)	4 (50,00%)	-	-
gesamt*	25,45%	16,36%	45,45%	1,82%	10,91%

* % aller Tiere mit multiplen Mammatumoren i.e.S.

Tabelle 11: Tumoren mit und ohne extravasale Fibrinablagerungen bei Tieren mit multiplen Mammatumoren i.e.S. (n=55 Tiere)

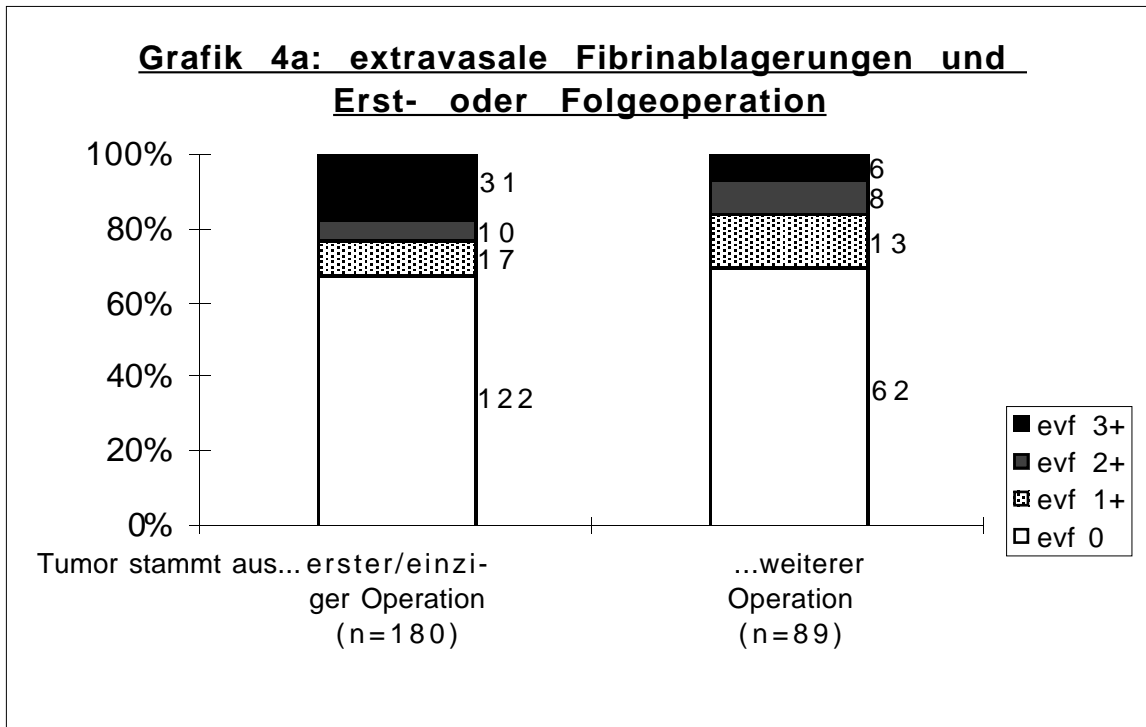
Zahl der Tumoren	<u>extravasale Fibrinablagerungen in</u>				
	keinem Tumor	einem Teil der Tumoren: in			allen Tumoren
		bis zu 1/3	>1/3 bis 2/3	>2/3	
	Zahl der Tiere (% der Tiere mit dieser Zahl von Tumoren)				
2 (n=16)	5 (31,25%)	entfällt	8 (50,00%)	entfällt	3 (18,75%)
3 (n=15)	7 (46,67%)	4 (26,67%)	4 (26,67%)	entfällt	-
4-5 (n=9)	1 (11,11%)	2 (22,22%)	3 (33,33%)	2 (22,22%)	1 (11,11%)
6-7 (n=7)	3 (42,86%)	2 (28,57%)	2 (28,57%)	-	-
8-13 (n=8)	-	5 (62,50%)	3 (37,50%)	-	-
gesamt*	29,09%	23,64%	36,36%	3,64%	7,27%

* % aller Tiere mit multiplen Mammatumoren i.e.S.

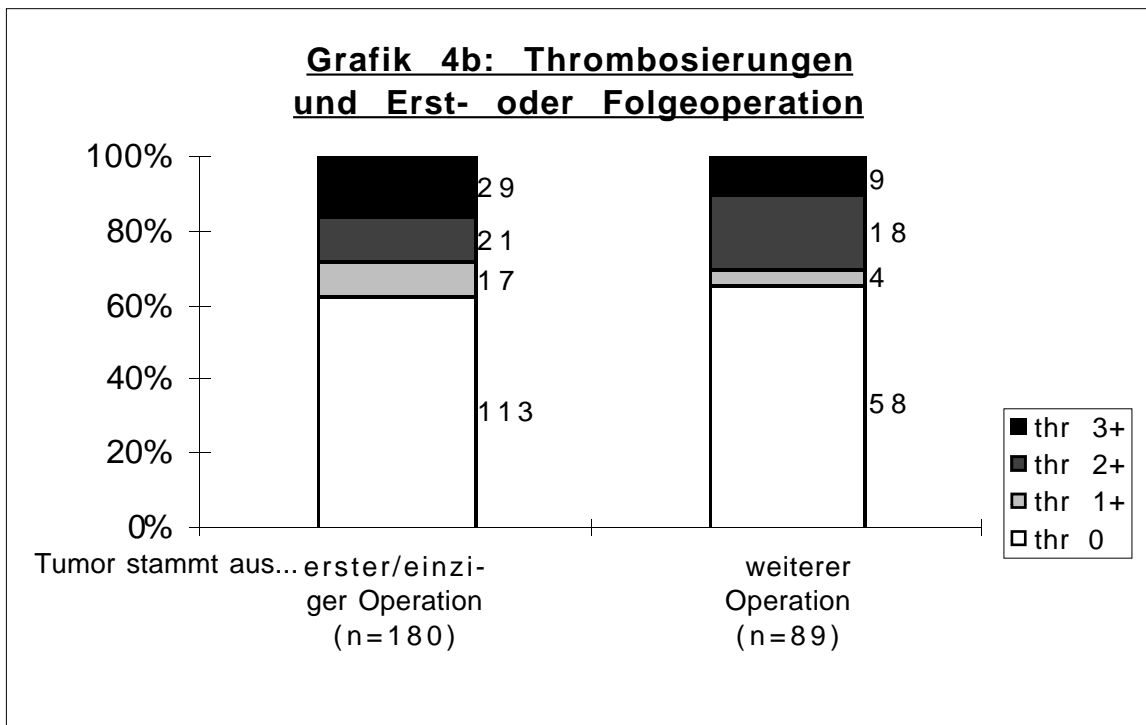
3.2.13.3. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren aus der ersten bzw. einzigen Operation oder einer Folgeoperation eines Tieres

180 oder 66,91% aller Mammatumoren i.e.S. stammen aus der ersten (bzw. der einzigen) Mammatumoroperation des betreffenden Tieres, 89 oder 33,01% aus einer in zeitlichem Abstand dazu vorgenommenen zweiten bis vierten. In den Grafiken 4a und 4b (S. 63) ist die Aufteilung der Tumoren auf die evf- und Thrombosierungsgruppen dargestellt. Die Verteilung der Tumoren auf diese Gruppen ist sehr ähnlich. Auch statistisch ist kein Zusammenhang zwischen der evf- bzw. Thrombosierungsgruppe eines Tumors einerseits und andererseits der Tatsache, ob er aus einer ersten (bzw. einzigen) oder einer weiteren Operation stammte, nachweisbar.

Grafik 4a: extravasale Fibrinablagerungen und Erst- oder Folgeoperation



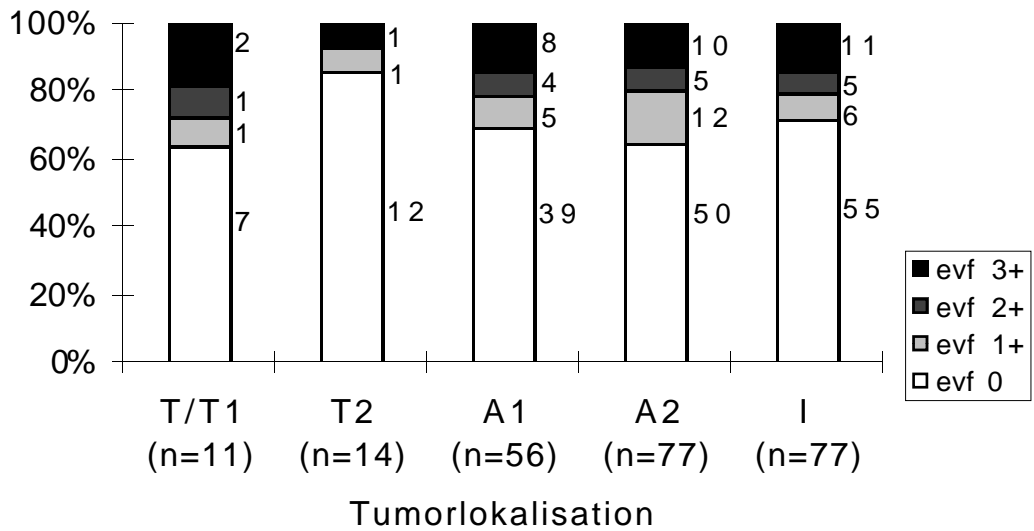
Grafik 4b: Thrombosierungen und Erst- oder Folgeoperation



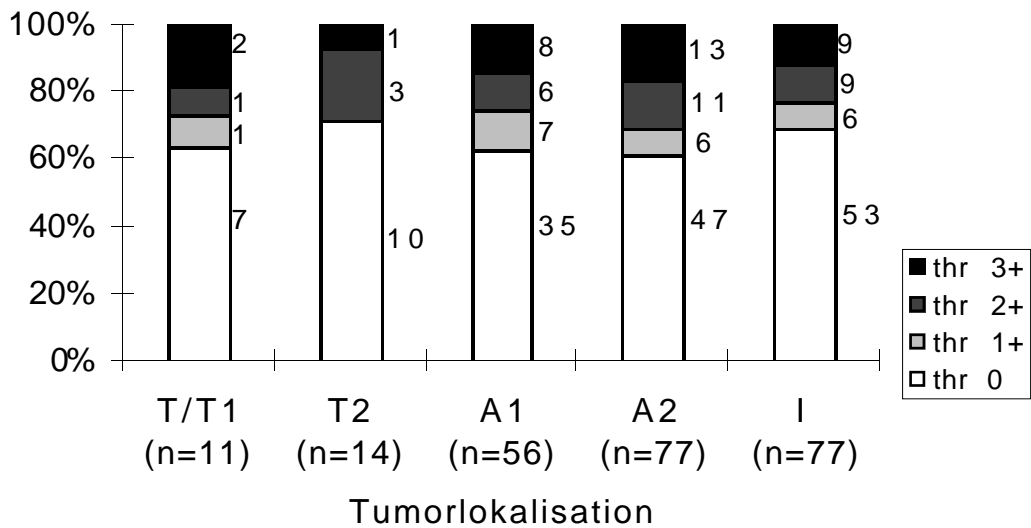
3.2.13.4. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren aus verschiedenen Lokalisationen

