

## **4. DISKUSSION**

### **4.1. Material und Methoden**

#### **4.1.1. Art der vorliegenden Studie**

In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig das Vorhandensein und die eventuelle Bedeutung von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen in Mammatumoren von Hunden untersucht. Dies und das Studiendesign, insbesondere die Patientenzahl und -auswahl, kennzeichnen diese Arbeit als Pilotstudie. Nach MCGUIRE (1991) sollen die Ergebnisse dieser Arbeit deshalb Tendenzen aufzeigen und richtungsweisend für weitere Studien sein, sie lassen aber keine definitiven Aussagen über eventuelle Zusammenhänge zwischen dem Auftreten bestimmter Tumormerkmale untereinander oder diesen Merkmalen und der Prognose zu.

Auch die statistischen Tests können allenfalls Hinweise liefern, ob zwischen zwei Merkmalen ein Zusammenhang besteht, nicht jedoch, ob ein Merkmal eines Tumors an der Ausbildung eines anderen ursächlich beteiligt ist oder es beeinflusst. Da keine repräsentative Stichprobe erhoben und eine Vielzahl verschiedener Parameter verglichen wird, sind die Ergebnisse nicht ohne weiteres zu verallgemeinern.

#### **4.1.2. Untersuchungsgut**

In der vorliegenden Arbeit sind nach Mischlingshunden Tiere der Rassen Teckel, Terrier und Deutscher Schäferhund besonders häufig vertreten. Je zwei dieser Rassen sind auch in den Studien von SIMON *et al.* (1996), GUTBERLET (1994) und KURZMAN und GILBERTSON (1986) unter den drei am häufigsten betroffenen Rassen zu finden. Dennoch kann hieraus nicht auf das Vorliegen einer Rassendisposition geschlossen werden, da eine Feststellung derselben die Kenntnis der Rassenverteilung in der Gesamtpopulation erfordert. Selbst bei Kenntnis dieser Verteilung könnte eine Interpretation fehlerhaft sein, da die Auswahl der Tiere nicht rein zufällig erfolgte, sondern es sich fast ausschliesslich um Patienten derselben Klinik handelte. Entsprechendes gilt für Aussagen über die eventuellen Auswirkungen einer Kastration auf das Risiko einer Mammatumorerkrankung. Daß im Patientengut kein Rüde vertreten ist, überrascht nicht (SCHNEIDER 1970).

Das Durchschnittsalter der Hunde bei ihrer ersten Mammatumoroperation liegt mit 9,34 Jahren etwas niedriger als in den Arbeiten von FIDLER und BRODEY (1967), GUTBERLET (1994) und SIMON *et al.* (1996), auch die Verteilung auf die Altersgruppen mit einer Häufung von Tieren im Alter von acht bis zehn Jahren ist im Vergleich mit diesen Studien leicht nach links verschoben. Dies ist vermutlich darin begründet, daß die erstgenannte Arbeit auf Sektionsfällen basiert, und das Alter beim Todeszeitpunkt zugrunde gelegt wird. In den anderen Studien wurde nicht erhoben, ob den Tieren bereits vor Aufnahme in die jeweilige Studie Mammatumoren entfernt worden sind. Das festgestellte Alter entspricht also eventuell auch hier nicht dem Alter des Tieres bei der ersten Mammatumoroperation.

### **4.1.3. Überwachungszeitraum und Krankheitsverlauf**

In der Regel beträgt die postoperative Beobachtung nach Mammektomien aufgrund von Neoplasien beim Hund zwei Jahre (BOSTOCK 1975, GILBERTSON *et al.* 1983). Die Begründung für diesen Zeitraum, daß die meisten Hunde, welche der Mammatumorerkrankung erlügen, innerhalb des ersten Jahres *post operationem* stürben (BOSTOCK 1975, FANTON 1981), kann jedoch nicht ohne weiteres bestätigt werden. Dies ist in dieser Arbeit bei nur drei von acht Tieren der Fall, weitere drei hingegen überlebten mehr als zwei Jahre, zwei davon sogar vier bzw. acht Jahre. Allerdings muß bedacht werden, daß in der vorliegenden Studie die Mehrzahl dieser Tiere mehrfach operiert worden ist. Betrachtet man die Überlebenszeiten nach der letzten bzw. einzigen Operation, decken sich diese durchaus mit den Ergebnissen der genannten Untersucher. Es kann jedoch nicht geklärt werden, welcher der Tumoren letztlich den Krankheitsverlauf bestimmt hat. So können auswertbare Ergebnisse zwar durchaus eher als in entsprechenden Studien der Humanmedizin gewonnen werden (BOSTOCK 1975), eine zweijährige postoperative Überwachung erscheint jedoch zu kurz bemessen.

Die postoperative Überwachung wurde bei einem Teil der Tiere dieser Studie sogar bereits nach weniger als zwei Jahren beendet. Die Ergebnisse zum Krankheitsverlauf der Tiere können also nur mit größter Zurückhaltung beurteilt werden.

### **4.1.4. Darstellung von extravasalen Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in Gewebsschnitten von Hunden**

#### *4.1.4.1. histologische Färbetechniken*

Da die Anfärbbarkeit von Gewebestrukturen und Fibrin mittels histologischer Färbetechniken auf elektrostatischen Phänomenen und der Molekülgröße von Farbstoff und Gewebestruktur beruhen (BÖCK 1989, LENDRUM *et al.* 1962), können diese Methoden im Gegensatz zu den immunhistochemischen Methoden problemlos an Geweben verschiedener Tierarten eingesetzt werden. Die Ergebnisse der Färbungen nach LADEWIG (1938), GARVEY *et al.* (1987) und SHOOBRIDGE (1983) entsprechen den Ergebnissen, welche von den entsprechenden Autoren für die Anfärbung von Geweben von Menschen beschrieben wurden. Die Färbung nach PUSEY und EDWARDS (1978) ist durch die dunkle Anfärbung des gesamten Gewebes kaum interpretierbar.

Alle untersuchten histologischen Färbemethoden stellen Fibrin sowohl intra- als auch extravaskulär dar. Jedoch ist gerade bei kleinen Fibrinmengen und extravaskulären Fibrinablagerungen die Interpretation der Färbung schwierig, zeitaufwendig und nicht immer eindeutig, da sich teilweise auch andere Anteile des Bindegewebes in ähnlichen Farbtönen darstellen, wie von LENDRUM *et al.* (1962) und SHOOBRIDGE (1983) beschrieben. Dies gilt insbesondere für die Färbemethoden, bei denen die Farbstoffe sukzedan eingesetzt werden. Eine verlässliche Aussage über das Vorhandensein extravasalen Fibrins wird bei den histologischen Färbungen auch dadurch verhindert, daß dessen Lage nicht vorhersehbar ist, und somit nicht alle von BÖCK (1989) geforderten Kriterien zur Interpretation histologischer Färbungen erfüllt sind.

Bei den Färbungen nach GARVEY *et al.* (1987) und nach PUSEY und EDWARDS (1978) ist kaum ein farblicher Unterschied von Fibrin zu anderen Gewebestandteilen vorhanden. Durch eine Färbung des Gewebes nach SHOOBRIDGE (1983) kommt es bei Verwendung eines Primers zu einer kontrastreichen Gewebedarstellung. Ein optimales Ergebnis wird dann erzielt, wenn die Einstelldauer in den Primer deutlich kürzer gewählt wird als in der Färbearbeitung vorgeschlagen. Die Zugabe von Formalin zum Primer und dessen Erwärmung ist nach den Ergebnissen der Vorversuche überflüssig und sollte deshalb aus Gründen des Umwelt- und Gesundheitsschutzes und der Praktikabilität bei den Hauptversuchen entfallen. Fibrin verschiedenen Alters färbt sich in unterschiedlichen Rottönen an, die sich jedoch in ähnlicher Weise auch in anderen Gewebestrukturen finden.

Die histologischen Färbemethoden erlauben also nicht immer eine eindeutige Interpretation der im Schnitt gefärbten Strukturen (DVORAK 1986, COSTANTINI und ZACHARSKI 1993). Sie sind somit zum Fibrinnachweis in Tumoren ungeeignet. Auch das Auffinden von Thrombosierungen ist zeitaufwendig, und Fibrinablagerungen in sehr kleinen oder kollabierten Kapillaren werden leicht übersehen. Die Methode nach SHOOBRIDGE (1983) bietet aber aufgrund des unterschiedlichen Färbeverhaltens die Möglichkeit, intravital entstandenes Fibrin von intra- oder postoperativ entstandenem abzugrenzen.

