

5. ZUSAMMENFASSUNG

NACHWEIS UND MÖGLICHE BEDEUTUNG VON THROMBOSIERUNGEN UND EXTRAVASALEN FIBRINABLAGERUNGEN IN MAMMATUMOREN DER HÜNDIN

Viele Neoplasien interagieren auf mannigfaltige Art und Weise mit dem Blutgerinnungs- und Fibrinolyse-System des Wirtsorganismus. Extravasale Fibrinablagerungen in Tumoren wird eine wachstumsfördernde Wirkung zugesprochen, intratumorale Thrombosierungen können theoretisch das Gegenteil bewirken. Da Mammatumoren die häufigste Krebserkrankung der Hündin sind, soll festgestellt werden, ob in ihnen extravasale Fibrinablagerungen und Thrombosierungen auftreten, und wenn ja, welche Bedeutung ihnen zukommen könnte.

Da sich in der Literatur keine Angaben über die eindeutige Darstellung von extravasalen Fibrinablagerungen und Thrombosierungen im formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe von Hunden finden, wird zunächst eine entsprechende Methode ermittelt.

Gepriift werden die histologischen Methoden zur Fibrindarstellung nach LADEWIG (1938), LENDRUM *et al.* (1962), modifiziert nach PUSEY und EDWARDS (1978), SHOOBRIDGE (1983) und GARVEY *et al.* (1987) und der immunhistochemische Nachweis von Fibrin mit Hilfe der APAAP-Methode nach CORDELL (1984), modifiziert nach WALTER (1999). Hierzu wird ein gegen die β -Kette des Fibrins des Menschen gerichteter monoklonaler Antikörper (Antikörper no. 350; American Diagnostica, Greenwich, CT, USA) eingesetzt. Verschiedene Antikörperverdünnungen zwischen 1:20 und 1:200 sowie verschiedene Methoden zur Antigen-demaskierung (Proteaseverdauung, Erhitzung im Autoklaven oder im Mikrowellengerät) werden auf ihre Eignung zum Einsatz an Gewebsschnitten von Hunden untersucht.

Optimale Ergebnisse werden mit der APAAP-Methode erzielt, wenn der Antikörper in der Verdünnung 1:50 eingesetzt und der zu untersuchende Gewebsschnitt vom Hund zuvor in Citratpuffer eingestellt im Mikrowellengerät bei 600 W für 2x5 min erhitzt wird. Diese Methode erlaubt eine spezifische Darstellung auch kleiner Fibrinmengen. In Fällen, in denen nicht erkennbar ist, ob das Fibrin sich innerhalb oder außerhalb eines Gefäßes befindet, wird an einem Parallelschnitt die APAAP-Doppelmarkierung durchgeführt. Hierbei wird eine gleichzeitige Darstellung von Gefäßendothelien und Fibrin, ersteres mittels eines Antikörpers gegen den von-Willebrand-Faktor, vorgenommen. Als Chromogene dienen Fast Blue und Fast Red (in dieser Reihenfolge), die Gegenfärbung erfolgt mit Eisenhämatoxylin nach Weigert. Um nach dem Eindecken der immunhistochemisch markierten Schnitte das Eindringen von Luft unter die Deckgläser zu vermindern, werden diese mit farblosem Nagellack ummantelt.

Die geprüften histologische Methoden hingegen sind zum Nachweis von Fibrin, insbesondere von kleinen Mengen, ungeeignet, da Verwechslungsgefahr mit anderen, ähnlich angefärbten Strukturen besteht. Die Methode nach SHOOBRIDGE (1983) ermöglicht jedoch eine Altersbestimmung von Fibrin, wenn dessen Lage im Gewebsschnitt bekannt ist. Diese Färbung führt zu optimalen Ergebnissen, wenn sie dahingehend modifiziert wird, daß die dreißigminütige Vorbehandlung in erhitztem Picro-Formol-Primer durch eine fünfminütige in gesättigter wässriger Pikrinsäure bei Raumtemperatur ersetzt wird.

Es liegt Gewebe aus einer oder mehreren Total- oder Teilmammektomie(n) von 84 Hunden vor. Von 79 dieser Tiere werden insgesamt 269 Mammatumoren im engeren Sinne untersucht, von einigen Tieren auch Mammatumoren im weiteren Sinne, unverändertes oder nichtneoplastisch verändertes Mammagewebe oder Inguinallymphknoten. Die Tiere werden nach ihrer ersten Operation durchschnittlich knapp über zwei Jahre überwacht. Die genannten Gewebe werden routinemäßig H.E. gefärbt und der oben beschriebenen immunhistochemischen Fibrindarstellung unterzogen. Im Falle der fibrinpositiven Tumoren wird ein Parallelschnitt zur gleichzeitigen Gefäßdarstellung doppelmarkiert. In Fällen, bei denen eine postoperative Entstehung dargestellter Thrombosierungen möglich erscheint, wird ein weiterer Parallelschnitt mit der modifizierten SHOOBRIDGE-Methode gefärbt.