Bei 235 Mammatumoren i.e.S. (87,36% der Mammatumoren i.e.S.) ist bekannt, in welchem Mammarkomplex sie wuchsen: elf der untersuchten Tumoren (4,68% der Tumoren bekannter Lokalisation) stammen aus T oder T1, 14 (5,96%) aus T2, 56 (23,83%) aus A1, 77 (32,77%) aus A2 und 77 (32,77%) aus I. Zur Verteilung der Tumoren auf die evf- und Thrombosierungsgruppen vgl. die Grafiken 5a bzw. 5b (S. 65) Je ungefähr zwei Drittel der Tumoren jedes Mammarkomplexes sind frei von Thrombosierungen bzw. extravasalen Fibrinablagerungen. Eine Ausnahme bilden die Tumoren von T2, von denen über 85% frei von extravasalen Fibrinablagerungen sind. Zwischen einem Sechstel und einem Neuntel der Tumoren der einzelnen Mammarkomplexe sind in den Gruppen thr 3+ und evf 3+ anzutreffen, wiederum mit Ausnahme der Tumoren von T2, wo es nur je ein Vierzehntel ist. Mittels χ^2 -Test ist weder ein Zusammenhang zwischen der Lage eines Tumors und der evf-Gruppe, noch zwischen der Lage und der Thrombosierungsgruppe nachzuweisen.

Grafik 5a: extravasale Fibrinablagerungen und Tumorlokalisation



Grafik 5b : Thrombosierungen und Tumorlokalisation

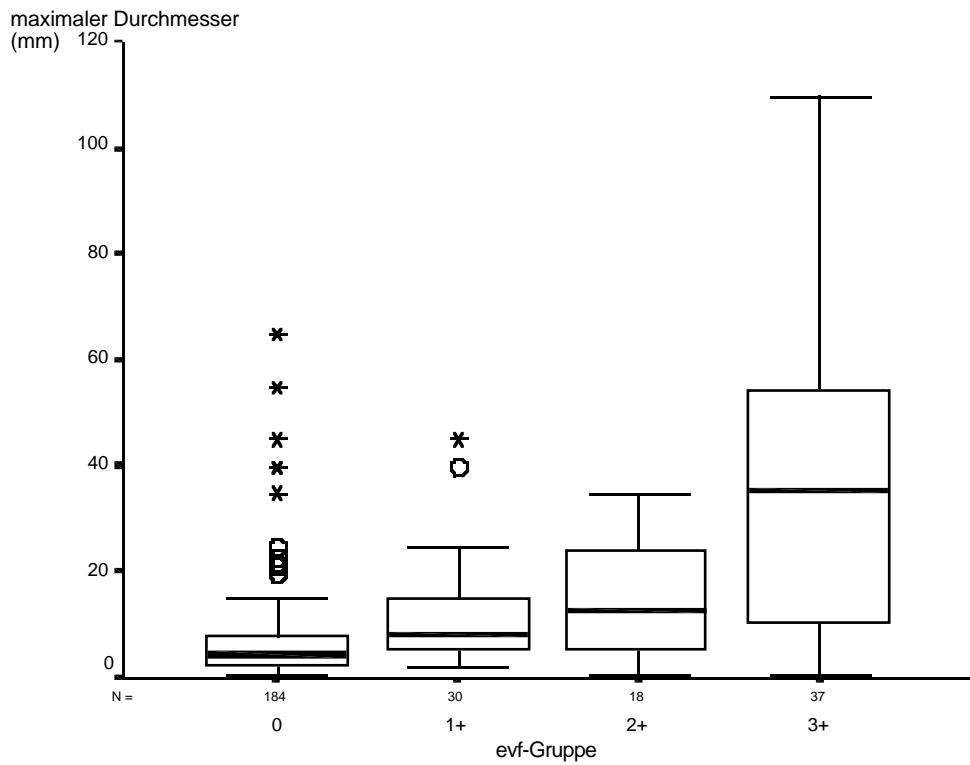


3.2.13.5. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren unterschiedlicher Größe

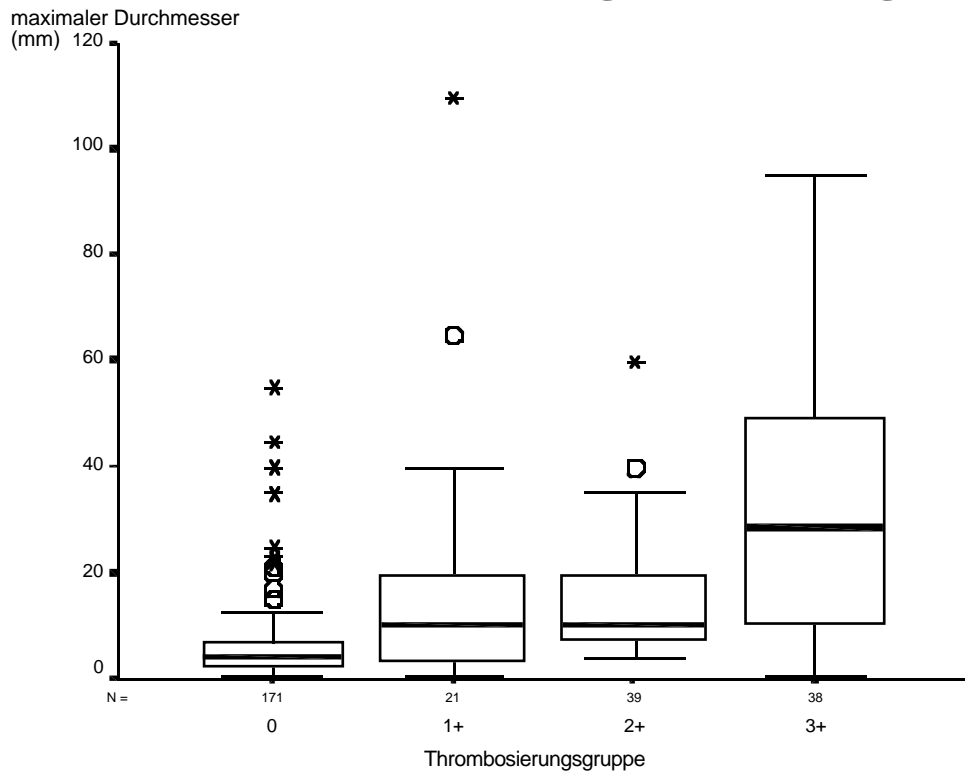
35 der untersuchten Tumoren (13,01% der Mammatumoren i.e.S.) sind mikroskopisch klein mit einem maximalen Durchmesser von 0,5 mm, 105 Tumoren (39,03%) sind >0,5 bis 5 mm groß, 83 Tumoren (30,86%) >5 bis 20 mm, 33 Tumoren (12,27%) >20 bis 50 mm und 13 (4,83%) größer als 50 mm. Zur Verteilung der Tumoren der verschiedenen Größen auf die evf- und Thrombosierungsgruppen vgl. die Grafiken 6a und 6b (S. 67).

Kleinere Tumoren sind weitaus häufiger frei von Thrombosierungen als größere. Umgekehrt zeigen größere Tumoren viel häufiger viele Thrombosierungen als kleinere. Entsprechendes gilt für die Verteilung der evf-Gruppen auf die Tumoren unterschiedlicher Größe. Die Vermutung, daß ein solcher Zusammenhang zwischen evf- bzw. Thrombosierungsgruppe einerseits und der Tumorgöße andererseits besteht, wird durch die Ergebnisse der Kruskal-Wallis- und der Mann-Whitney-Tests gestützt.

Grafik 6a: extravasale Fibrinablagerungen und Tumorgröße



Grafik 6b: Thrombosierungen und Tumorgröße



3.2.13.6. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren unterschiedlicher Klassifikation

In den Grafiken 7a und 7b (S. 69) ist dargestellt, wie sich Tumoren unterschiedlicher Klassifikation auf die evf- und Thrombosierungsgruppen aufteilen.

Alle benignen Mammatumoren i.e.S. sind frei von extravasalen Fibrinablagerungen, nur in zwei Fällen kann ein einzelnes thrombosiertes Gefäß dargestellt werden.