#### 4.1.4.2. immunhistochemische Darstellung

Für die vorliegende Arbeit sollte ein Antikörper gegen Fibrin gefunden werden, der Fibrin von Hunden zuverlässig darstellt und am formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe einsetzbar ist. Berichte über den Einsatz von Antifibrinantikörpern an Schnitten formalinfixierten und in Paraffin eingebettetem Gewebes des Hundes liegen mit Ausnahme der Ergebnisse aus dieser Arbeit nicht vor (GOLOMBIEWSKI *et al.* 1997).

Voraussetzung für die immunhistochemische Darstellung einer bestimmten Struktur ist die Verfügbarkeit eines spezifischen Antikörpers (DENK 1989). Antikörper gegen Fibrin von Hunden sind nicht erhältlich. Die Tatsache, daß einige Antikörper, welche gegen Fibrin von Menschen gerichtet sind, mit Fibrin von Hunden kreuzreagieren (ROSEBROUGH *et al.* 1985, MCEVOY *et al.* 1996, EDGELL *et al.* 1996) läßt sich durch die Ähnlichkeit des Aufbaus des Fibrins von Mensch und Hund (CHEN *et al.* 1975, WOLLING und MISCHKE 1995) erklären.

Da die genannten Antikörper nicht kommerziell erhältlich sind und unklar ist, ob sie auch am formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe einsetzbar wären, wird der von IDELL *et al.* (1995) eingesetzte Antikörper AK no.350 auf seine Tauglichkeit für die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit getestet. Da er mit der  $\beta$ -Kette des Fibrins des Menschen reagiert, welche in ihrem Aufbau der des Hundes sehr ähnelt (BIRKEN *et al.* 1975) und diese Kette auch während der Quervernetzung des Fibrins frei bleibt (DOOLITTLE 1987), konnte eine Kreuzreaktion mit Fibrin von Hunden vermutet werden. Dennoch muß für den Einsatz dieses Antikörpers am Gewebe von Hunden nach den Erkenntnissen von PILERI *et al.* (1997) und SHOJI *et al.* (1998) neben der optimalen Antikörperkonzentration ermittelt werden, ob und gegebenenfalls welche Vorbehandlung der Gewebsschnitte für die Immunhistochemie durchgeführt werden muß. Als immunhistochemische Methode wurde die von

CORDELL *et al.* (1984) entwickelte und am Institut für Veterinärpathologie der Freien Universität Berlin etablierte APAAP-Methode gewählt.

In nicht vorbehandeltem Gewebe reagiert AK no.350 nicht oder nur in einem nicht zur Darstellung durch die APAAP-Methode ausreichendem Maße. Folglich liegt das nachzuweisende Epitop vermutlich maskiert vor (MASON und O'LEARY 1991). Von den untersuchten Möglichkeiten zur Antigendemaskierung (Verdauung mit Protease, Erhitzung im Autoklaven und Erhitzung durch Mikrowellen) führt nur letztgenannte zu einem befriedigenden Ergebnis. Hierbei läßt sich Fibrin mit der APAAP-Methode leuchtend rot und in scharfem Kontrast zur Umgebung darstellen, bei gleichzeitig sehr gutem Erhalt der Strukturen des Gewebes. Alle in der Ladewig- und Shoobridge-Färbung fibrinpositiven Stellen des Testgewebes erscheinen rot. In der Darstellung feiner Fibrinablagerungen ist die immunhistochemische Methode den histologischen deutlich überlegen. Nachteilig sind die Gewebeverluste durch Abschwimmen bei einigen Präparaten zu bewerten. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Gewebsschnitte in Citratpuffer für 2 x 5 min bei 600 W in das Mikrowellengerät eingestellt werden. Als optimale Verdünnung des Antikörpers wurde 1:50 ermittelt. Die teilweise Anfärbung des Serums ist aufgrund der sehr hellen Färbung ebensowenig mit Fibrin verwechselbar wie die in einigen Schnitten vorhandenen kleinen Fast-Red-Partikel, welche ohne Bezug zu bestimmten Gewebestrukturen und meist sternförmig vorliegen. Negativkontrollen zeigen keinerlei Anfärbung. Eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer für 40 sec und anschließendem Bläuen stellt die übrigen Strukturen des Gewebsschnitts kontrastreich und gut erkennbar dar.

Die Fibrin-Einfachmarkierung mit dieser optimalen Methode ermöglicht ein schnelles und eindeutiges Auffinden von Fibrin im Schnitt. Wie von CONTRINO *et al.* (1996) für Mammatumoren des Menschen beschrieben, läßt sich in einigen Fällen nicht zweifelsfrei erkennen, ob das Fibrin sich innerhalb eines Gefäßes befindet. Der Vergleich eines doppelmarkierten Parallelschnitts zum Schnitt der Einfachmarkierung ermöglicht ein Aufsuchen der fibrinpositiven Stellen aus der Einfachmarkierung im doppelmarkierten Schnitt. So kann die Lage des Fibrins in Bezug zum Gefäß stets eindeutig festgestellt werden.

Für die Darstellung von Fibrin mit AK no.350 ist eine Vorbehandlung der Schnitte im Mikrowellengerät essentiell. Mit derselben Vorbehandlung lassen sich mit AK vWF auch die Tumorgefäße darstellen. Die Erhitzung der Schnitte in der Mikrowelle führt zu ähnlichen Ergebnissen wie eine zweiminütige Verdauung mit Protease, wie sie von GUTBERLET (1994) zur Darstellung intratumoraler Blutgefäße beschrieben wurde. Also können Blutgefäße und Fibrin durch Doppelmarkierung in demselben Schnitt dargestellt werden. Als einzige der geprüften Gegenfärbungen kann die Anwendung von Eisenhämatoxylin nach Weigert für 120 sec mit nachfolgender sechzigsekündiger Differenzierung empfohlen werden. Nur mit dieser Methode wird ein farblicher Kontrast des Gewebes zu den mit Fast Blue BB Salz dargestellten Strukturen erreicht.

Die Doppelmarkierung allein ist zum Nachweis von Fibrin ungeeignet, da einige fibrinpositive Strukturen gleichzeitig für vWF positiv sind.

Das Umrahmen der Deckgläser mit farblosem Nagellack schließt den Spalt zwischen dem Deckglas und dem Objektträger weitgehend ab. Es vermindert so das Eindringen von Luft in

den Raum zwischen Deckglas und Objektträger bzw. Gewebsschnitt, das vermutlich durch Temperatureffekte auf die Glyceringelatine hervorgerufen wird.

#### 4.1.4.3. Methodenkritik

Eine genaue Quantifizierung von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen im gesamten Tumor ist bei der angewandten Methode nicht möglich, da jeweils nur eine Tumorebene betrachtet wurde. Die Darstellung von intra- und extravasalem Fibrin kann zudem stets nur eine Momentaufnahme sein, da Fibrinogenese und -lyse ständig parallel ablaufen.

Dies trifft insbesondere auf extravasal gelegenes Fibrin zu, da dieses besonders schnell umgesetzt wird (DVORAK *et al.* 1979, DVORAK *et al.* 1984). Auch der Fibrinabbau im Tumorstroma ist im Zeitraum zwischen Gewebeentnahme und -fixation möglich (ZACHARSKI *et al.* 1983). Diese Tatsache wird beim Einsatz von AK no.350 dadurch verstärkt, daß die  $\beta$ -Kette bereits zu Beginn der Fibrinolyse abgespalten wird (KOEHN *et al.* 1983).

Da Thrombosierungen reich an Fibrin sind (BINI *et al.* 1987, BOOTH und BENNETT 1994) und der Antigennachweis mit der APAAP-Methode sehr sensitiv ist, können Thrombosierungen vom Beginn ihrer Entstehung an, trotz des abnehmenden Fibringehalts und der von ORVIM *et al.* (1996) beschriebenen intraindividuellen Unterschiede, bis zu ihrer vollständigen Organisation nach gut zwei Wochen (MOSER *et al.* 1973, JØRGENSEN *et al.* 1967) durch AK no.350 dargestellt werden. Kleine, intravasal entstandene Fibrinkoagula können jedoch bereits im Moment ihrer Entstehung wieder aufgelöst werden (SLAPPENDEL *et al.* 1972) und sind nicht erfaßbar. Auch *ex vivo* läuft die Fibrinolyse in den Thromben weiter ab (MOSER *et al.* 1973). Intravital vorhandene Thrombosierungen werden so möglicherweise dem Nachweis durch AK no.350 entzogen.

