

JULIA GEDON

DIGNITÄT KANINER MAMMATUMOREN

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei der Autorin dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autorin oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2023

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2023

© 2023 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Wehrend

Dignität kaniner Mammatumoren

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Julia Gedon

Tierärztin aus Neubeuern (Bayern)

Gießen 2023

Mit Genehmigung des Fachbereichs der Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Axel Wehrend
Prof. Dr. Monika Kressin
Prof. Dr. Philipp Olias

Tag der Disputation: 06.06.2023

INHALTSVERZEICHNIS**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	4
2.1 Risikofaktoren für die Entwicklung von Mammatumoren	4
2.1.1 Alter	4
2.1.2 Geschlecht	5
2.1.2 Rasse	7
2.1.3 Ernährung und Umgebung	8
2.2 Beeinflussung des biologischen Charakters	9
2.2.1 Alter	10
2.2.2 Geschlecht	11
2.2.3 Rasse	13
2.2.4 Ernährung und Umgebung	14
2.2.5 Tumorgröße	14
2.2.6 Tumorzahl	16
3. VERÖFFENTLICHUNGEN	18
3.1 Publikation 1	18
3.2 Publikation 2	26
4. DISKUSSION	35
4.1 Diskussion der Fragestellung	35
4.2 Diskussion der Methodik	37
4.3 Diskussion der Ergebnisse	43
4.3.1 Demographische Faktoren	43
4.3.2 Charakteristika der Mammatumoren	46

4.3.3	Einflüsse auf die Dignität des Tumors	48
5.	ZUSAMMENFASSUNG	53
6.	SUMMARY	55
7.	LITERATURVERZEICHNIS	57
8.	DANKSAGUNG	77
9.	ERKLÄRUNG	78

Abkürzungsverzeichnis

BRCA 1	Breast cancer gene 1 oder Brustkrebsgen 1
bspw.	Beispielsweise
bzgl.	Bezüglich
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
cm	Zentimeter
kg	Kilogramm
mm	Millimeter
n	Anzahl
WHO	Weltgesundheitsorganisation/ World Health Organisation
z.B.	Zum Beispiel
>	Größer als
≥	Größer als oder gleich
<	Kleiner als
≤	Kleiner als oder gleich

1. Einleitung

Mammatumoren stellen die häufigste Tumorerkrankung der unkastrierten Hündin dar (Brodey, Fidler et al. 1966, Dorn, Taylor et al. 1968, MacVean, Monlux et al. 1978, Vascellari, Capello et al. 2016). Die genaue Inzidenz bleibt jedoch unklar (Sorenmo 2003, Egenvall, Bonnett et al. 2005), da sich die Studienpopulationen und vor allem auch die angewandten statistischen Methoden in den Veröffentlichungen deutlich unterscheiden. In einer älteren britischen Studie wird die Inzidenz von Mammatumoren innerhalb einer Population krankensversicherter Hunde mit 205 Fällen / 100.000 Hunde / Jahr angegeben (Dobson, Samuel et al. 2002), wohingegen die Inzidenzrate in einer schwedischen Studie um das 5 – 7-fache höher lag (Egenvall, Bonnett et al. 2005). Selbst innerhalb eines Landes variieren die Ergebnisse teilweise drastisch, so geben italienische Studien aus den letzten beiden Jahrzehnten Inzidenzraten von 192 bis über 650 Fälle pro 100.000 Hundejahre an (Merlo, Rossi et al. 2008, Vascellari, Capello et al. 2016, Baioni, Scanziani et al. 2017). In einer norwegischen Studie wird die Inzidenz maligner Mammatumoren bei der Hündin hingegen mit 53% beschrieben (Moe 2001). Als Basis wird hier die ‚Norwegian Canine Cancer Registry‘ genutzt, die auf ca. ein Viertel der Hundepopulation Norwegens zurückgreift.

Insgesamt unterscheiden sich die Studienpopulationen insbesondere hinsichtlich Alter und Rasse sowie auch den möglichen hormonellen Einflüssen bspw. durch unterschiedliche Kastrationszeitpunkte im Leben der Hündin oder durch Östrusunterdrückung (MacVean, Monlux et al. 1978, Priester 1979, Misdorp 1988, Stovring, Moe et al. 1997, Moe 2001), was eine genaue Einschätzung der Inzidenz schwierig macht.