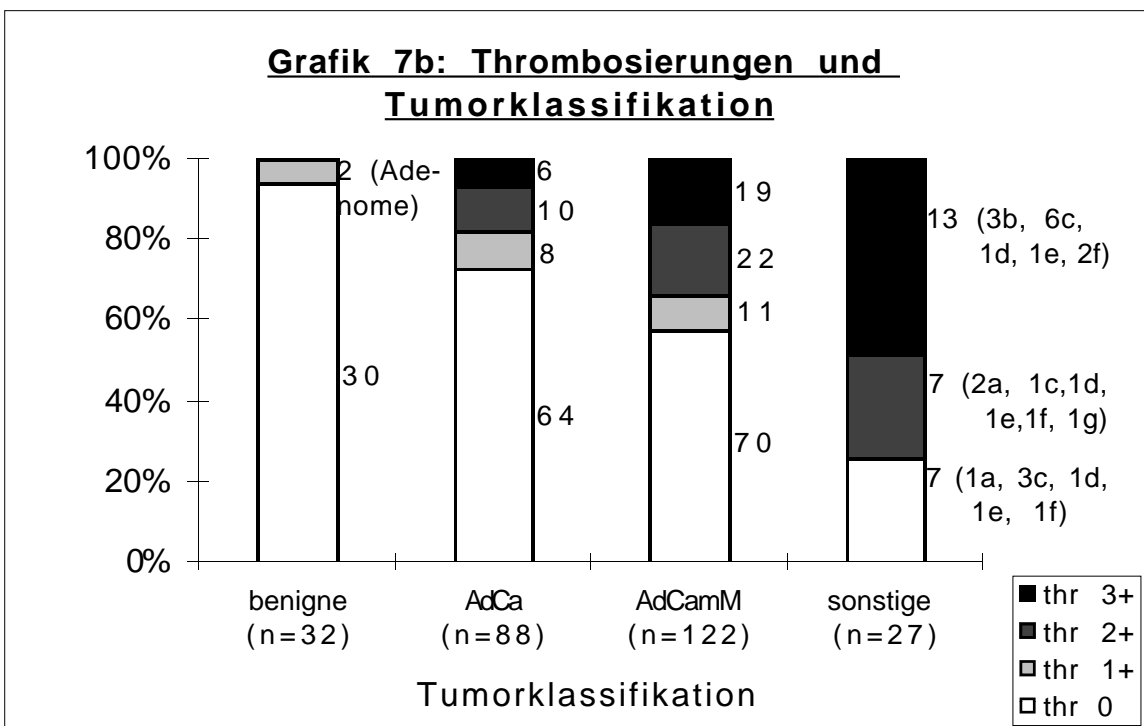
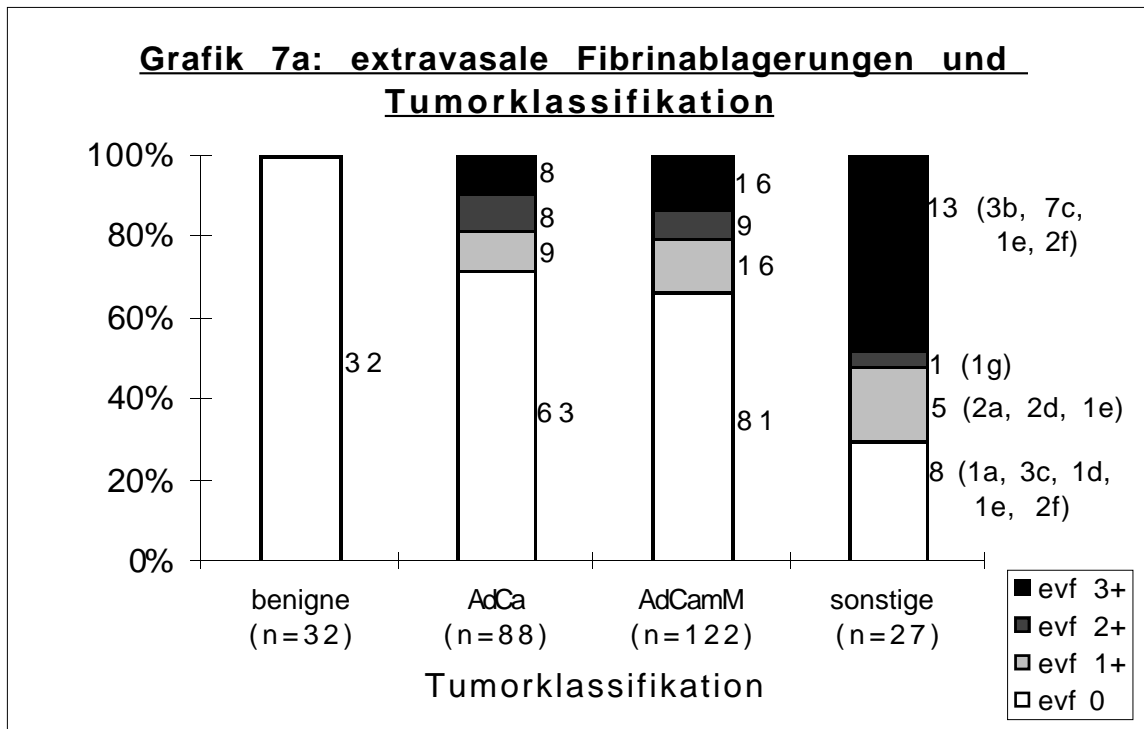
Die als maligne beurteilten Tumoren hingegen zeigen eine andere Verteilung:

Annähernd drei Viertel der Adenokarzinome weisen keine Thrombosierungen auf, knapp 7% der Fälle sind von vielen Thrombosierungen betroffen. Ein ähnliches Bild bietet die Verteilung der extravasalen Fibrinablagerungen.

Auch die Mehrzahl der Adenokarzinome mit Myoepithelhyperplasie ist frei von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen, jedoch beträgt der Anteil jeweils weniger als zwei Drittel. In je rund einem Siebtel der Adenokarzinome mit Myoepithelhyperplasie finden sich viele Thrombosierungen bzw. massive extravasale Fibrinablagerungen.

Noch häufiger sind die sonstigen Karzinome und Karzinosarkome der Mamma von extravasalen Fibrinablagerungen und Thrombosierungen betroffen. Je annähernd die Hälfte dieser Tumoren zeigt sogar viele Thrombosierungen bzw. massive extravasale Fibrinablagerungen.

Die Ergebnisse der χ^2 -Tests weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Thrombosierungs- bzw. evf-Gruppe eines Tumors und der Tumorklassifikation hin. Dies liegt vermutlich an der Verteilung der evf- und Thrombosierungsgruppen in der Gruppe der benignen Tumoren und der sonstigen Karzinome und Karzinosarkome.



Legende zu den Grafiken 7a und 7b:

a: überwiegend anaplastische(s) Karzinom(e) mit vereinzelter Alveolenbildung; b: Karzinosarkom; c: komplexe(s) Karzinom(e); d: Myoepithelkarzinom(e); e: scirrhöse(s) Karzinom(e); f: solide(s) Karzinom(e); g: solide(s) Karzinom(e) mit Myoepithelhyperplasie; AdCa: Adenokarzinome; AdCamM: Adenokarzinome mit Myoepithelhyperplasie; sonstige: sonstige Karzinome und Karzinosarkome

3.2.13.7. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren mit unterschiedlicher Punktzahl

Von den 237 malignen Mammatumoren i.e.S. werden die Wertungspunkte ermittelt. Die niedrigste ermittelte Punktzahl ist die acht, die höchste die 41. Die durchschnittliche Punktzahl aller malignen Mammatumoren i.e.S. liegt bei 22,30 Punkten. Die Adenokarzinome erreichen im Mittel 22,24 Punkte (Median: 20), die Adenokarzinome mit Myoepithelhyperplasie 21,20 Punkte (Median: 20) und die sonstigen Karzinome und Karzinosarkome 27,44 Punkte (Median: 28).

Für die Grafiken 8a und 8b (S.71) werden die malignen Tumoren nach Punktzahl in sieben Wertungsstufen eingeteilt und die Verteilung der Tumoren dieser Gruppen auf die evf- und Thrombosierungsgruppen dargestellt. Vier Tumoren erreichen eine Zahl von höchstens zehn Punkten (1,69% aller malignen Mammatumoren i.e.S.), 11-15 Punkte 32 Tumoren (13,50%), 16-20 Punkte 77 Tumoren (32, 49%), 21-25 Punkte 53 Tumoren (22,36%), 26-30 Punkte 39 Tumoren (16,46%), 31-35 Punkte 24 Tumoren (10,13%) und mehr als 35 Punkte erhalten acht Tumoren (3,38%).

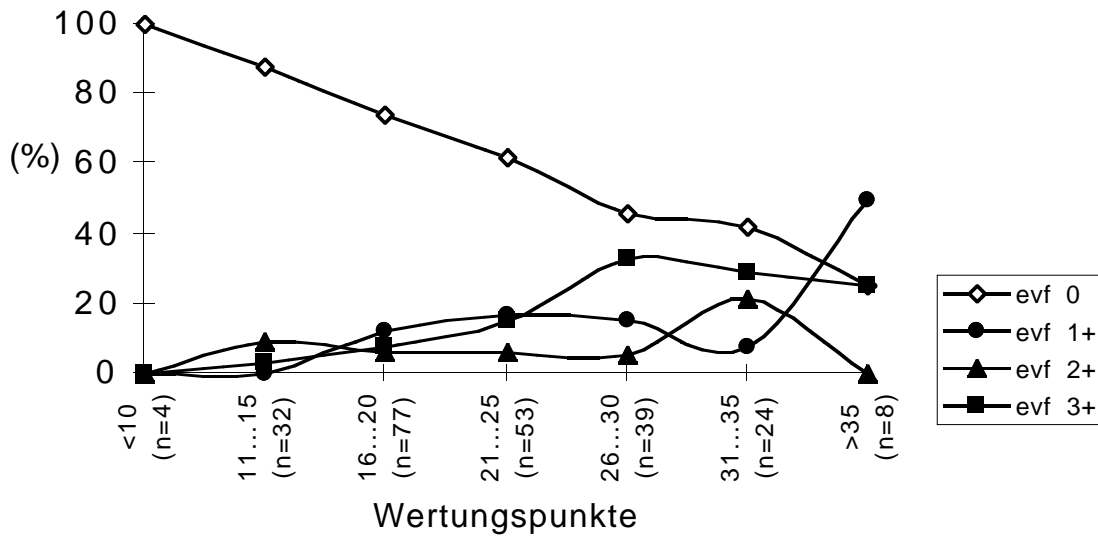
Der Anteil der Tumoren einer Wertungsstufe, die frei von Thrombosierungen sind, nimmt mit ansteigender Punktzahl je Wertungsstufe zunächst recht gleichmäßig ab. Nur in der Gruppe der Tumoren mit über 35 Punkten gibt es wieder einen Anstieg. Der Anteil der Tumoren einer Wertungsstufe, welche viele Thrombosierungen aufweisen, steigt zunächst mit zunehmender Punktzahl an und erreicht in der Gruppe der Tumoren mit 31-35 Punkten ein Maximum. Von den Tumoren mit noch höherer Punktzahl ist wiederum ein geringerer Anteil betroffen. Auffällig ist weiterhin ein starker Anstieg des Anteils der Tumoren mit vielen Thrombosierungen zwischen den Wertungsstufen der Tumoren mit höchstens bzw. mehr als 20 Punkten. Die Tumoren der Thrombosierungsgruppen 1+ und 2+ verhalten sich entsprechend.

Der Anteil der Tumoren einer Wertungsstufe, die frei von extravasalen Fibrinablagerungen sind, nimmt mit ansteigender Punktzahl kontinuierlich ab. Den größten Anteil von Tumoren mit massiven extravasalen Fibrinablagerungen hat die Wertungsstufe der Tumoren mit 26-30 Punkten.