Das Risiko einer fälschlichen Interpretation von postoperativ entstandenen Gerinnseln als Thrombi wird durch die beschriebene Methodik minimiert, da beim Vorhandensein fibrinpositiver Strukturen ohne Wandhaftung der histologisch gefärbte Parallelschnitt betrachtet wird, in dem sich frisch entstandenes Fibrin nicht anfärbt. Nach den Erkenntnissen von HARMS und LEHMANN (1969) über die Struktur *ex vivo* entstandener Thromben dürften sich diese ohnehin nur schlecht über einen Fibrinnachweis darstellen lassen.

#### 4.1.4.4. Fazit

Der Einsatz von AK no.350 in der beschriebenen optimalen Methode ermöglicht ein schnelles und sicheres Auffinden auch kleiner Mengen extravasalen Fibrins und Thrombosierungen in kleinen Gefäßen.

Thrombosierungen in Mammatumoren von Hunden lassen sich am besten durch einen immunhistochemischen Fibrinnachweis darstellen. Bei Unsicherheit über die Lage des Fibrins in Bezug auf ein Gefäß kann diese Frage durch Betrachten eines doppelmarkierten Parallelschnittes geklärt werden. Um eine postoperative Bildung von intravasalem Fibrin auszuschließen, welches in der betrachteten Schnittebene nicht wandständig ist, kann in einem mit der SHOBRIDGE-Methode gefärbten Parallelschnitt das Alter des Fibrins bestimmt werden.

Zur Darstellung extravasalen Fibrins in Mammatumoren des Hundes ist eine immunhistochemische Darstellung unverzichtbar.

Sowohl die Menge an Thrombosierungen als auch an extravasal gelegenen Fibrin dürfen bei der Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit nicht als absolute Werte verstanden werden. Sie spiegeln vielmehr einen Zustand wider, wie er sich zu einem bestimmten Zeitpunkt an einem bestimmten Ort in mindestens diesem Maße darstellte.

#### **4.2. Extravasale Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in unverändertem und nichtneoplastisch verändertem Mammagewebe sowie in Mammagewebe im frühen Karzinomstadium der Hündin**

Nach DVORAK *et al.* (1981), DVORAK *et al.* (1984) und COSTANTINI *et al.* (1991b) findet sich in gesundem Gewebe kein Fibrin. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit können bei knapp einem Achtel der Tiere, von denen Normalgewebe untersucht wurde, extravasale Fibrinablagerungen festgestellt werden, allerdings in sehr geringer Menge. Fast alle extravasalen Fibrinablagerungen treten blutungsassoziiert auf. Die Fibrinbildung ist in diesen Fällen als physiologische Reaktion auf die Extravasation von Blut anzusehen (TROY 1988). Die Blutungen im Normalgewebe selbst sind als pathologisch einzustufen, ihre Ursache kann im Rahmen dieser Arbeit aber nicht geklärt werden. Bei zwei Tieren treten mehrere Thrombosierungen im Normalgewebe in unmittelbarer Tumornähe auf. In diesen Fällen ist denkbar, daß der möglicherweise prokoagulatorisch wirkende Stoffwechsel des Tumors dessen unmittelbare Umgebung beeinflusst hat (SHOJI *et al.* 1998). Gegen diese Theorie spricht jedoch, daß nur zwei Tumoren von diesem Phänomen betroffen sind. Die Ursachen für die Thrombosierungen im Normalgewebe von fünf weiteren Tieren müssen ungeklärt bleiben, jedoch ist in diesen Fällen nur je ein Gefäß thrombosiert.

Hyperplastisches oder fibrotisches Mammagewebe ist in nur einem Fall von einer thrombosierten Kapillare und sehr selten von extravasalen Fibrinablagerungen betroffen. In einem dieser beiden Fälle liegt das hyperplastische Gewebe in einem eitrig entzündeten Gebiet. Daß dort, wie auch in zwei weiteren Fällen von *Mastitis purulenta*, im Gegensatz zum chronisch entzündeten Gewebe, großflächige extravasale Fibrinablagerungen auftreten, ist angesichts der massiven Extravasation von Plasma im Rahmen einer akuten Entzündung zu erwarten. In diesem Falle wird Fibrin vermutlich in einem Maße gebildet, das die durch die neutrophilen Granulozyten beschleunigte Fibrinolyse (BACH-GANSMO *et al.* 1994, ADAMS *et al.* 1995) übersteigt. Hinzu kommt, daß die von diesen Zellen gebildete Elastase vor allem den Abbau der  $\alpha$ -Kette beschleunigt (BACH-GANSMO *et al.* 1994), was die Darstellbarkeit des Fibrins durch AK no.350 zumindest zunächst nicht beeinflusst.

In Mammagewebe im frühen Karzinomstadium können keine Thrombosierungen und nur in einem Fall extravasale Fibrinablagerungen, wiederum mastitisassoziiert, dargestellt werden. In diesem Stadium scheinen karzinomatös entartete Zellen also keinen gerinnungsfördernden Effekt auszuüben, und die umgebenden Gefäße neigen nicht zur Extravasation von Plasma, was die Voraussetzung der extravasalen Fibrinbildung ist (DVORAK *et al.* 1984).

### **4.3. Extravasale Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in Mammatumoren i.w.S. der Hündin**

Betrachtet man die Ergebnisse des Fibrinnachweises in den untersuchten Mammatumoren i.w.S., so fällt auf, daß der benigne und der semimaligne Tumor fibrinfrei sind, vier von sechs malignen Geschwülsten hingegen teils massive extravasale Fibrinablagerungen und viele Thrombosierungen zeigen. Für eine Interpretation dieser Befunde ist die Gruppe der Mammatumoren i.w.S. jedoch zu klein und bezüglich der Ursprungszellen zu inhomogen.

### **4.4. Extravasale Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in Mammatumoren i.e.S. der Hündin**

#### **4.4.1. Vorkommen**

##### *4.4.1.1. Vorkommen extravasaler Fibrinablagerungen*

In knapp einem Drittel der untersuchten Tumoren können extravasale Fibrinablagerungen unterschiedlichen Ausmaßes dargestellt werden. In weniger als der Hälfte dieser Fälle sind die Fibrinablagerungen so massiv, daß sie schon in der Lupenvergrößerung leicht sichtbar sind. Die meist geringe Menge intratumoralen Fibrins könnte die Vermutung von STOCKHAUS (1998) bestätigen, in Mammatumoren des Hundes fände kein nennenswerter Fibrinogenverbrauch statt. Dieser Autor stützt seine Vermutung jedoch nur auf die Ergebnisse labordiagnostischer Blutuntersuchungen, weshalb der Rückschluß auf das intratumorale Geschehen mit größter Zurückhaltung beurteilt werden muß. Einschränkend muß weiterhin bemerkt werden, daß in der vorliegenden Studie nur intratumorales Fibrin, nicht aber Fibrinogen, erfaßt wurde und eine genaue Aussage über den Fibrin- oder Fibrinogenverbrauch nicht getroffen werden kann, da der Fibrin- und Fibrinogenumsatz unbekannt sind.

Die Bandbreite der Ergebnisse zeigt deutlich, daß es sich nicht um entnahme- oder bearbeitungsbedingte Artefakte handelt (COSTANTINI und ZACHARSKI 1993).

Untersuchungen an Mammatumoren von Menschen hatten stets einheitlichere Ergebnisse innerhalb der jeweiligen Studie geliefert (DVORAK *et al.* 1981, CONTRINO *et al.* 1996, COSTANTINI *et al.* 1991b). Dies könnte zum Teil in der vergleichsweise kleinen Tumorzahl begründet sein, die diesen Untersuchern zur Verfügung stand. Es wäre denkbar, daß bei einer ähnlichen Materialmenge für diese Arbeit nur fibrinnegative Tumoren erfaßt worden wären, da diese den Großteil aller Tumoren ausmachen.