Kanine Mammatumoren begegnen dem Kleintierpraktiker häufig in der Sprechstunde und die Frage nach einer möglichen Prävention ist keine Seltenheit. Endogene Sexualhormone spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese caniner Mammatumoren (Schneider, Dorn et al. 1969, Perez Alenza, Peña et al. 2000), nachdem diese signifikant häufiger bei intakten Hündinnen vorkommen (MacVean, Monlux et al. 1978, Gruntzig, Graf et al. 2016, Vascellari, Capello et al. 2016). Die Kastration stellt daher die wichtigste Form der Prävention dar.

Eine Publikation von Schneider, Dorn et al. (1969) legte die Grundlage für die Annahme, dass alleinig eine frühe Kastration die Entstehung von Mammatumoren unterbinden könne. In der Studie wird postuliert, dass nur eine Kastration vor der 1.

Läufigkeit das relative Risiko, einen Mammatumor zu entwickeln, quasi komplett eliminiere. Hündinnen, die erst nach der 2. Läufigkeit kastriert werden, sollten das gleiche Mammatumor-Risiko wie intakte Hündinnen haben (Schneider, Dorn et al. 1969). Die Folge dieser Studie war, dass insbesondere in den Vereinigten Staaten von Amerika eine Frühkastration zum Standard wurde (Olson, Kustritz et al. 2001, Trevejo, Yang et al. 2011) und damit auch das Mammatumor-Risiko in diesen Ländern signifikant reduziert werden konnte (Sorenmo 2003, Sleeckx, de Rooster et al. 2011). Etliche Studien haben sich über die letzten Jahrzehnte mit dem optimalen Kastrationszeitpunkt zur Prävention von Mammatumoren befasst (Misdorp 1988, Morris, Dobson et al. 1998, Sorenmo, Shofer et al. 2000, Howe, Slater et al. 2001, Hart, Hart et al. 2014, Hart 2016, Beaudu-Lange, Larrat et al. 2021). Die wissenschaftliche Grundlage zur Frühkastration wurde vor allem durch eine Meta-Analyse von 2012, die eine fehlende Beweiskraft der meisten Publikationen zu diesem Thema anführt, in Frage gestellt, wobei ein möglicher protektiver Effekt nicht ausgeschlossen wird (Beauvais, Cardwell et al. 2012). Eine aktuelle Zusammenfassung der Literatur kommt zum Fazit, dass eine Kastration im Allgemeinen, aber insbesondere eine frühe Kastration, das Risiko einen Mammatumor zu entwickeln, reduziert (Stavisky and White 2022). Der protektive Effekt einer späten Kastration zum Zeitpunkt der Mammatumor-Entfernung wurde hingegen in zwei prospektiven Studien diskutiert und für einige Subgruppen postuliert (Kristiansen, Nodtvedt et al. 2013, Kristiansen, Peña et al. 2016).

Trotz der Vorteile einer (frühen) Kastration hinsichtlich einer Reduktion des Risikos einer Mammatumorentstehung sollte das Für und Wider und der Zeitpunkt genau abgewogen werden (Arlt, Wehrend et al. 2017, Urfer and Kaeberlein 2019, Hart, Hart et al. 2020). Das Risiko einer kastrationsbedingten Urininkontinenz, orthopädischer Erkrankungen, Verhaltensstörungen sowie anderer Tumorerkrankungen wie bspw. Lymphome, Mastzelltumoren, Hämangiosarkome oder Osteosarkome kann durch eine Kastration ggf. erhöht sein (Cooley, Beranek et al. 2002, Torres de la Riva, Hart et al. 2013, Hart, Hart et al. 2014, Zink, Farhody et al. 2014, Hart 2016, Pegram, Brodbelt et al. 2019). Zudem sind die Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes bzgl. einer präventiven Kastration zu beachten.