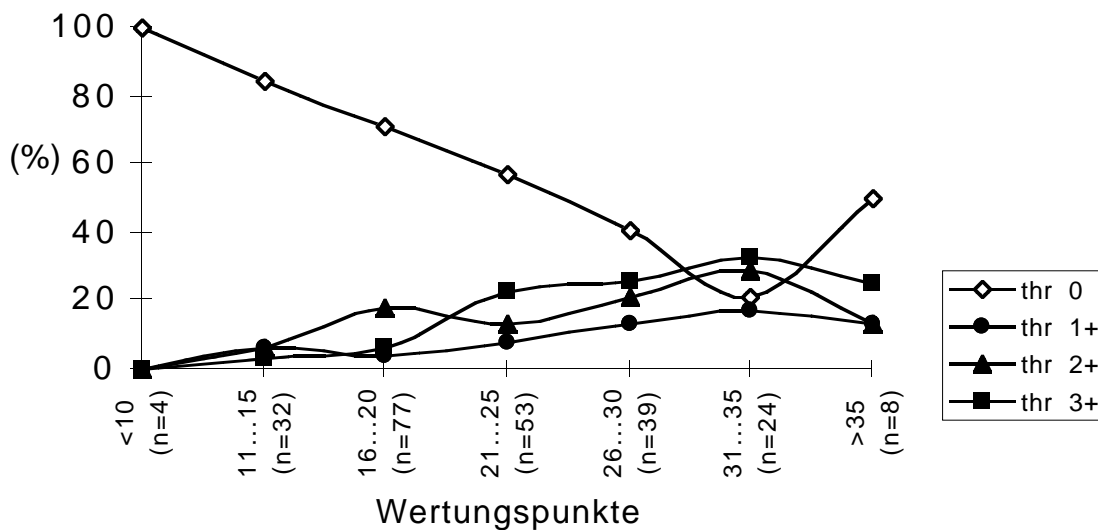
Sowohl der Tumor mit der niedrigsten, als auch der Tumor mit der höchsten Punktzahl sind frei von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen (vgl. Kapitel 8.4., S. 134ff).

Die Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests lassen einen Zusammenhang zwischen evf- bzw. Thrombosierungsgruppe und Punktzahl vermuten. Vor allem zwischen der Punktverteilung der Tumoren der Gruppen evf 0 und evf 1 bzw. thr 0 und thr 1+ besteht nach den Ergebnissen der Mann-Whitney-Tests ein deutlicher Unterschied.

Grafik 8a: extravasale Fibrinablagerungen und Wertungspunkte maligner Tumoren



Grafik 8b: Thrombosierungen und Wertungspunkte maligner Tumoren



3.2.13.8. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in ulzerierten Tumoren

Elf der untersuchten Tumoren (4,09% der Mammatumoren i.e.S.) sind ulzeriert. Zur Verteilung dieser Tumoren auf die evf- und Thrombosierungsgruppen vgl. Tabelle 12. Rund ein Drittel der ulzerierten Tumoren zeigt viele Thrombosierungen und massive extravasale Fibrinablagerungen, jedoch sind auch zwei der ulzerierten Tumoren fibrinnegativ. Nach den Ergebnissen der χ^2 -Tests besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Ulzera und der evf- bzw. Thrombosierungsgruppe der Tumoren.

Tabelle 12: Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Mammatumoren i.e.S. mit Ulzera (n=11)

		<i>Thrombosierungsgruppe</i>			
		0	1+	2+	3+
		Zahl der Tumoren (% der Tumoren mit Ulzera)			
<i>evf-Gruppe</i>	0	2 (18,18%)	-	-	-
	1+	-	-	-	-
	2+	-	-	2 (18,18%)	-
	3+	-	-	-	7 (63,64%)

3.2.13.9. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren mit eitriger Entzündung

In 22 Tumoren (8,18% der Mammatumoren i.e.S.) liegt eine massive eitrig-Entzündung vor, bei der Hälfte zugleich mit einem Ulkus. Zur Verteilung der Tumoren mit eitriger Entzündung auf die evf- und Thrombosierungsgruppen vgl. Tabelle 13. Mehr als die Hälfte dieser Tumoren zeigt viele Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen. Auch hier wird die Vermutung über einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer eitrig-Entzündung und massiven Fibrinablagerungen bzw. vielen Thrombosierungen durch die Ergebnisse der χ^2 -Tests untermauert.

Tabelle 13: Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Mammatumoren i.e.S. mit eitriger Entzündung (n=22)

		<i>Thrombosierungsgruppe</i>			
		0	1+	2+	3+
		Zahl der Tumoren (% der Tumoren mit eitriger Entzündung)			
<i>evf-Gruppe</i>	0	4 (18,18%)	1 (4,55%)	-	-
	1+	-	1 (4,55%)	-	-
	2+	-	-	2 (9,09%)	-
	3+	-	1 (4,55%)	1 (4,55%)	12 (54,55%)

3.2.13.10. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren mit fibrinpositiven Makrophagen

In zehn der untersuchten Tumoren (3,72% der Mammatumoren i.e.S.) finden sich fibrinpositive Makrophagen. Zur Verteilung dieser Tumoren auf die evf- und Thrombosierungsgruppen vgl. Tabelle 14. In der Hälfte dieser Tumoren kann sonst kein Fibrin dargestellt werden. Durch die χ^2 -Tests ist kein Zusammenhang zwischen Thrombosierungs- bzw. evf-Gruppe und dem Auftreten fibrinpositiver Makrophagen nachweisbar.

Tabelle 14: Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Mammatumoren i.e.S. mit fibrinpositiven Makrophagen (n=10)

		Thrombosierungsgruppe			
		0	1+	2+	3+
		Zahl der Tumoren (% Tumoren mit fibrinpositiven Makrophagen)			
evf- Gruppe	0	5 (50,00%)	1 (10,00%)	-	-
	1+	-	1 (10,00%)	-	1 (10,00%)
	2+	-	-	-	1 (10,00%)
	3+	-	-	-	1 (10,00%)

3.2.13.11. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren mit und ohne Angiosis carcinomatosa

Bei 15 der untersuchten Tumoren (5,58% der Mammatumoren i.e.S.) kann im H.E.-Präparat das Vorliegen einer *Angiosis carcinomatosa* diagnostiziert werden. Bei weiteren 20 (7,43%) besteht Verdacht auf *Angiosis carcinomatosa*. Nur gut ein Drittel dieser Tumoren ist völlig frei von Thrombosierungen. Zur Verteilung der Tumoren auf die evf- und Thrombosierungsgruppen vgl. Tabelle 15.

Tabelle 15: Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Mammatumoren i.e.S. und A.c. (n=35)

		Thrombosierungsgruppe				
		0	1+	2+	3+	
		Zahl der Tumoren (% der Tumoren mit A.c. bzw. Vd.)				
evf- Gruppe	0	A.c.	5 (14,29%)	1 (2,86%)	1 (2,86%)	-
		Vd.	5 (14,29%)	-	2 (5,71%)	1 (2,86%)
	1+	A.c.	2 (5,71%)	1 (2,86%)	1 (2,86%)	-
		Vd.	1 (2,86%)	1 (2,86%)	1 (2,86%)	-
	2+	A.c.	-	2 (5,71%)	1 (2,86%)	-
		Vd.	-	1 (2,86%)	2 (5,71%)	-
	3+	A.c.	-	-	1 (2,86%)	-
		Vd.	-	1 (2,86%)	-	5 (14,29%)

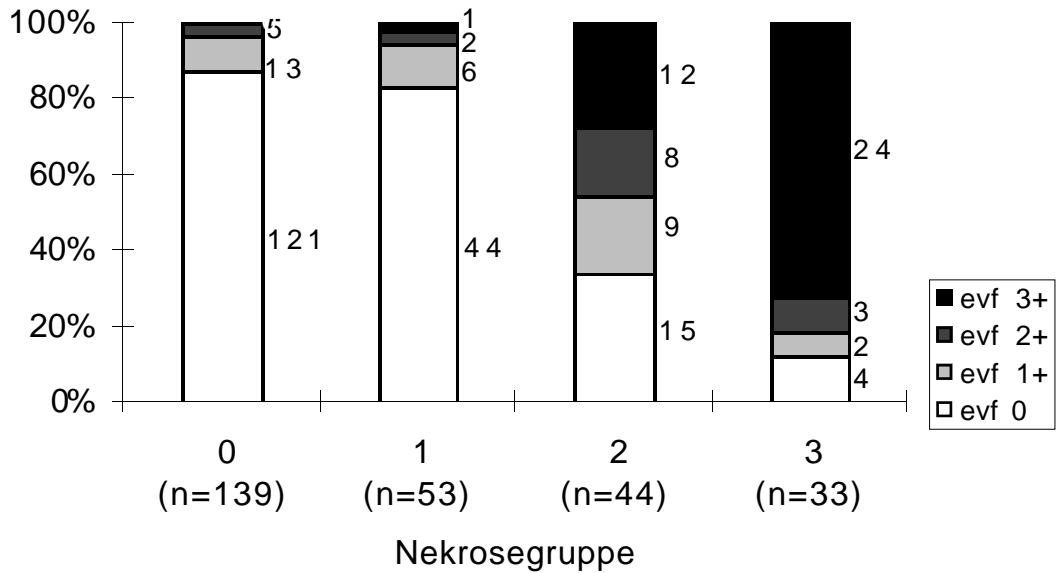
A.c.=*Angiosis carcinomatosa*; Vd.=Verdacht auf A.c.

Faßt man für den χ^2 -Test die Tumoren mit Verdacht auf und die mit sicherer *Angiosis carcinomatosa* zusammen und stellt diese Gruppe der Gruppe der übrigen Tumoren gegenüber, so kann ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Vorliegen oder dem Verdacht auf *Angiosis carcinomatosa* einerseits und der evf- bzw. Thrombosierungsgruppe eines Tumors andererseits festgestellt werden. Tumoren ohne Hinweis auf *Angiosis carcinomatosa* sind vergleichsweise seltener von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen betroffen.