Die Ergebnisse der genannten humanmedizinischen Untersuchungen untereinander hingegen weichen stark voneinander ab, so finden sich bei DVORAK *et al.* (1981) in 95% der untersuchten Tumoren extravasale Fibrinablagerungen, wohingegen in der Studie von COSTANTINI *et al.* (1991b) nur fibrinnegative Tumoren vertreten sind. Eine mögliche Ursache hierfür ist zum einen die Verwendung unterschiedlicher Antifibrinantikörper, welche im Falle der Arbeit von DVORAK *et al.* (1981) möglicherweise auch Fibrinogen miterfaßten, wie die Autoren einräumen. Es könnte sich also theoretisch bei den immunhistochemisch dargestellten Epitopen ausschließlich um Fibrinogen handeln. In diesem Falle würden die Ergebnisse der Untersuchung maligner Mammatumoren denen von COSTANTINI *et al.* (1991b) ähneln. Dagegen spricht die elektronenmikroskopische Verifikation einiger Fibrin-

funde durch DVORAK *et al.* (1981). Ferner würden dennoch die Ergebnisse über das Vorkommen extravasaler Fibrinablagerungen in benignen Mammatumoren divergieren. CONTRINO *et al.* (1996) arbeiteten mit drei verschiedenen fibrinspezifischen Antikörpern, welche stets Fibrin in malignen Tumoren darstellten, allerdings in geringerer Menge als von den anderen beiden Arbeitsgruppen für Fibrin bzw. Fibrinogen beschrieben. Eine allein auf der Verwendung unterschiedlicher Antikörperspezifikationen beruhende Begründung bleibt deshalb unbefriedigend. CONTRINO *et al.* (1996) vermuten die Ursache der Diskrepanz ihrer Ergebnisse zu denen anderer Untersucher in der Verwendung unterschiedlicher Fixationstechniken in den verschiedenen Laboren, eine Ansicht, die auch von SHOJI *et al.* (1998) in Bezug auf andere Antigene vertreten wird.

Die genannten Gründe könnten auch erklären, warum MCEVOY *et al.* (1996) in einem Mammatumor eines Hundes eine Fibrinmenge darstellen konnten, welche die in allen Tumoren der vorliegenden Arbeit übertrifft. Eine möglicherweise kürzere Phase zwischen Tumorentnahme und -fixation, wodurch die Möglichkeit der postoperativen Fibrinolyse eingeschränkt wurde, kann dabei ebenso zu einem größeren Gehalt an nachweisbarem Fibrin führen wie die Verwendung eines eventuell gegen ein anderes Epitop des Fibrinmoleküls gerichteten Antikörpers, der im Gegensatz zu AK no.350 auch dann mit Fibrin reagiert, wenn dessen Abbau bereits begonnen hat.

#### 4.4.1.2. Vorkommen von Thrombosierungen

In mehr als einem Drittel aller Tumoren dieser Studie kann wenigstens eine Thrombosierung dargestellt werden, in mehr als drei Viertel dieser Fälle sogar mehrere. Ein Siebtel aller Tumoren ist, im Verhältnis zur Tumorgroße, von vielen Thrombosierungen betroffen.

Die indirekten Hinweise auf eine tumorassoziierte intravasale Gerinnung in Mammatumoren des Hundes, welche von O'DONNELL *et al.* (1981) und SUSANECK *et al.* (1983) diskutiert werden, können durch diese Ergebnisse möglicherweise eine Bestätigung erhalten. Jedoch ist rückblickend für diese Fälle keine sichere Aussage über die wahre Ursache der beobachteten Gerinnungsabweichungen feststellbar. Die Tatsache, daß STOCKHAUS (1998) bei den von ihm untersuchten Mammatumorpatienten keinen Hinweis für eine nennenswerte Verbrauchskoagulopathie fand, läßt sich aus der insgesamt geringen Menge des in den Thrombosierungen verbrauchten Fibrinogens erklären.

Mammatumoren von Hunden scheinen häufiger von thrombosierten Gefäßen betroffen zu sein als Mammatumoren des Menschen. Allerdings fehlen in der entsprechenden Arbeit von DVORAK *et al.* (1981) konkrete Angaben über die Zahl der gefundenen Thrombosierungen. Hinzu kommt, daß von diesen Autoren nur eine geringe Zahl von Tumoren untersucht wurde. Da auch in der vorliegenden Studie in mehr als zwei Drittel aller Tumoren keine oder nur eine Thrombosierung gefunden wurde, hätte auch hier eine geringere Probenzahl zu ähnlichen Ergebnissen wie von DVORAK *et al.* (1981) führen können. Zudem ist der Anteil der fibrinpositiven Tumoren bei kastrierten Tieren besonders hoch, während zumindest ein Teil der Tumoren der humanmedizinischen Studie von Frauen mit funktionsfähigen Ovarien stammt. Es ist ebenfalls denkbar, daß bei einer sehr geringen Probenzahl zufällig nur Tumoren mit Thrombosierungen untersucht werden.

TANNOCK und STEEL (1969) beschreiben eine größere Zahl von Thrombosierungen in den von ihnen untersuchten Mammatumoren der Ratte. Weil diese jedoch in die Versuchstiere transplantiert worden waren, sind die Ergebnisse nicht unkritisch auf Spontaneoplasien übertragbar. Da ihre Nachweismethode auf Erythrozytenmarkierung beruht, muß einschränkend bemerkt werden, daß es sich bei den Gefäßen auch um Kapillarsprossen handeln könnte, welche zunächst mit Erythrozyten angefüllt sind (JAIN 1988).

In der vorliegenden Studie sind bei den meisten der Tumoren mit Thrombosierungen ausschließlich oder in der Mehrzahl Kapillaren betroffen. Thrombosierungen in Tumoren sind aber nicht auf eine bestimmte Gefäßgröße beschränkt. In fast allen Tumoren der Thrombosierungsgruppe 3+ finden sich Thrombi sowohl in Kapillaren als auch in größeren Gefäßen. Es wurden jedoch keine Daten erhoben, wie groß der Anteil der Gefäße der jeweiligen Größe an der gesamten Gefäßversorgung der einzelnen Tumoren ist. Deshalb kann nicht festgestellt werden, ob eine bestimmte Gefäßgröße im Verhältnis zu ihrer Häufigkeit im Tumor häufiger als andere von Thrombosierungen betroffen ist. Beim Prostatakarzinom des Menschen finden sich nach WOJTUKIEWICZ *et al.* (1991) intravasale Fibrinablagerungen hingegen ausschließlich in Kapillaren.

In Mammatumoren des Hundes sind in einigen Fällen zwar recht viele Gefäße thrombosiert, dennoch ist ihre Zahl geringer als in Hämangiomen und Hämangiosarkomen des Hundes (RISHNIW und LEWIS 1994, HARGIS und FELDMAN 1991) und Hämangiomen und kaposiformen Hämangioendotheliomen des Menschen (WARREL *et al.* 1983, ZUKERBERG *et al.* 1993). Für einen Vergleich mit der Zahl der Thrombosierungen im Prostatakarzinom des Menschen (WOJTUKIEWICZ *et al.* 1991) fehlen genauere Angaben.

#### **4.4.2. Zusammenhang von extravasalen Fibrinablagerungen, Thrombosierungen und anderen Merkmalen**

##### *4.4.2.1. extravasale Fibrinablagerungen bzw. Thrombosierungen bei verschiedenen Individuen*

Bei 67,09% der Tiere mit Mammatumoren i.e.S. kann in mindestens einem Tumor mindestens eine Thrombosierung oder extravasale Fibrinablagerung festgestellt werden. Dies entspricht genau dem Anteil der an Mammatumoren erkrankten Hunde (66,7%), bei denen STOCKHAUS (1998) klinisch Gerinnungsabweichungen feststellen konnte. In welchem Maße solche klinisch feststellbaren Gerinnungsabweichungen mit einer intratumoralen Gerinnungsaktivierung zusammenhängen, und ob ein Merkmal möglicherweise von dem anderen beeinflusst wird, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Hierfür wäre unter anderem die Art und Menge der vom Tumor ausgeschütteten Faktoren mit Einfluß auf die Blutgerinnung und Fibrinolyse und die Menge des intratumoralen Fibrinogenverbrauchs zu prüfen.

Das Auftreten von extravasalen Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in Mammatumoren scheint in den meisten Fällen kaum von Eigenschaften des Wirtstieres beeinflusst zu werden, denn zwei Drittel der Tiere mit multiplen Mammatumoren haben sowohl Tumoren mit als auch ohne Thrombosierung(en) bzw. extravasale Fibrinablagerungen. Bei einem Drittel der Tiere mit multiplen Mammatumoren reicht die Bandbreite sogar so weit, daß ein Indivi-

duum sowohl Tumoren der Gruppe thr 0 bzw. evf 0 als auch thr 3+ bzw. evf 3+ beherbergt.

Eine Rassedisposition ist unwahrscheinlich. Lediglich Deutsche Schäferhunde zeigen deutlich häufiger Tumoren mit massiven extravasalen Fibrinablagerungen und vielen Thrombosierungen als Vertreter anderer Rassen. Für eine genaue Interpretation dieser Werte ist der Anteil von Tieren einzelner Rassen am gesamten Patientengut zu klein.

Allerdings treten nach den Ergebnissen der statistischen Tests überraschenderweise fibrinnegative Tumoren bei jüngeren Tieren häufiger auf als bei älteren. Es ist denkbar, daß dies durch die bei älteren Tieren häufiger auftretenden Tumornekrosen und die höhere Punktzahl bedingt ist, also das Alter des Tieres, wenn überhaupt, nur von indirektem Einfluß auf die Menge von Fibrin im Tumor ist.