Mammatumoren wurde lange als statische Entitäten angesehen, die entweder gut- oder bösartig sind. Heutzutage wird insbesondere der Tumorumgebung nicht nur

großer Einfluss auf die Tumorentstehung, sondern auch auf Tumor-Progression und Metastasierung zugesprochen (Cichon, Degnim et al. 2010, Place, Jin Huh et al. 2011, Soysal, Tzankov et al. 2015, Sun, Zhao et al. 2017). In der Humanmedizin geht man mittlerweile davon aus, dass sich gutartige hyperplastische Knoten oder präneoplastische Veränderungen, u.a. in Abhängigkeit von stromalen und hormonellen Einflüssen, zu invasiven Karzinomen entwickeln können (Lakhani 1999, Hartmann, Sellers et al. 2005, Cichon, Degnim et al. 2010, Sinn, El Sawaf et al. 2010, Thihe, Iqbal et al. 2013, Hartmann, Degnim et al. 2015, Renshaw and Gould 2016). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in der Tiermedizin gemacht, weshalb die Hündin als Modell für die Brustkrebsforschung dienen kann (Gilbertson, Kurzman et al. 1983, Antuofermo, Miller et al. 2007, Ferreira, Gobbi et al. 2012, Abdelmegeed and Mohammed 2018, Mohammed, Utturkar et al. 2020, de Andres, Caceres et al. 2022). 2009 wurde der Begriff des „*histologischen Kontinuums*“ in der Mammatumorentwicklung des Hundes etabliert, um, in Abhängigkeit von der Tumorgröße, die Transformation von benignen zu malignen Mammatumoren zu beschreiben (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009).

Inwieweit, bei weiterer Größenzunahme, eine weitere maligne Transformation von weniger zu höher malignen Tumoren stattfindet, ist bisher nicht untersucht worden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollen daher folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Gibt es epidemiologische Faktoren (Alter, Sexualstatus, Gewicht), die einen Einfluss auf das Mammatumor-Risiko haben?
- Gibt es einen Unterschied zwischen Patienten mit solitären Mammatumoren im Vergleich zu Patienten mit simultan auftretenden multiplen Mammatumoren?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Malignität und lässt sich bei malignen Tumoren eine Zunahme des Malignitätsgrades in Abhängigkeit von der Tumorgröße feststellen?
- Hat der Sexualstatus (kastriert vs. intakt) einen Einfluss auf eine maligne Transformation und kommt damit Sexualsteroiden möglicherweise eine Rolle als Promoter in der malignen Transformation zu?

2. Literatur

2.1 Risikofaktoren für die Entwicklung von Mammatumoren

In der Humanmedizin werden diverse Risikofaktoren für die Brustkrebsentstehung diskutiert (Hortobagyi, de la Garza Salazar et al. 2005, Sun, Zhao et al. 2017, Momenimovahed and Salehiniya 2019), welche sich unter anderem in folgende Untergruppen aufteilen lassen:

- Demographisch (bspw. Alter, Geschlecht, Ethnizität)
- Reproduktions- bzw. hormonell assoziiert (bspw. Hormonbehandlung, Alter bei der Menopause, Zyklus, gutartige Veränderungen im Brustgewebe)
- Erblisch-bedingt (familiäre Häufung, Genmutationen)
- Life-Style-assoziiert (bspw. Übergewicht, Diät, Alkoholkonsum, ...)
- Andere (bspw. Luftverschmutzung, Strahlung, sozioökonomischer Status, ...)

Einige dieser Risikofaktoren (wie Alter, Geschlecht, Rasse, Ernährung und Umgebungsfaktoren) werden auch beim Hund beschrieben (Andrade Fábio HE 2010, Salas, Marquez et al. 2015, Severe, Marchand et al. 2015, Zheng, Du et al. 2022) und sollen näher beleuchtet werden.

2.1.1 Alter

Mammatumoren treten nur selten bei Hunden unter 4 Jahren auf (Taylor, Shabestari et al. 1976, Gamlem, Nordstoga et al. 2008, Schmidt and Kessler 2013, Vascellari, Capello et al. 2016). In der Regel handelt es sich um eine Erkrankung der älteren Hündin, mit einem medianen Alter bei Diagnose von 8 - 11 Jahren (Schneider 1970, Priester 1979, Boldizsar, Szenci et al. 1992, Hellmen, Bergstrom et al. 1993, Gottwald 1998, Perez Alenza, Rutteman et al. 1998, Sorenmo, Shofer et al. 2000, Stratmann, Failing et al. 2008, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Gunnes, Borge et al. 2015, Salas, Marquez et al. 2015, Bianchi, Morello et al. 2022, Zheng, Du et al. 2022). In einer italienischen Studie, die auf einem Register von Tumorpatienten im Rahmen einer Kollaboration norditalienischer Tierärzte mit einer lokalen Behörde beruht, zeigten ca. 60% der registrierten Hunde zwischen 8 und 13 Jahren einen Mammatumor (Vascellari, Capello et al. 2016). In einer etwas älteren schwedischen Studie hatten 1%, 6% bzw. 13% aller sechs-, acht- und zehnjährigen krankenversicherten Hündinnen mindestens einen Mammatumor (Egenvall, Bonnett et al. 2005). Eine