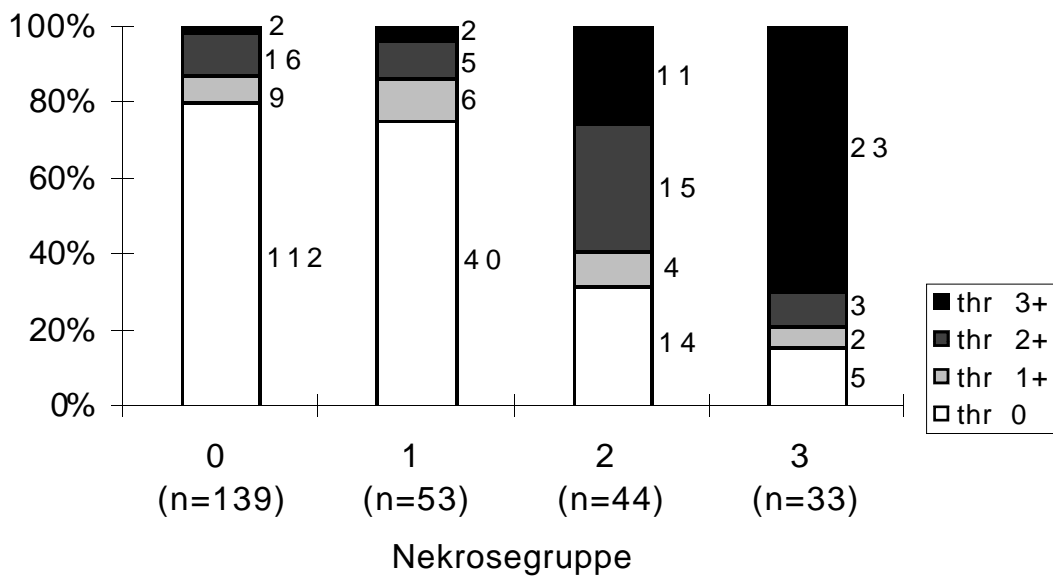
3.2.13.12. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren mit und ohne Nekrosen

In 139 Tumoren (51,67% aller Mammatumoren i.e.S.) finden sich keinerlei Nekrosen. Der Nekrosegruppe 1 können 53 Tumoren (19,70% aller Mammatumoren i.e.S.) zugeordnet werden, der Nekrosegruppe 2 gehören 44 Tumoren (16,36%) an, und zu Nekrosegruppe 3 zählen 33 Tumoren (12,27%). Zur Verteilung der Tumoren auf die evf- und Thrombosierungsgruppen vgl. die Grafiken 9a und 9b (S. 75). Die weit überwiegende Mehrzahl der Tumoren ohne oder mit nur geringgradigen Nekrosen ist frei von Thrombosierungen oder extravasalen Fibrinablagerungen. Bei den Tumoren mit mäßigen Nekrosen ist nur je rund ein Drittel und bei den Tumoren mit massiven Nekrosen sogar nur je rund ein Siebtel frei von Thrombosierungen oder extravasalen Fibrinablagerungen. Das umgekehrte Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Tumoren mit vielen Thrombosierungen. Während sich weniger als 4% der Tumoren ohne oder mit geringgradigen Nekrosen in dieser Gruppe befinden, sind es von den Tumoren mit mäßigen Nekrosen ein Viertel und bei den Tumoren mit massiven Nekrosen über zwei Drittel. Betrachtet man die Tumoren der Gruppe evf 3+, so ergibt sich ein noch ausgeprägteres Bild. Der Eindruck, daß eine höhere Thrombosierungs- bzw. evf-Gruppe mit einem höheren Nekrosegrad einhergeht, wird durch die Ergebnisse der χ^2 -Tests unterstützt.

Grafik 9a: extravasale Fibrinablagerungen und Nekrose



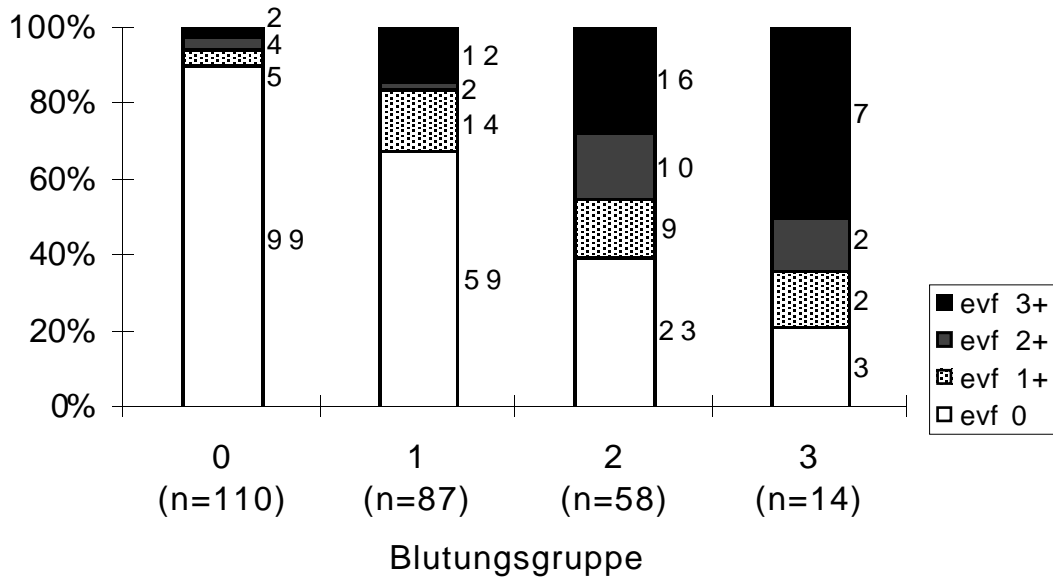
Grafik 9b: Thrombosierungen und Nekrose



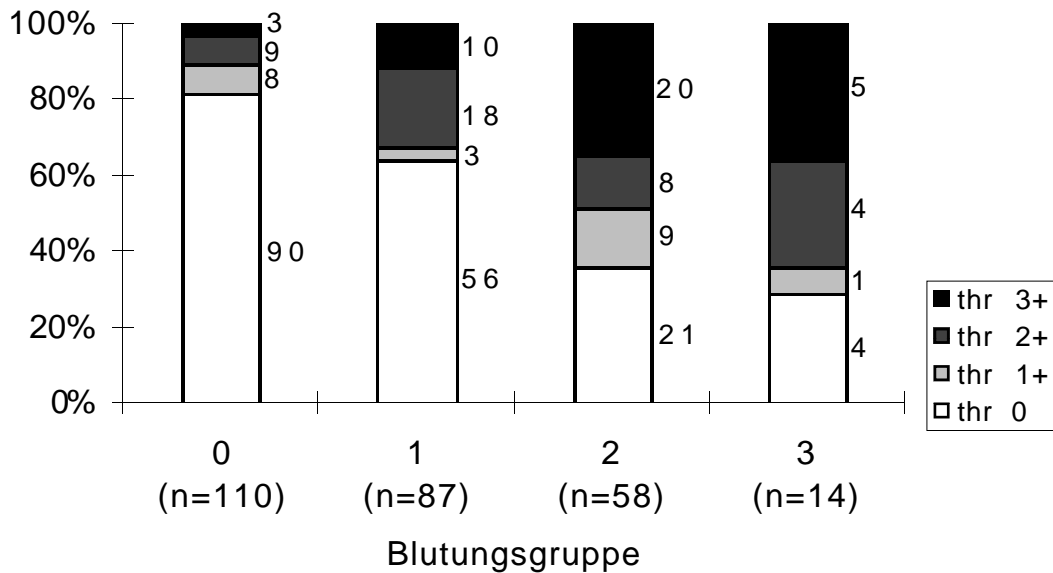
3.2.13.13. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren mit und ohne Blutungen

In 110 Tumoren (40,89% aller Mammatumoren i.e.S.) finden sich keinerlei Blutungen. Der Blutungsgruppe 1 gehören 87 Tumoren (32,34%) an, in Blutungsgruppe 2 finden sich 58 Tumoren (21,56%), und in der Blutungsgruppe 3 finden sich 14 Tumoren (5,20%). Zur Verteilung der Tumoren auf die evf- und Thrombosierungsgruppen vgl. die Grafiken 10a und 10b (S. 77). Tumoren, in denen keine Blutungen festgestellt werden können, sind weitaus häufiger frei von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen als solche mit Blutungen. Je stärker diese sind, umso häufiger weisen die Tumoren auch Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen auf. Besonders deutlich ist dies bei Betrachtung der extravasalen Fibrinablagerungen. Frei von extravasalen Fibrinablagerungen sind über 90% der Tumoren ohne Blutungen und nur gut 20% der Tumoren mit starken Blutungen. Massive extravasale Fibrinablagerungen sind in weniger als einem Prozent der blutungsfreien Tumoren zu finden, während die Hälfte der Tumoren mit massiven Blutungen davon betroffen ist. Auch die Ergebnisse der χ^2 -Tests weisen auf einen entsprechenden Zusammenhang zwischen Thrombosierungs- bzw. evf-Gruppe und Blutungsgruppe hin.

Grafik 10a: extravasale Fibrinablagerungen und Blutung



Grafik 10b: Thrombosierungen und Blutung



3.2.13.14. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren unterschiedlicher Gefäßdichte

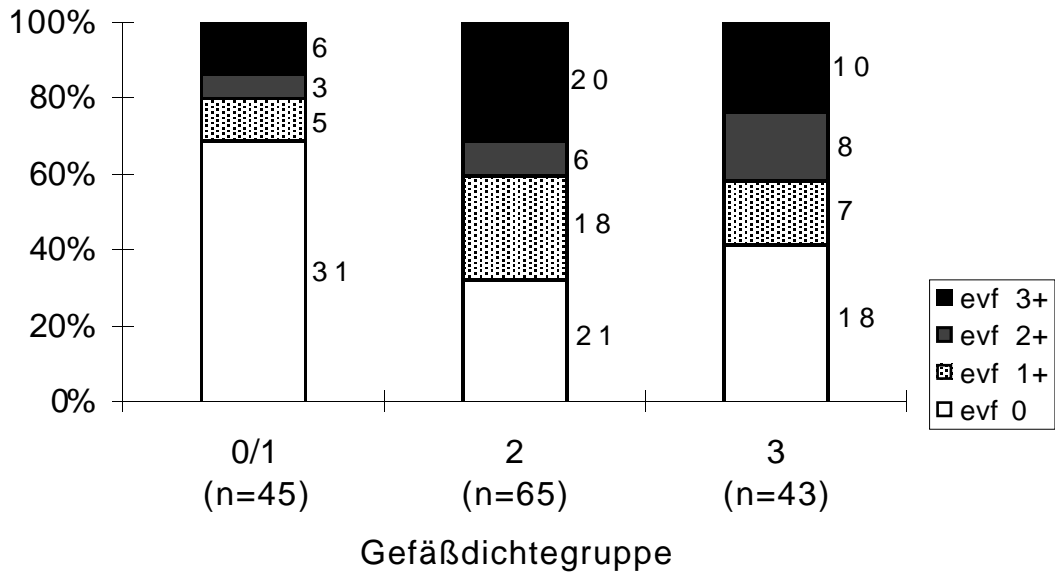
Bei 156 Tumoren (57,99% der Mammatumoren i.e.S.) werden Gefäßdarstellungen mit AK vWF durchgeführt. Bei 153 Tumoren (56,88%) wird die Gefäßdichte beurteilt. Ein Tumor gehört der Gefäßdichtegruppe 0 an (0,65% der Tumoren, bekannter Gefäßdichte), 44 der Gefäßdichtegruppe 1 (28,76%), 65 der Gefäßdichtegruppe 2 (42,48%) und 43 der Gefäßdichtegruppe 3 (28,10%).