Der Einfluß der Geschlechtshormone auf die Gerinnungsbereitschaft (GÜNZEL-APEL *et al.* 1997) und somit auf die Zahl der extravasalen Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in Mammatumoren scheint überraschend groß zu sein. Der vermehrte Nachweis von Fibrin in Tumoren von kastrierten Tieren entspricht möglicherweise den Verhältnissen der von STEVENSON (1996) beschriebenen erhöhten Gerinnungsbereitschaft bei Frauen im Senium. Dennoch ist ein gutes Drittel aller Tumoren der weiblich kastrierten Tiere fibrinnegativ und einige Tumoren von weiblich intakten Tieren fallen in die Gruppe evf 3+ / thr 3+.

#### 4.4.2.2. *extravasale Fibrinablagerungen und Thrombosierungen*

Thrombosierungen und extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren treten häufig zusammen auf. Als Ursache hierfür käme ein erhöhtes gerinnungsförderndes Potential der entsprechenden Tumoren in Frage, welches extra- wie intravasale Gerinnung gleichermaßen beeinflusst. Eine andere Hypothese ist, daß Thrombosierungen in einem Tumor ein hypoxisches Milieu schaffen, das zu verstärkter extravasaler Fibrinbildung führt. Hypoxie führt einerseits zu einer Hemmung der Fibrinolyse (PINSKY *et al.* 1998), andererseits zu einer vermehrten Bildung von VPF/VEGF in den Mammakarzinomzellen (SCOTT *et al.* 1998). Dadurch wird die Extravasation von Plasma gesteigert. Das im Plasma enthaltene Fibrinogen gerinnt dann beim Kontakt mit dem Gewebe (DVORAK *et al.* 1984). Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Gefäßpermeabilität bietet der von GE *et al.* (1991) geschilderte Mechanismus, der durch Thrombolyse ausgelöst werden könnte. Dieser Effekt wurde allerdings bisher nur *in vitro* beschrieben.

#### 4.4.2.3. *extravasale Fibrinablagerungen bzw. Thrombosierungen und andere Tumormerkmale*

Die **Lage** des Tumors beeinflusst erwartungsgemäß weder seinen Gehalt an Thrombosierungen noch an extravasalen Fibrinablagerungen.

Es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der **Größe** und der evf- bzw. Thrombosierungsgruppe eines Tumors. Dies entspricht den Ergebnissen von STOCKHAUS (1998), der bei seinen Patienten mit zunehmender Tumorgöße eine Tendenz zu häufigeren und komplexeren Gerinnungsstörungen -meist in Richtung einer Hyperkoagulopathie-

nachwies. Auch andere Merkmale wie Gefäßeinbrüche (GUTBERLET 1994) oder Tumornekrose, wie schon von FISHER *et al.* (1978) beschrieben, nehmen mit der TumorgroÙe zu. Es stellt sich also auch hier die Frage, ob das Wachstum ursächlich zu einer Zunahme der prokoagulatorischen Eigenschaften des Tumors führt. IDELL *et al.* (1995) vertreten die Ansicht, daß Neoplasien in der Wachstumsphase besonders reich an Fibrin sind. Dies erlaubt den Schluß, daß schnellwachsende Neoplasien, zu denen viele der sehr großen Tumoren vermutlich gehören, oft in einer Wachstumsphase entnommen werden und entsprechend reich an Fibrin sind. Für eine solche Vermutung ist die Menge extravasalen Fibrins jedoch in allen Fällen zu gering (vgl. Kapitel 4.4.3.1., S. 103f). Eher dürfte es sich bei den extravasalen Fibrinablagerungen vieler Tumoren um eine unspezifische Folge von Tumornekrosen handeln (vgl. Kapitel 4.4.3.1., S. 103f). Da sich mikroskopisch kleine Tumoren auch in den Gruppen thr 3+ und evf 3+ finden, und im größten Tumor nur ein thrombosiertes Gefäß dargestellt werden kann, können die Ergebnisse keinesfalls verallgemeinert werden.

Interessant ist das Ergebnis der Untersuchung von Tumoren unterschiedlicher **Klassifikation** auf extravasale Fibrinablagerungen, steht das Ergebnis doch im Gegensatz zu der Ansicht von DVORAK (1986), es bestehe kein Zusammenhang zwischen der Dignität einer Geschwulst und ihrem Fibringehalt, und Tumoren derselben Klassifikation verhielten sich stets ähnlich. Auch die Beobachtung von MCEVOY *et al.* (1996) über große Mengen extravasalen Fibrins in einem benignen Mammatumor einer Hündin kann angesichts der Tatsache, daß in der vorliegenden Studie alle benignen Tumoren der Gruppe evf 0 angehören, nicht bestätigt werden. Eingeschränkt stimmen die Ergebnisse mit denen von CONTRINO *et al.* (1996) überein, die in allen malignen Mammatumoren der Frau reichlich Fibrin nachweisen konnten, nicht jedoch in benignen. In der vorliegenden Arbeit finden sich Adenokarzinome, Adenokarzinome mit Myoepithelhyperplasie und sonstige maligne Tumoren sowohl in der Gruppe evf 0 /thr 0 als auch in der Gruppe evf 3+ / thr 3+. In benignen Tumoren findet offensichtlich keine Plasmaextravasation mit nachfolgender Gerinnungsaktivierung statt, es sei denn, man zöge eine derart überstürzte zeitgleiche Fibrinolyse in Betracht, daß keinerlei Fibrin nachweisbar ist. Auch Thrombosierungen treten nur extrem selten auf. Denkbar ist, daß die GefäÙe in benignen Neoplasien im Gegensatz zu denen in malignen Neoplasien (BROWN *et al.* 1988a) nicht hyperpermeabel sind, denn eine vermehrte Bildung von VPF/VEGF wurde bisher vornehmlich in maligne entartetem Gewebe festgestellt (BROWN *et al.* 1995, SCOTT *et al.* 1998, HLATKY *et al.* 1994). Über die Bildung prokoagulatorisch wirkender Stoffe in benignen Tumoren herrscht Uneinigkeit, doch stehen die Ergebnisse von CONTRINO *et al.* (1996) und COSTANTINI *et al.* (1991b) über den Vergleich des Vorkommens von TF in benigne und maligne entartetem Mammagewebe der Frau eher im Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie als die von LUTHER *et al.* (1996). Eine solche Vermutung kann jedoch erst geklärt werden, wenn entsprechende Untersuchungen an Mammatumoren der Hündin vorliegen.

Auffällig ist auch die unterschiedliche Verteilung der malignen Tumoren verschiedener Klassifikation auf die evf- und Thrombosierungsgruppen, die allerdings nur im Vergleich der sonstigen Karzinome und Karzinosarkome der Mamma mit den übrigen Tumorgruppen statistisch auffällig ist. Da die Gruppe der sonstigen Tumoren zwar sehr heterogen ist, aber eine vergleichsweise hohe durchschnittliche Punktzahl aufweist, ist dies ein Hinweis darauf, daß

nicht nur benigne Tumoren eine geringere Gerinnungsneigung aufweisen als maligne, sondern daß auch zunehmende Malignität mit einer erhöhten Gerinnungsbereitschaft einhergeht.

Die  $\chi^2$ -Tests weisen auf einen Zusammenhang zwischen der **Punktzahl** und damit dem Malignitätsgrad eines Tumors und der evf- bzw. Thrombosierungsgruppe hin. Der Anteil der Tumoren ohne Thrombosierungen nimmt mit zunehmender Punktzahl ab, während interessanterweise das Verhältnis der Tumoren der Gruppen thr 1+ bis 3+ zueinander ähnlich bleibt. Der Grad der Malignität eines Tumors ist also häufig mit dem Vorhandensein eines prothrombotischen Zustands verbunden, nicht aber mit dessen Ausprägung. Daß die der Punktzahl zugrundeliegenden Kriterien einen direkten Einfluß auf die intravasale Gerinnungsaktivierung in Tumoren haben, ist insgesamt unwahrscheinlich. Die Tumorinvasivität jedoch könnte durch die aggregierten Blutplättchen in den Thrombosierungen (BELLOC *et al.* 1995) oder durch eine auf die Thrombosierung folgende Hypoxie im Versorgungsgebiet des betroffenen Gefäßes gefördert werden (GRAHAM *et al.* 1999), wie es *in vitro* der Fall ist. Eher ist jedoch zu vermuten, daß mit zunehmender Malignität auch häufigere Aberrationen im Gefäßaufbau oder Störungen des Gleichgewichts von Gerinnung und Fibrinolyse auftreten. Entsprechendes kann als Begründung für die ähnlich gelagerte Verteilung der evf-Gruppen in Bezug auf die Punktzahl der Tumoren gesagt werden. Eine Beeinflussung der Tumorinvasivität durch extravasale Fibrinablagerungen (DVORAK 1986) ist aufgrund ihrer geringen Menge unwahrscheinlich (s. Kapitel 4.4.3.1., S. 103f).