Die Mehrzahl der Tumoren (60,97%) ist frei von extravasalen Fibrinablagerungen und Thrombosierungen. Extravasale Fibrinablagerungen lassen sich in 31,60% aller Tumoren darstellen, eine oder mehrere Thrombosierungen in 36,43%. In unverändertem oder nichtneoplastisch verändertem Mammagewebe treten im Material der vorliegenden Untersuchung nur sehr selten extravasales Fibrin und in keinem Falle Thrombosierung(en) auf.

Zwischen folgenden Merkmalen der untersuchten Tumoren lassen die Ergebnisse statistischer Tests einen Zusammenhang vermuten:

- zunehmende Menge an extravasalen Fibrinablagerungen und zunehmende TumorgroÙe, Vorhandensein eines Ulkus, Vorhandensein massiver eitriger Entzündung, steigender Nekrosegrad, vermehrte Blutungen, Vorhandensein von oder Verdacht auf Angiosis carcinomatosa.
Extravasale Fibrinablagerungen treten nicht in benignen Tumoren auf. Maligne Tumoren, welche frei von extravasalen Fibrinablagerungen sind, sind häufig von einer nach Wertungspunkten eher geringen Malignität.
Schlecht vaskularisierte Tumoren haben selten extravasale Fibrinablagerungen.
Tumoren aus Mammaleisten, deren ipsilateraler Inguinallymphknoten Metastasen aufweist, haben häufiger extravasale Fibrinablagerungen. Dies gilt auch für Tumoren von Tieren mit fatalem Krankheitsverlauf.
Tumoren ohne extravasale Fibrinablagerungen stammen von im Schnitt jüngeren Tieren.
Kastrierte Tiere sind häufiger von extravasalen Fibrinablagerungen betroffen als intakte.
- zunehmende Zahl an Thrombosierungen und zunehmende TumorgroÙe, Vorhandensein eines Ulkus, Vorhandensein massiver eitriger Entzündung, steigender Nekrosegrad, vermehrte Blutungen, Vorhandensein von oder Verdacht auf Angiosis carcinomatosa.
Thrombosierungen treten nur sehr selten in benignen Tumoren auf. Maligne Tumoren, welche frei von Thrombosierungen sind, sind häufig von einer nach Wertungspunkten eher geringen Malignität.
Tumoren aus Mammaleisten, deren ipsilateraler Inguinallymphknoten Metastasen aufweist, zeigen häufiger Thrombosierungen.
Tumoren ohne Thrombosierungen stammen von im Schnitt jüngeren Tieren.
Kastrierte Tiere sind häufiger von intratumoralen Thrombosierungen betroffen als intakte.
- Nekrosefreiheit und vergleichsweise geringe TumorgroÙe, niedrige Gefäßdichte.

Zwischen folgenden Merkmalen der untersuchten Tumoren ist kein Zusammenhang nachweisbar:

- extravasale Fibrinablagerungen und Tumorlokalisation, Operationszahl (erste bzw. einzige oder Folgeoperation), fibrinpositive Makrophagen im Tumor.
- Thrombosierungen und Tumorlokalisation, Operationszahl (erste bzw. einzige oder Folgeoperation), fibrinpositive Makrophagen im Tumor, Gefäßdichte, Krankheitsverlauf.

Zwischen Tumormerkmalen, welche auf eine zunehmende Bösartigkeit des Tumors hinweisen, und der Häufigkeit von extravasalen Fibrinablagerungen oder Thrombosierungen besteht also in dieser Studie ein Zusammenhang. Aufgrund der breiten Streuung der Ergebnisse und der vergleichsweise aufwendigen Nachweismethode sind jedoch Thrombosierungen oder extravasale Fibrinablagerungen als unabhängige Klassifikationshilfsmittel oder Prognosemerkmale ungeeignet.

Extravasale Fibrinablagerungen stellen in Mammatumoren des Hundes wahrscheinlich lediglich ein nekrose- und blutungsassoziiertes Epiphänomen dar. Die Menge extravasalen Fibrins ist zu gering, als daß eine tumorwachstumsfördernde Wirkung angenommen werden könnte.

Thrombosierungen hingegen sind möglicherweise in einigen der untersuchten Tumoren für die Entstehung von Nekrosen verantwortlich, da ein steigender Nekrosegrad meist mit einer größeren Zahl von Thrombosierungen einhergeht, nicht jedoch mit einer geringen Gefäßdichte. Umgekehrt können Thrombosierungen indirekt das Tumorwachstum und die -invasivität fördern, so daß sich die Frage stellt, ob Thrombosierungen in Mammatumoren des Hundes das Schicksal des Tumors und umgekehrt das des Wirtstieres in der Bilanz positiv oder negativ beeinflussen.

Als mögliche Auslöser für die intravasale Gerinnung kommen Gefäßaberrationen und vom Tumor gebildete gerinnungsbeeinflussende Substanzen in Frage.

Weitergehende Untersuchungen über die Ursachen und Folgen intratumoraler Thrombosierungen erscheinen lohnenswert.