Von 116 Tumoren (43,12% der Mammatumoren i.e.S.) liegen keine Angaben zur Gefäßdichte vor: bei 113 fibrinnegativen Tumoren (68,90% aller fibrinnegativen Mammatumoren i.e.S.) wird keine Gefäßdarstellung vorgenommen, im Falle von drei fibrinpositiven Tumoren (2,86% aller Tumoren mit mindestens einer Thrombosierung oder mindestens einer extravasalen Fibrinablagerung) kann der Schnitt der Doppelmarkierung wegen technischer Mängel nicht ausgewertet werden. Es handelt sich um je einen Tumor der Gruppen thr 2+ / evf 0, thr 2+ / evf 2+ und thr 3+ / evf 3+.

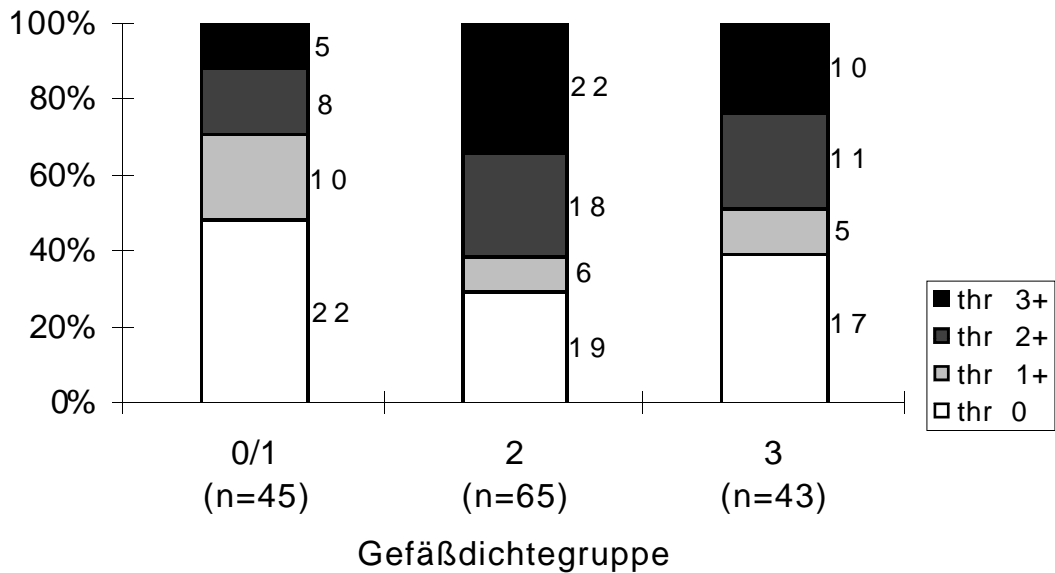
Die Verteilung der Tumoren auf die evf- und Thrombosierungsgruppen ist in den Grafiken 11a und 11b (S. 79) dargestellt. Gering vaskularisierte Tumoren sind seltener von massiven Fibrinablagerungen und mehreren Thrombosierungen betroffen als mäßig oder stark vaskularisierte. Besonders auffällig ist, daß viele der Tumoren der Gruppe evf 0 der Gefäßdichtegruppe 1 angehören.

Die χ^2 -Tests lassen einen Zusammenhang zwischen der evf-Gruppe eines Tumors und seiner Gefäßdichtegruppe vermuten, nicht jedoch zwischen der Thrombosierungsgruppe und der Gefäßdichtegruppe eines Tumors.

Grafik 11a: extravasale Fibrinablagerungen und Gefäßdichte



Grafik 11b: Thrombosierungen und Gefäßdichte



3.2.13.15. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren und Status des/der ipsilateralen Inguinallymphknoten(s)

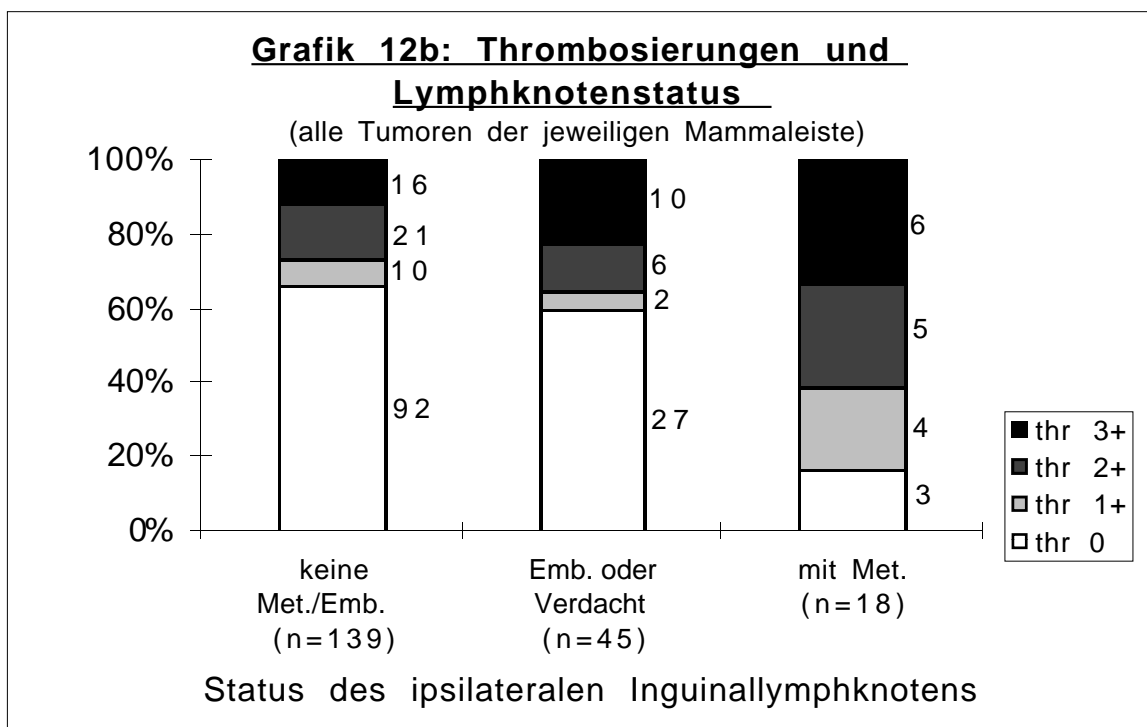
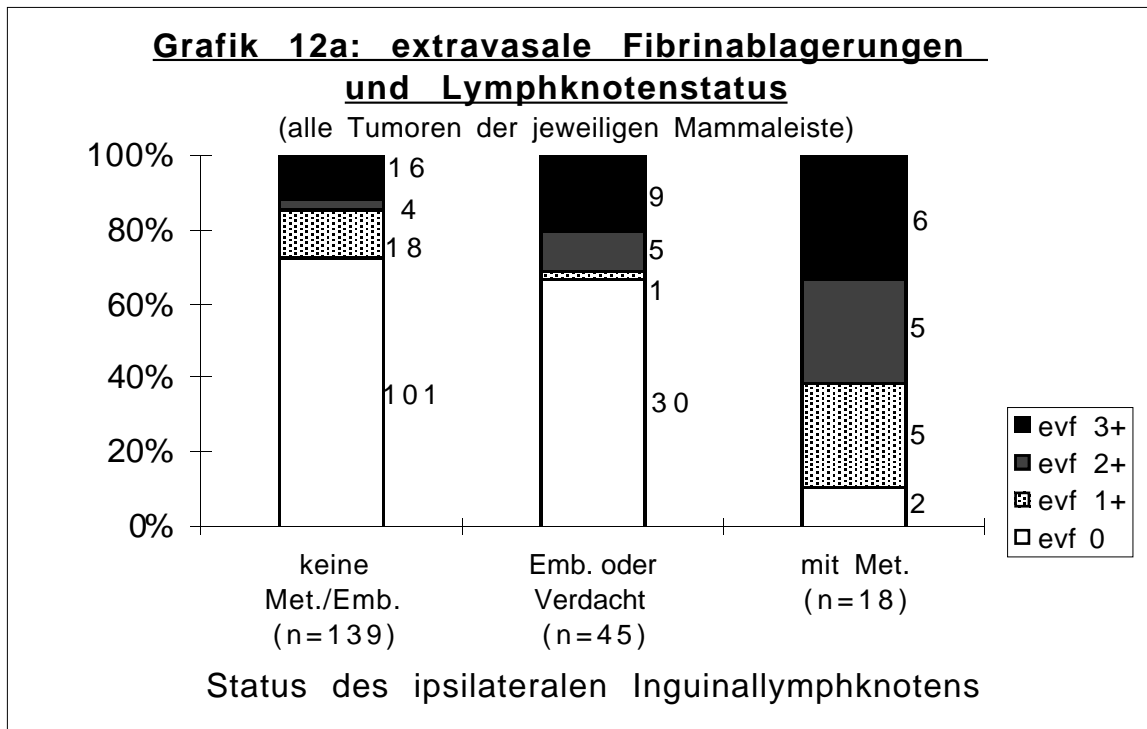
Von 81 Mammaleisten, in welchen maligne Mammatumoren i.e.S. auftraten, liegen die zugehörigen Inguinallymphknoten vor. Aus diesen Leisten stammen 202 maligne Mammatumoren i.e.S. In den Grafiken 12a und 12b (S. 81) ist der Zusammenhang zwischen dem Status des ipsilateralen Inguinallymphknotens und der evf- bzw. Thrombosierungsgruppe der Tumoren dargestellt. Tumoren aus Leisten, deren ipsilateraler Inguinallymphknoten von Metastasen befallen ist, zeigen weitaus häufiger Thrombosierungen oder extravasale Fibrinablagerungen als Tumoren aus Leisten, deren ipsilateraler Inguinallymphknoten frei von Metastasen oder Tumorzellemboli ist. Tumoren aus Leisten, bei denen im ipsilateralen Inguinallymphknoten Tumorzellemboli vorhanden sind oder der Verdacht hierauf besteht, nehmen eine Zwischenstellung ein. Die Vermutung eines entsprechenden Zusammenhangs zwischen Lymphknotenstatus und evf- bzw. Thrombosierungsgruppe wird durch die Ergebnisse der χ^2 -Tests gestützt.