**Ulzerierte** Tumoren sind sowohl im Ulkusbereich als auch weit davon entfernt sehr oft von massiven Fibrinablagerungen betroffen. Dies kann einerseits auf eine bis tief ins Gewebe reichende Gerinnungsaktivierung durch Gewebsuntergang im Bereich des Geschwürs zurückgeführt werden, andererseits auf die regelmäßig begleitend auftretende **eitrige Entzündung**. Das häufige gleichzeitige Auftreten von eitriger Entzündung und extravasalen Fibrinablagerungen läßt sich durch die gleichen Mechanismen erklären, die bereits oben beschrieben wurden (vgl. Kapitel 4.2., S. 93). Natürlich können auch in ulzerierten Tumoren Blutungen und Nekrosen auftreten, die zu extravasalen Fibrinablagerungen führen. Fast alle ulzerierten Tumoren sind auch von Thrombosierungen betroffen. Auch wenn diese in einigem Abstand zum Ulkus auftreten, könnten sie doch physiologische Reaktionen auf Gefäßrupturen im Geschwürgebiet sein.

**Makrophagen**, welche mit Hilfe von AK no.350 fibrinpositiv erscheinen, sind ein seltenes Phänomen, welches durch die Aufnahme von Fibrin oder auch Fibrinogen mit nachfolgender Gerinnung bedingt sein könnte.

Ein deutlicher Zusammenhang besteht auch zwischen dem **Nekrosegrad** eines Tumors und der Menge der extravasalen Fibrinablagerungen. In nekrosefreien Tumoren treten Fibrinablagerungen nur selten und in geringem Maße auf. Je größer der Anteil nekrotischen Gewebes an der Tumorfläche wird, desto häufiger und stärker ist dieser Tumor von extravasalen Fibrinablagerungen betroffen. Es ist wahrscheinlich, daß der Gewebsuntergang direkt die extravasale Gerinnung beeinflusst. Da in gut zwei Drittel der Tumoren mit Nekrosen und extravasalen Fibrinablagerungen diese zumindest teilweise in direktem räumlichen Kontakt stehen, handelt es sich bei der Fibrinbildung vermutlich größtenteils um die von DVORAK (1986) beschriebene Folge der Ausschüttung von Gewebsthromboplastinen in nekrotischem Gewebe. Eine andere Möglichkeit ist, daß sich das Gewebe am Übergang zu einer Nekrose-

zone in einem hypoxischen Zustand befindet (DVORAK *et al.* 1995), was über die in Kapitel 4.4.2.2., S. 97 diskutierte Ereigniskette in perinekrotischer Fibrinablagerung mündet. Fibrin kann nur dort gebildet werden, wo sich Fibrinogen in größerer Menge befindet (DVORAK *et al.* 1984), was auch in Arealen mit freien Gewebsthromboplastinen gilt. Folglich sind nicht alle Nekrosen zwingend von Fibrinablagerungen begleitet.

Entgegen der in der Literatur über Mammatumoren der Frau vertretenen Ansicht (PARHAM *et al.* 1988) schützt bei Mammatumoren der Hündin eine gute Gefäßversorgung nicht vor Nekrosebildung. Mit dem  $\chi^2$ -Test nachweisbar sind im Datenmaterial der vorliegenden Studie sogar schlecht vaskularisierte Mammatumoren der Hündin häufiger frei von Nekrosen als gut vaskularisierte. Eine ungleichmäßige intratumorale Gefäßverteilung (LESS *et al.* 1991, GUIDI *et al.* 1994, DE JONG *et al.* 1998) in den gut vaskularisierten Tumoren reicht zur alleinigen Erklärung dieses Phänomens nicht aus. Hingegen ist denkbar, daß ein Teil der Gefäße erst nach Entstehung der Nekrose gebildet wurde, da Hypoxie die Bildung von VPF/VEGF provoziert (SCOTT *et al.* 1998) und somit proangiogenetisch wirkt (SENGER *et al.* 1996, SHOJI *et al.* 1998). Auch bei den von TANNOCK und STEEL (1969) in der Nekrosezone eines Mammatumors beobachteten Gefäßen ist unklar, in welchem zeitlichen Zusammenhang ihre Bildung zum Gewebsuntergang steht.

Unstrittig ist jedoch, daß ab einem gewissen Tumordurchmesser die neoplastischen Zellen der Versorgung durch Gefäße in ihrer Nähe bedürfen (TANNOCK und STEEL 1969, PARANGI *et al.* 1996, HLATKY *et al.* 1994). Die Häufigkeit, mit der Thrombosierungen in Tumoren mit Nekrosen auftreten, läßt einen ursächlichen Zusammenhang zwischen diesen beiden Phänomenen vermuten. Hierfür spricht auch, daß die Tumoren der Thrombosierungsgruppen 0, 2+ und 3+ jeweils den größten Anteil der Tumoren der entsprechenden Nekrosegruppe stellen, und dieser Zusammenhang vom Vaskularisationsgrad des Tumors weitgehend unabhängig ist. Möglicherweise also ist in Mammatumoren der Hündin in den meisten Fällen nicht die Gefäßdichte ausschlaggebend für ein Absterben von Tumorgewebe, sondern vielmehr, wieviele dieser Gefäße überhaupt funktionstüchtig sind. Ein Funktionsverlust tritt nach den Ergebnissen dieser Studie vor allem aufgrund von Gefäßverschlüssen durch Thrombosierungen auf, da diese je nach Ausmaß einen teilweisen oder totalen Ausfall der Versorgung im von dem betroffenen Gefäß versorgten Gebiet nach sich ziehen. Ob zusätzlich zu den Thrombosierungen in Mammatumoren der Hündin auch die beim Menschen beobachteten verminderten Perfusionsraten (FOX *et al.* 1996), Endothelschäden (DVORAK *et al.* 1981), kollabierte oder komprimierte Gefäße (JAIN 1988, FOLKMAN 1996) eine Rolle spielen, kann hier nicht geklärt werden.

Thrombosierungen spielen also möglicherweise in spontanen Mammatumoren der Hündin eine Rolle, wie sie bisher nur bei genetisch veränderten experimentellen Mammatumoren beschrieben wurden (MUSIANI *et al.* 1996). TANNOCK und STEEL (1969) vermuteten in allotransplantierten Mammatumoren der Ratte einen ähnlichen Effekt, auch hier gilt jedoch die in Kapitel 4.4.1.2., S. 95 erwähnte Einschränkung bezüglich ihrer Methodik.

Die wahrscheinlichste Erklärung für den Zusammenhang intratumoraler **Blutungen** und extravasaler Fibrinablagerungen ist die Auslösung der extrinsischen Gerinnungskaskade bei der Extravasation von Blut (vgl. 4.2., S. 93f). In einigen Tumoren mit extravasalen Fibrinablagerungen und Blutungen stehen diese jedoch nicht in räumlichem Kontakt. Geht

man davon aus, daß intratumorale Blutungen durch Gefäßalterationen wie den von DVORAK *et al.* (1981) beschriebenen verursacht werden, könnte es an anderer Stelle zur reinen Extravasation von Plasma mit folgender Gerinnung gekommen sein. Dies erscheint jedoch aufgrund der Erkenntnisse von DVORAK *et al.* (1995) unwahrscheinlich. Möglich ist hingegen ein von einer Blutung ausserhalb der Schnittebene ausgehender Gerinnungseffekt. Dies kann aufgrund der relativen Seltenheit von Blutungen nicht alle extravasalen Fibrinablagerungen ohne Blutungskontakt erklären. Das vermehrte Auftreten von Thrombosierungen in Tumoren mit Blutungen paßt zu der Vermutung, die intratumoralen Gefäße seien geschädigt. Blutungen ohne Fibrinbildung könnten auf überstürzte Fibrinolyse zurückzuführen sein. Die mangelnde Verfügbarkeit einer Oberfläche zur Bildung des Prothrombinasekomplexes (VANDEWATER *et al.* 1985) ist nicht anzunehmen, da die bei der Blutung ins Gewebe gelangten Thrombozyten eine solche bereitstellen (TRACY *et al.* 1981). Die Frage, warum innerhalb eines Tumors sowohl Blutungen mit als auch ohne Fibrinbeteiligung auftreten, muss ungeklärt bleiben.