progressive Inzidenz für Mammatumoren mit zunehmendem Alter konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden (Taylor, Shabestari et al. 1976, Boldizar, Szenci et al. 1992, Gamlem, Nordstoga et al. 2008, Salas, Marquez et al. 2015, Zheng, Du et al. 2022). Das Alter mit der höchsten Mammatumor-Inzidenz scheint rasseabhängig zu sein (Moe 2001, Gunnes, Borge et al. 2015, Sorenmo, Worley et al. 2020). So lag in einer Studie das mittlere Alter bei Mammatumorentfernung beim Boxer bei 6,5 Jahren, beim Deutschen Schäferhund bei 8,3 Jahren und beim Bichon Frisé bei 12,1 Jahren (Gunnes, Borge et al. 2015). Es wird davon ausgegangen, dass größere und damit schwerere Rassen insgesamt eine kürzere Lebenserwartung haben (Greer, Canterbury et al. 2007) und damit auch bei der Tumordiagnose jünger sind (Sorenmo, Worley et al. 2020).

2.1.2 Geschlecht

Mammatumoren gehören zu den häufigsten Tumoren der Hündin (Dorn, Taylor et al. 1968, Vascellari, Capello et al. 2016, Baioni, Scanziani et al. 2017, Crescio, Ru et al. 2022, Zheng, Du et al. 2022). In 3 Studien, die die Hündinnen über ihre gesamte Lebenszeit begleiteten, entwickelten 35 - 71% der Hündinnen einen Mammatumor (Moulton, Rosenblatt et al. 1986, Benjamin, Lee et al. 1999, Beaudu-Lange, Larrat et al. 2021). Rüden hingegen sind nur sehr selten betroffen (Gottwald 1998, Benjamin, Lee et al. 1999, Saba, Rogers et al. 2007, Gamlem, Nordstoga et al. 2008, Vascellari, Baioni et al. 2009, Bearss, Schulman et al. 2012, Kwon, Yoo et al. 2017, Silva, Kluthcovsky et al. 2019, Zheng, Du et al. 2022) und erkrankten in den meisten Fällen an gutartigen Tumoren (Saba, Rogers et al. 2007, Bearss, Schulman et al. 2012), wobei kürzlich auch ein inflammatorisches Karzinom beim Rüden beschrieben wurde (Silva, Kluthcovsky et al. 2019).

In etlichen Publikationen konnte über die letzten Jahrzehnte gezeigt werden, dass Mammatumoren deutlich häufiger bei intakten als bei ovariektomierten Hündinnen auftreten (MacVean, Monlux et al. 1978, Sonnenschein, Glickman et al. 1991, Gottwald 1998, Moe 2001, Gruntzig, Graf et al. 2016, Hart 2016, Vascellari, Capello et al. 2016, Zheng, Du et al. 2022). Insbesondere in den USA, wo häufig eine sehr frühe Kastration vorgenommen wird (Olson, Kustritz et al. 2001, Trevejo, Yang et al. 2011), ist die Inzidenz für Mammatumoren deutlich niedriger im Vergleich zu Ländern, in

denen dies nicht gängige Praxis ist (Moe 2001, Sorenmo 2003, Egenvall, Bonnett et al. 2005, Sleeckx, de Rooster et al. 2011). Insgesamt kann man also davon ausgehen, dass das Mammatumor-Risiko bei ausbleibender Kastration bzw. unter dem Einfluss von Sexualhormonen erhöht ist.

In bis zu 70% der Fälle liegt zeitgleich mehr als ein Tumor in der Mammaleiste vor (Fowler, Wilson et al. 1974, Benjamin, Lee et al. 1999, Stratmann, Failing et al. 2006, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Gunnes, Borge et al. 2015). Ursächlich mag hier zum einen ein genereller hormoneller Einfluss auf die gesamte Mammaleiste sein, welche unabhängig zu Parenchymveränderungen in diversen Mammakomplexen führt. Zum anderen müssen lokale Einflüsse oder ein Feld-Effekt in Betracht gezogen werden (Chai and Brown 2009, Schmidt and Gedon 2022). Untersuchungen mit großen Fallzahlen zum Einfluss des Reproduktionsstatus auf die zeitgleiche Entwicklung multipler Mammatumoren liegen nicht vor. In drei Publikationen konnte gezeigt werden, dass 50 - 67% der intakten Hündinnen mehr als einen Tumor aufwiesen (Benjamin, Lee et al. 1999, Stratmann, Failing et al. 2006, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009). In einer weiteren Studie, die sich mit der Pathogenese multipler Mammatumoren beschäftigt, hatten 23% der 213 Hündinnen mehr als einen Mammatumor, wovon 80% unkastriert waren (Gunnes, Borge et al. 2015).