In Tabelle 16 wird je Leiste nur der Tumor mit der jeweils höchsten Wertung für Thrombosierungen bzw. extravasale Fibrinablagerungen aufgenommen. Es fällt auf, daß Leisten, deren zugehörige Lymphknoten Metastasen aufweisen, in keinem Fall nur fibrinnegative Tumoren beherbergen. Auch hier deuten die Ergebnisse der χ^2 -Tests auf einen Zusammenhang hin.

Tabelle 16: Lymphknotenstatus und Thrombosierungen bzw. extravasale Fibrinablagerungen im jeweils am stärksten fibrinpositiven Mammatumor i.e.S. der zugehörigen Milchleiste (n=81)

Lymphknotenstatus der Milchleiste	höchste thr-Gruppe aller Tumoren der Leiste				höchste evf-Gruppe aller Tumoren der Leiste			
	0	1+	2+	3+	0	1+	2+	3+
	Zahl der Leisten, % der Leisten mit diesem Status							
keine Met./ Emb.	27 47,37%	6 10,53%	14 24,56%	10 17,54%	32 56,14%	9 15,79%	3 5,26%	13 22,80%
Emb. oder Verdacht	7 43,75%	2 12,50%	1 6,25%	6 37,50%	7 43,75%	-	3 18,75%	6 37,25%
mit Met.	-	1 12,50%	4 50,00%	3 37,50%	-	1 12,50%	4 50,00%	3 37,50%

Met.= Metastase(n); Emb.= Tumorzellemboli

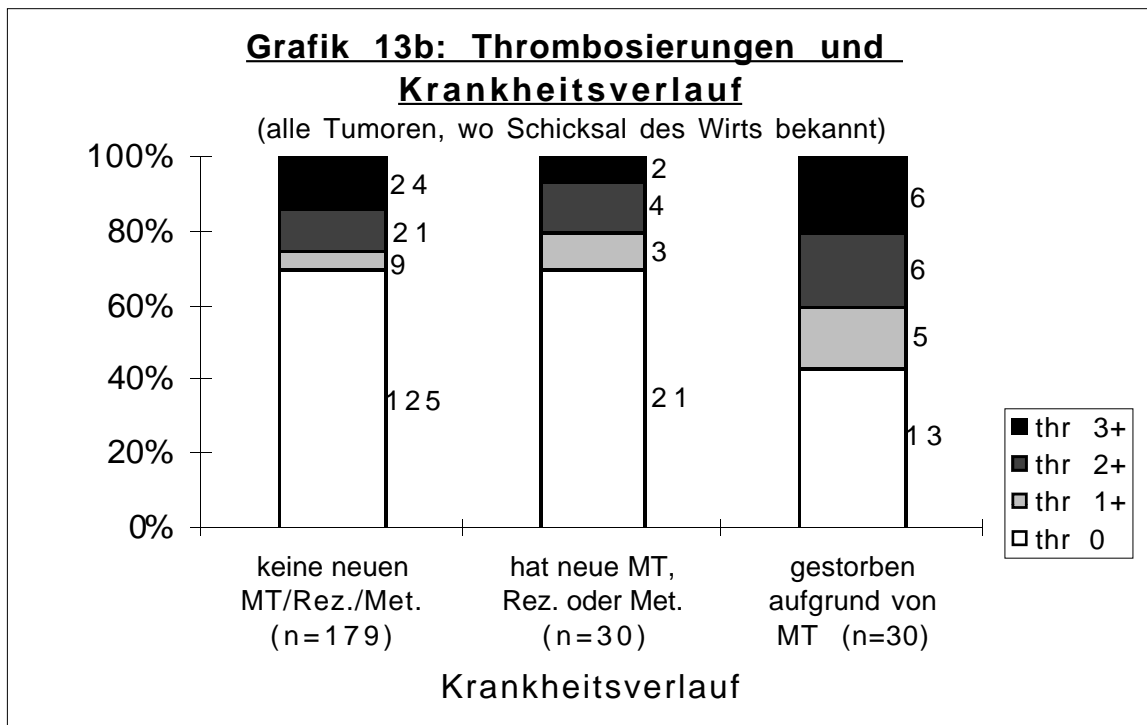
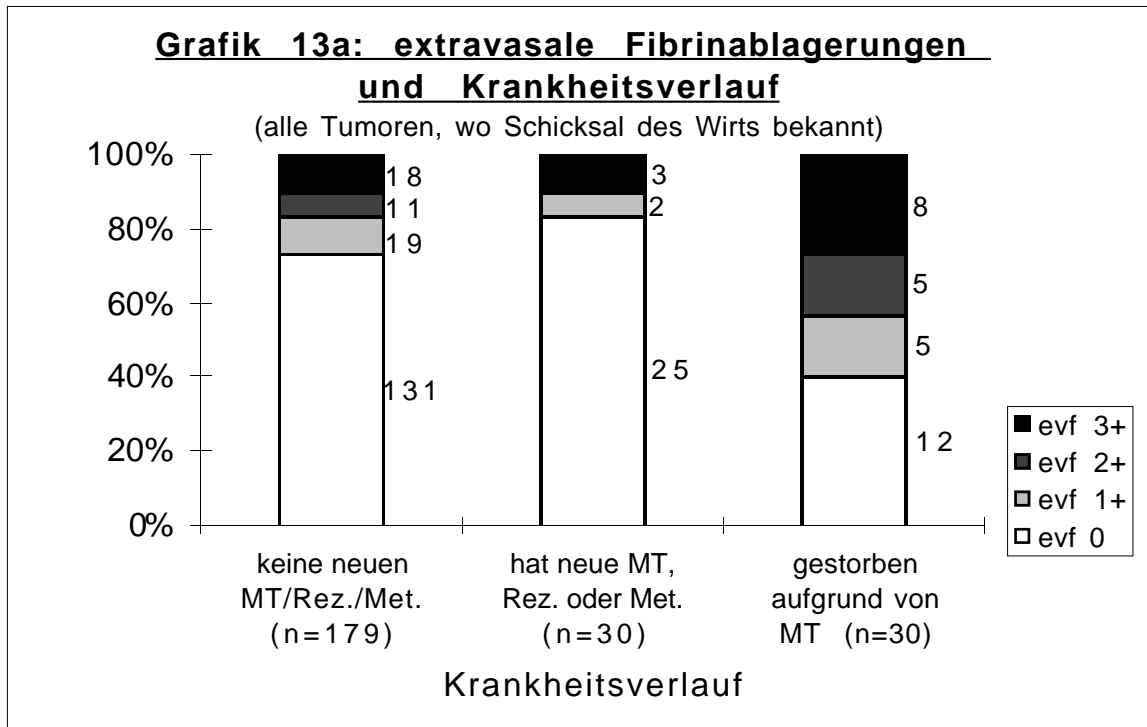


Legende zu den Grafiken 12a und 12b:
Emb.: Tumorzellemboli; Met.: Metastase(n)

3.2.13.16. Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren und Krankheitsverlauf

Der Krankheitsverlauf ist bei 69 Hunden komplett bekannt (vgl. Kapitel 3.2.2., S. 39). Bei sieben dieser Tiere liegen allerdings keine Daten über den Fibrinnachweis im vermutlich bösartigsten Tumor vor, bzw. ist der bösartigste Tumor ein Mammatumor i.w.S., so daß die vermutlichen Zusammenhänge zwischen dem bösartigsten Mammatumor i.e.S. und dem Krankheitsverlauf bei 62 Tieren (78,48% aller Tiere mit Mammatumoren i.e.S.) ermittelt werden können.