Zwischen dem Vorliegen einer *Angiosis carcinomatosa* und der Häufigkeit intratumoraler Thrombosierungen in Tumoren der vorliegenden Studie besteht ein statistisch bestätigter Zusammenhang. Daß eine *Angiosis carcinomatosa* direkt über die von KINJO (1978) beobachtete intravasale Gerinnungsaktivierung bereits intratumoral zur Bildung von Thrombosierungen führt, erscheint aber eher unwahrscheinlich, da ein Siebtel der Tumoren mit sicherer *Angiosis carcinomatosa* thrombosierungsfrei ist. Auch ein Einfluß einer intravasalen Gerinnungsaktivierung auf extravasale Fibrinbildung ist nicht anzunehmen. Wahrscheinlicher ist, daß die Merkmale "erhöhtes Gerinnungspotential" und "*Angiosis carcinomatosa*" sich nicht direkt beeinflussen. Auch wenn nach den Erkenntnissen von GUTBERLET (1994) *Angiosis carcinomatosa* nicht zwingend zu Metastasierung führt, so könnte doch die beobachtete häufige Gerinnungsaktivierung in dieser Tumorgruppe auf das von PASQUALINI *et al.* (1997) beschriebene allgemein erhöhte Gerinnungspotential bei metastasierungsfreudigen Tumoren zurückzuführen sein.

Die in den fünfzehn daraufhin untersuchten Mammatumoren der Hündin festgestellte **Gefäßdichte** von 5,4 bis 131,1 Gefäßen/mm<sup>2</sup> entspricht eher den Erkenntnissen von OBERMAIR *et al.* (1995) als denen von WEIDNER *et al.* (1991) für Mammatumoren der Frau.

Die Einteilung in Gefäßdichtegruppen wird vorgenommen, um nicht die absolute Zahl der thrombosierten Gefäße in Mammatumoren, sondern deren Anteil an der Gesamtgefäßversorgung wichten zu können, was für die Beurteilung einer möglichen tumorbiologischen Bedeutung der Thrombosierungen sinnvoll ist. Die Unabhängigkeit der Merkmale Thrombosierungsgruppe und Gefäßdichtegruppe weist darauf hin, daß bei Tumoren unterschiedlicher Gefäßdichte vergleichbare Thrombosierungsgruppen gebildet wurden. Die extravasalen Fibrinablagerungen hingegen wurden nach ihrer Fläche beurteilt. Es konnte festgestellt werden, daß 68,89% der gering vaskularisierten Tumoren keine extravasalen Fibrinablagerungen aufweisen, gegenüber 36,11% der mäßig oder stark vaskularisierten Tumoren. Dies bestätigt die Aussage von DVORAK *et al.* (1987) über die Extravasation von Plasma als limitierenden Schritt in der Fibrinogenese, da in Tumoren mit wenigen Gefäßen auch insgesamt weniger Plasma ins Gewebe gelangen kann. Ferner ist es ein Hinweis darauf, daß die von BROWN

*et al.* (1995) getroffene Feststellung über einen Zusammenhang von Vaskularisationsgrad und VPF/VEGF-Bildung in Mammatumoren der Frau auch bei der Hündin zutreffen könnte.

#### 4.4.2.4. *extravasale Fibrinablagerungen bzw. Thrombosierungen, Metastasen und Krankheitsverlauf*

Die Beurteilung der Parameter "Lymphknotenmetastasen" und "Krankheitsverlauf" sowie ihre Verknüpfung mit Tumormerkmalen ist aus mehreren Gründen schwierig:

Bei Tieren, welche an multiplen Tumoren der Mamma litten, ist unklar, welche dieser Neoplasien den Krankheitsverlauf bestimmt und/oder zur Bildung von Lymphknotenmetastasen geführt hat. Der Nachweis eines Zusammenhangs zwischen bestimmten Tumormerkmalen einerseits und dem Lymphknotenstatus bzw. dem Krankheitsverlauf andererseits ist dadurch erschwert. Deshalb wurden jeweils drei Tumorgruppen gebildet und in Beziehung zum Lymphknotenstatus bzw. dem Krankheitsverlauf gesetzt: alle Tumoren der entsprechenden Milchleiste bzw. des Tieres, nur der nach Punkten bösartigste Tumor und nur der Tumor der höchsten evf- bzw. Thrombosierungsgruppe.

Hinzu kommt, daß durch die chirurgische Entnahmetechnik bedingt jeweils nur der bzw. die Inguinallymphknoten zur Verfügung stand(en), aber auch eine Metastasierung von Mammatumoren jeder Lokalisation in andere Lymphknoten möglich ist (SAUTET *et al.* 1992, ARNICKE 1999). Bei der Beurteilung des Krankheitsverlaufs dürfen die in Kapitel 4.1.3., S. 89 erläuterten Bedenken bezüglich des Überwachungszeitraumes nicht außer Acht gelassen werden.

Lymphknoten mit Metastasen drainieren häufig Mammaleisten mit Tumoren, bei denen ein erhöhtes Gerinnungspotential vorliegt, welches sich in der Bildung von Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen darstellt. Der geschilderte Eindruck bleibt auch bestehen, wenn nicht alle Tumoren, sondern nur der bösartigste bzw. nur der mit der höchsten Wertung für Thrombosierungen bzw. extravasale Fibrinablagerungen betrachtet wird. Diese Ergebnisse stellen möglicherweise eine Bestätigung der aus *in vitro* - Versuchen gewonnenen Erkenntnisse von PASQUALINI *et al.* (1997) über prokoagulatorische Eigenschaften und Metastasierungsverhalten dar. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß nur die Hälfte der Lymphknoten mit Tumorzellemboli, und keiner der Lymphknoten mit Metastase(n), frei von Fibrin ist. Sollten prokoagulatorische Eigenschaften der Tumorzellen für die Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen in den Tumoren verantwortlich sein, ist denkbar, daß dadurch auch die von GORELIK *et al.* (1984), GUNJI und GORELIK (1988), KINJO (1978), AMIRKHOSRAVI und FRANCIS (1995) und MCCULLOCH und GEORGE (1988) beschriebenen Vorteile für die Metastasenbildung bestehen. In diesem Zusammenhang kann auch betrachtet werden, daß Lymphknoten mit Tumorzellemboli oder -verdacht häufig frei von Fibrin sind. Auch die Tumoren der entsprechenden Mammaleisten zeigen keine statistisch nachweisbaren häufigeren Anzeichen für eine Aktivierung der Blutgerinnung als Tumoren aus Mammaleisten mit metastasenfreien Lymphknoten. Dies könnte darauf hinweisen, daß die Abschwemmrate potentiell metastatischer Zellen aus Tumoren nicht von deren gerinnungsförderndem Potential beeinflußt wird, wohl aber die Möglichkeit dieser Zellen, sich tatsächlich im Zielgewebe anzusiedeln.

Die Fibrinablagerungen und thrombosierte Gefäße in den Lymphknoten stehen nicht immer in direktem räumlichen Zusammenhang mit den Tumorzellen, was den Ergebnissen von KINJO (1978) widerspricht, nicht jedoch denen von MCCULLOCH und GEORGE (1988). Interessant ist, daß zwei Fünftel der Lymphknoten, welche als frei von Tumorzellen eingestuft wurden, extravasale Fibrinablagerungen aufweisen. Eine mögliche Erklärung wäre ein prokoagulatorischer Effekt von im H.E.-Präparat nicht erkannten Tumorzellemboli oder von Tumorzellemboli bzw. Mikrometastasen in einer anderen Schnittebene. Auch intraoperative Blut- und Plasmaresorption aus dem Operationsgebiet mit nachfolgender Gerinnung im Lymphknoten ist denkbar.

Bei der Betrachtung des schicksalbestimmenden Krankheitsverlaufes der Tiere ergibt sich ein weniger klares Bild. Erstaunlicherweise sind die Tumoren von Tieren, welche zwar nicht an den Folgen der Mammatumorerkrankung gestorben sind, aber neue Mammatumoren, Rezidive oder Metastasen zeigen, in der Regel häufiger frei von extravasalen Fibrinablagerungen und Thrombosierungen sind als die von Tieren ohne neue Mammatumoren, Rezidive oder Metastasen. Im Widerspruch dazu steht die Erkenntnis, daß Tiere, bei denen die Mammatumorerkrankung letztlich zum Tode führte, sehr häufig von intratumoralen Thrombosierungen und extravasalen Fibrinablagerungen betroffen sind.