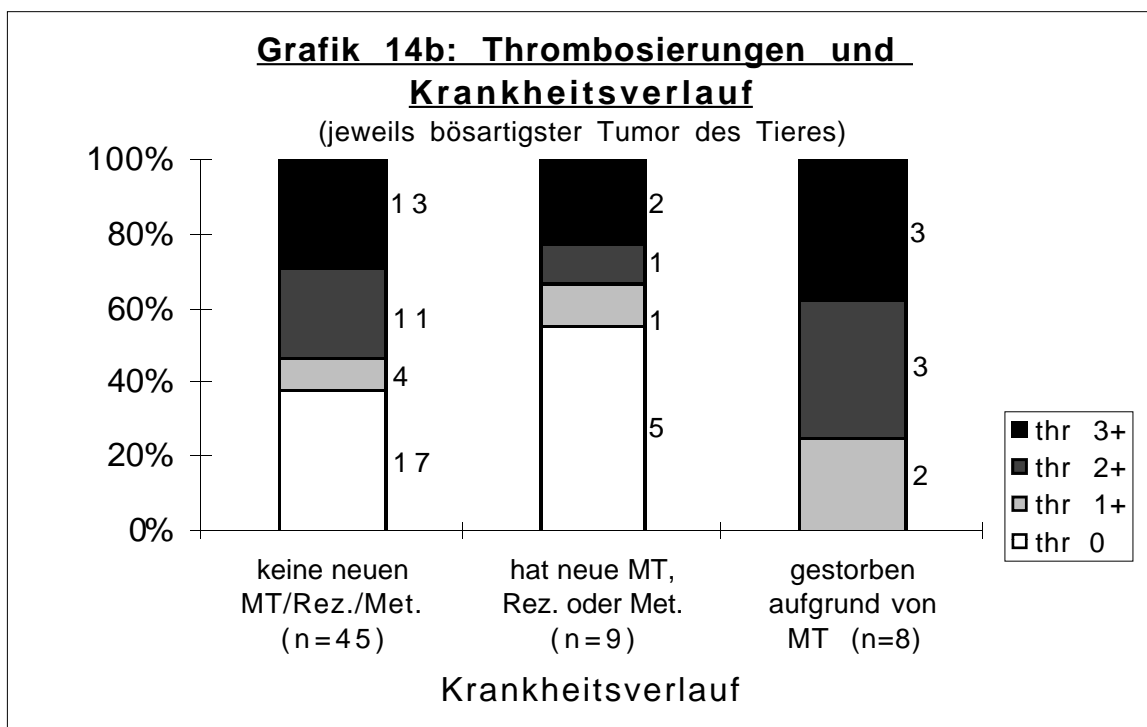
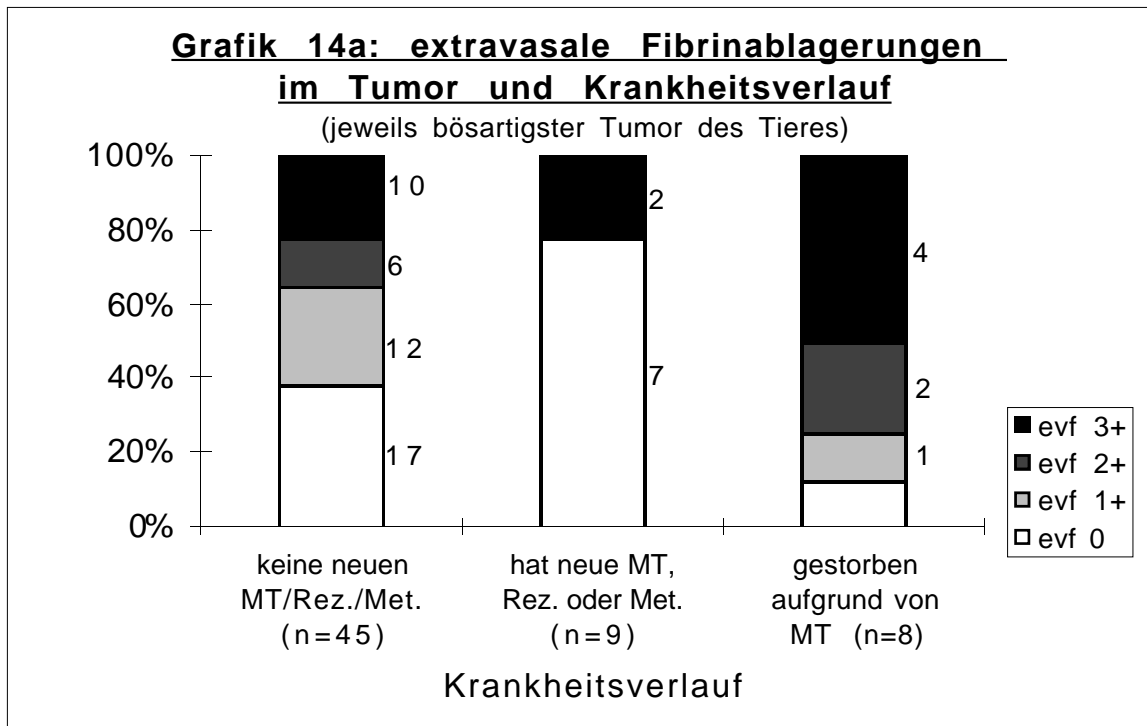
Von den Tieren, deren Schicksal bekannt ist, stammen 239 Mammatumoren i.e.S. (88,85% aller Mammatumoren i.e.S.). Tumoren von Tieren, die an der Mammatumorerkrankung verstorben sind bzw. ihretwegen getötet wurden, sind im Vergleich zu den übrigen Tieren seltener frei von extravasalen Fibrinablagerungen und Thrombosierungen (vgl. Grafiken 13a und 13b, S. 83). Der Verdacht auf einen entsprechenden Zusammenhang von evf-Gruppe und Krankheitsverlauf wird durch den χ^2 -Test bestätigt.



Legende zu den Grafiken 13a und 13b:

Met.: Metastase(n); MT: Mammatumor(en); Rez.: Rezidiv(e)

In den Grafiken 14a und 14b (S. 85) ist dargestellt, in welche evf- und Thrombosierungsgruppe der jeweils bösartigste Mammatumor i.e.S. der Hunde (laut Punktwertung) mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf eingeordnet wird. Es fällt auf, daß bei den Tieren, die wegen der Mammatumorerkrankung verstorben sind oder getötet wurden, weitaus häufiger Thrombosierungen in den jeweils bösartigsten Tumoren auftreten als bei Tieren, deren Krankheitsverlauf weniger dramatisch war. Zwischen den Ergebnissen aller Tumoren der Tiere mit oder ohne Rezidive oder Fernmetastasen besteht nur ein geringer Unterschied. Die bösartigsten Tumoren der Tiere, welche in der Folgezeit keine neuen Mammatumoren, Rezidive oder Metastasen ausgebildet haben, sind häufiger und massiver von Thrombosierungen betroffen als die der Tiere, die neue Mammatumoren, Fernmetastasen oder Rezidive entwickelten. Auch extravasale Fibrinablagerungen, besonders in großem Ausmaße, sind im jeweils bösartigsten Tumor weitaus häufiger bei den Tieren anzutreffen, welche wegen der Mammatumorerkrankung verstorben sind oder getötet wurden als bei den übrigen. Tumoren von Tieren, welche in der Folgezeit keine neuen Mammatumoren, Rezidive oder Metastasen ausgebildet haben, sind stets häufiger von extravasalen Fibrinablagerungen betroffen als die von Tieren mit neuen Mammatumoren, Fernmetastasen oder Rezidiven. Statistisch ist allerdings kein Zusammenhang nachweisbar. Dies ist auch der Fall, wenn statt des bösartigsten Tumors jeden Tieres der mit der höchsten Wertung für extravasale Fibrinablagerungen bzw. Thrombosierungen betrachtet wird.



Legende zu den Grafiken 14a und 14b:

Met.: Metastase(n); MT: Mammatumor(en); Rez.: Rezidiv(e)

3.2.13.17. Thrombosierungen, Nekrose und Gefäßdichte in Tumoren

In Tabelle 17 ist dargestellt, in welcher Thrombosierungsgruppe sich die Tumoren unterschiedlicher Vaskularisation und unterschiedlicher Nekrosegruppen befinden. Unabhängig von ihrem Vaskularisationsgrad weisen Tumoren mit massiven Nekrosen in der weit überwiegenden Zahl der Fälle viele Thrombosierungen auf. Tumoren ohne Nekrosen oder mit höchstens einer kleinen Gruppe nekrotischer Zellen hingegen sind, unabhängig vom Vaskularisationsgrad, häufig frei von Thrombosierungen.

Tabelle 17:

Thrombosierungsgruppe, Nekrose und Gefäßdichte in Mammatumoren i.e.S. (n=153)

		<i>Thrombosierungsgruppe</i>				
		0	1+	2+	3+	
		Zahl der Tumoren				
		(% der Tumoren dieser Nekrose- und Gefäßdichtegruppe)				
<i>Nekrose- gruppe</i>	0	Gd 0/1 (n=30)	20 (66,67%)	7 (23,33%)	3 (10,00%)	-
		Gd 2 (n=21)	9 (42,86%)	1 (4,76%)	9 (42,86%)	2 (9,52%)
		Gd 3 (n=12)	7 (58,33%)	1 (8,33%)	4 (33,33%)	-
	1	Gd 1 (n=3)	2 (66,67%)	-	1 (33,33%)	-
		Gd 2 (n=13)	7 (53,85%)	4 (30,77%)	1 (7,69%)	1 (7,69%)
		Gd 3 (n=12)	6 (50,00%)	2 (16,67%)	3 (25,00%)	1 (8,33%)
	2	Gd 1 (n=7)	-	2 (28,57%)	3 (42,86%)	2 (28,57%)
		Gd 2 (n=16)	2 (12,50%)	1 (6,25%)	7 (43,75%)	6 (37,50%)
		Gd 3 (n=10)	3 (30,00%)	1 (10,00%)	3 (30,00%)	3 (30,00%)
	3	Gd 1 (n=5)	-	1 (20,00%)	1 (20,00%)	3 (60,00%)
		Gd 2 (n=15)	1 (6,67%)	-	1 (6,67%)	13 (86,67%)
		Gd 3 (n=9)	1 (11,11%)	1 (11,11%)	1 (11,11%)	6 (66,66%)

Gd=Gefäßdichtegruppe

3.2.14. Weitere Zusammenhänge einiger Merkmale von Mammatumoren i.e.S.

3.2.14.1. Zusammenhang zwischen Tumornekrose und Tumorgröße

Große Tumoren zeigen weitaus häufiger massive Nekrosen als kleine. Auch der Kruskall-Wallis-Test weist auf einen entsprechenden Zusammenhang hin.

3.2.14.2. Zusammenhang zwischen Tumornekrose und Gefäßdichte

Gering vaskularisierte Tumoren sind weitaus häufiger frei von Nekrosen als besser versorgte Tumoren. Umgekehrt weisen die gut vaskularisierten Tumoren fast doppelt so häufig massive Nekrosen auf wie die gering vaskularisierten (vgl. Tabelle 18). Der Verdacht auf einen Zusammenhang zwischen schlechter Vaskularisation und Nekrosefreiheit wird durch die Ergebnisse des χ^2 -Tests gestützt.

Tabelle 18: Gefäßdichte und Nekrose in Mammatumoren i.e.S. (n=153)

		Gefäßdichtegruppe		
		0 oder 1	2	3
		Zahl der Tumoren (% der Tumoren dieser Gefäßdichtegruppe)		
Nekrose- gruppe	0	30 (66,66%)	21 (32,31%)	12 (27,91%)
	1	3 (6,67%)	13 (20,00%)	12 (27,91%)
	2	7 (15,56%)	16 (24,62%)	10 (23,26%)
	3	5 (11,11%)	15 (23,08%)	9 (20,93%)

3.2.14.3. Zusammenhang zwischen dem Alter des Tieres und Tumornekrose bzw. -punktzahl

Tumoren von älteren Tieren sind offensichtlich häufiger von Nekrosen betroffen als die von jüngeren Tieren. Tumoren der Nekrosegruppe 0 stammen von Tieren, deren durchschnittliches Alter zum Zeitpunkt der Tumorentnahme bei 9,44 Jahren lag, bei Tumoren der Nekrosegruppe 3 hingegen bei 10,85 Jahren. Ähnliches gilt für die Wertungspunkte. Tumoren, welche mit weniger als 16 Punkten bewertet werden, stammen von Tieren, die zum Zeitpunkt der Tumorentnahme durchschnittlich 9,09 Jahre alt waren, bei Tumoren mit über 25 Punkten sind es gut 18 Monate mehr.