#### **4.4.3. Schlußfolgerungen: Theorien zur Entstehung und Bedeutung von extravasalen Fibrinablagerungen und Thrombosierungen in Mammatumoren i.e.S. der Hündin**

##### *4.4.3.1. Mögliche Ursachen und Bedeutung extravasaler Fibrinablagerungen*

In einigen Mammatumoren des Hundes findet sich extravasal gelegenes Fibrin. Dies belegt eine gewisse Hyperpermeabilität der Gefäße, da diese die Voraussetzung für die Bildung extravasalen Fibrins ist (DVORAK *et al.* 1984) und auch bei Mammatumoren anderer Spezies beschrieben wurde (BROWN *et al.* 1988a, DVORAK 1986). Gefäße in sonstigem Mammagewebe, ausgenommen in Mastitiden, sind jedoch offensichtlich nicht oder extrem selten hyperpermeabel. Die Menge des dargestellten Fibrins in den Mammatumoren ist jedoch gering. Dies kann mehrere Ursachen haben, wobei eine nicht sehr ausgeprägte Gefäßpermeabilität am wahrscheinlichsten ist, da hieraus eine geringe absolute Fibrinbildung resultiert. Daneben kommt eine rasante Fibrinolyse in Betracht, die zu einer geringen Fibrinnettoakkumulation führt (DVORAK 1986, COSTANTINI und ZACHARSKI 1993, DAMJANOVICH *et al.* 1994). Möglich ist auch, daß keine Oberfläche zur Bildung des Prothrombinasekomplexes vorhanden ist, wie es von COSTANTINI *et al.* (1991b) für Mammatumoren der Frau in Betracht gezogen wurde. Bei dieser Vermutung bliebe abzuklären, warum auch die Zellen benigner Neoplasien und von Tumoren, die begleitendes Stroma beherbergen, diese nach DVORAK (1986) und DVORAK (1987) fundamentale Fähigkeit verloren haben sollten.

Die von DVORAK *et al.* (1979), DVORAK (1986) und DVORAK *et al.* (1995) entwickelten und für Tumoren mit hohem Fibringehalt von den meisten Autoren angewendeten Theorien über die tumorbiologische Bedeutung von Fibrin können nicht auf Mammatumoren der Hündin übertragen werden. Die gefundenen Fibrinmengen machen nur bei einem Siebtel aller Tumoren einen nennenswerten Anteil der Tumorphäche aus und befinden sich bei drei Vierteln

der Tumoren mit extravasalen Fibrinablagerungen nicht im Kapselgebiet, wo typischerweise Fibrin liegt, welches eine wachstumsfördernde Funktion innehat (IDELL *et al.* 1995). Durch die gewählte Methodik kann die Fibrinmenge allerdings theoretisch unterschätzt werden (vgl. Kapitel 4.1.4.3., S. 92). Außerdem ist nicht auszuschließen, daß Fibrin zwar in Mammatumoren der Hündin in großer Menge gebildet wird, die Nettoakkumulation jedoch aufgrund einer gesteigerten Fibrinolyse gering ist (s. Kapitel 4.4.3.1., S. 103).

Da sich die wenigen beobachteten Fibrinablagerungen oft in Kontakt mit Nekrosen, Blutungen oder Entzündungen befinden, stellen extravasale Fibrinablagerungen in Mammatumoren der Hündin vor allem ein mit diesen Tumormerkmalen assoziiertes Epiphänomen dar. Auch Thrombosierungen müssen als auslösendes Agens für extravasale Fibrinablagerungen diskutiert werden (vgl. Kapitel 4.4.2.2., S. 97). Ob möglicherweise von den Tumoren gebildete Substanzen Einfluß auf die Blutgerinnung haben und welche Rolle sie spielen, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Das Merkmal "extravasale Fibrinablagerungen" ist also trotz der Zusammenhänge mit der Tumorklassifikation und der Punktzahl nicht als zusätzliches Hilfsmittel zur Einteilung von Tumoren einsetzbar. Auch als Prognosekriterium scheidet es aus, da es wahrscheinlich nur ein Begleitumstand anderer, mit einer schlechteren Prognose korrelierten Merkmale ist, wie Nekrose (PARHAM *et al.* 1988) oder *Angiosis carcinomatosa* (GUTBERLET 1994). Auch eine tumorbiologische Rolle extravasaler Fibrinablagerungen scheint nicht gegeben. Lediglich der deutliche Zusammenhang zwischen dem Gehalt eines Tumors an extravasalem Fibrin und dem Vorliegen von Metastasen im Inguinallymphknoten bietet Anlaß für weitere Forschung.

#### 4.4.3.2. Mögliche Ursachen und Bedeutung von Thrombosierungen

Die Hauptursache für die Bildung von Thrombosierungen in Mammatumoren der Hündin dürfte in Gefäßalterationen begründet sein, wie sie bei Mammatumoren anderer Spezies beschrieben wurden. Eine zu einer gestörten Rheologie führende abnormale Gefäßarchitektur (VOGEL 1965, JAIN 1988, LESS *et al.* 1991) ist ebenso vorhanden wie Endothelschäden (DVORAK *et al.* 1981). Die seit VIRCHOW (1856) bekannten Voraussetzungen zur Bildung von Thrombosierungen sind in Mammatumoren demnach erfüllt. Die von LESS *et al.* (1991), JAIN (1988) und VAUPEL *et al.* (1989) beschriebenen Folgen der Gefäßalterationen lassen auch einen wechselnden Oxygenierungsgrad des Gefäßendothels vermuten. Dies dürfte nach den Erkenntnissen von GERTLER *et al.* (1991) einen weiteren Beitrag zur Bildung intratumoraler Thrombosierungen leisten. Da die Thrombosierungen ihrerseits die Hypoxie verstärken, entsteht an dieser Stelle ein *circulus vitiosus*. Inwieweit von Tumorzellen gebildete Prokoagulantien diesen Effekt verstärken, bedarf der weiteren Klärung. Auch Cytokine, wie von CLAUSS (1990) und WOJTUKIEWICZ *et al.* (1991) als verantwortlich für das Entstehen von intravasalen Fibrinablagerungen vermutet, könnten eine Rolle spielen.

Zwischen der Thrombosierungsgruppe eines Tumors und den nach BOSTOCK (1976), GUTBERLET (1994) und BUSCH (1993) prognostisch auswertbaren Merkmalen Tumorgöße, Vorliegen einer *Angiosis carcinomatosa*, Punktzahl und Lymphknotenstatus besteht nach den Ergebnissen der statistischen Tests vermutlich ein Zusammenhang, der jedoch aufgrund der breiten Streuung der Ergebnisse nie eindeutig ist. Zwischen dem Krankheitsverlauf bei einem Individuum und der Thrombosierungsgruppe seiner Tumoren ist kein Zusammen-

hang nachweisbar. Der Aufwand, welcher zum Nachweis der intratumoralen Thrombosierungen eingesetzt werden muß, wird durch die nur ungenauen Hinweise zur Prognose im Einzelfall nicht gerechtfertigt. Demnach ist die Thrombosierungsgruppe als Prognosemerkmal bei der Mammatumorerkrankung des Hundes nicht oder nur sehr eingeschränkt zu verwenden.

Im Gegensatz zu extravasalen Fibrinablagerungen in Mammatumoren der Hündin scheinen Thrombosierungen einen tumorbiologischen Effekt zu haben. Sie stellen wahrscheinlich einen entscheidenden Faktor bei der Nekrosebildung in einigen davon betroffenen Mammatumoren des Hundes dar (vgl. Kapitel 4.4.2.3., S. 99f) und bestätigen somit, daß die von CLAUSS *et al.* (1990), DE KOSSODO *et al.* (1995) und MUSIANI *et al.* (1996) im Experiment provozierten Effekte auch bei Spontantumoren eine Rolle spielen. Auch ein thrombozyteninduzierter fördernder Effekt auf das Tumorwachstum über die von HARA *et al.* (1980) und BELLOC *et al.* (1995) beschriebenen Mechanismen ist möglich, ebenso wie Erhöhung der Tumorinvasivität durch die thrombosierungsinduzierte Hypoxie (GRAHAM *et al.* 1999). Es stellt sich also die Frage, ob Thrombosierungen in Mammatumoren des Hundes das Schicksal des Tumors und umgekehrt das des Wirtstieres in der Bilanz positiv oder negativ beeinflussen. Eine weitere Erforschung dieser Phänomene, vor allem in Form von Studien über den Verlauf von Thrombosierungs- und Nekrosebildung in Tumoren *in vivo* und das weitere Schicksal des Tumors, erscheinen lohnenswert.