In zwei prospektiven Studien, welche den Effekt einer zeitgleichen Ovariohysterektomie zum Zeitpunkt der Mastektomie untersuchten, konnte nur teilweise ein protektiver Effekt auf die Entstehung weiterer Mammatumoren nachgewiesen werden (Kristiansen, Nodtvedt et al. 2013, Kristiansen, Peña et al. 2016): Patienten mit benignen Mammatumoren, die zeitgleich mit der Tumorentfernung ovariohysterektomiert wurden, entwickelten nur etwa halb so viele neue Mammatumoren, im Vergleich zu Patienten, die unkastriert blieben (Kristiansen, Nodtvedt et al. 2013). Bei den Karzinom-Patienten konnte nur bei einer Subpopulation von Hunden ein positiver Effekt erzielt werden: Hündinnen mit malignen Grad-2-Tumoren oder Östrogen-Rezeptor-positiven malignen Tumoren, bzw. Hündinnen mit erhöhten 17-beta-Östradiol-Werten, profitierten zum Zeitpunkt der Tumorentfernung von einer zeitgleichen Kastration (Kristiansen, Peña et al. 2016).

Auch die exogene Gabe von Gestagenen und/oder Östrogen-Gestagen-Präparaten führt zu einem dosis-assozierten gesteigerten Mammatumor-Risiko (Geil and Lamar 1977, Giles, Kwapien et al. 1978, Frank, Kirton et al. 1979, Kwapien, Giles et al. 1980,

Concannon, Spraker et al. 1981, Misdorp 1988, Selman, Mol et al. 1994, Selman, van Garderen et al. 1995, Stovring, Moe et al. 1997). In einer norwegischen Studie hatten Hündinnen, welche zur Läufigkeitsunterdrückung mit Medroxyprogesteronacetat behandelt worden waren, im Vergleich zu nicht-behandelten Hündinnen ein 2,3-fach erhöhtes Risiko für Mammatumoren (Stovring, Moe et al. 1997). Ein Zusammenhang zwischen exogener Gestagen-Gabe und der endogenen Sekretion von Wachstumshormon wird als Ursache für die Mammatumorentstehung diskutiert (Concannon, Altszuler et al. 1980, Concannon, Spraker et al. 1981, Rutteman 1992, Selman, Mol et al. 1994, Mol, van Garderen et al. 1996).

2.1.2 Rasse

Mammatumoren werden vermehrt bei reinrassigen Hunden diagnostiziert (Itoh, Uchida et al. 2005, Salas, Marquez et al. 2015, Vascellari, Capello et al. 2016, Burrai, Gabrieli et al. 2020, Zheng, Du et al. 2022). Zudem scheint das Risiko für Mammatumoren auch rasseabhängig zu sein; die Angaben zu Prädispositionen sind jedoch in den Publikationen sehr unterschiedlich. So wird in einigen Studien eine erhöhte Inzidenz für kleine Hunderassen angegeben (Salas, Marquez et al. 2015, Gruntzig, Graf et al. 2016, Komazawa, Sakai et al. 2016, Burrai, Gabrieli et al. 2020). In einer Schweizer Studie wird das Risiko bei kleinwüchsigen Rassen als dreimal so hoch im Vergleich zu größeren Rassen angegeben (Gruntzig, Graf et al. 2015). In einer schwedischen Studie, die die Inzidenz für Pyometra und Mammatumoren beim Hund untersuchte und über 260.000 Tiere bis zu einem Lebensalter von 10 Jahren inkludierte, konnte dies nicht verifiziert werden (Jitpean, Hagman et al. 2012): Die drei am häufigsten von einem Mammatumor betroffenen Rassen waren Leonberger, Dobermann und Irischer Wolfshund.

In mehreren Studien konnte eine Überrepräsentation für Spaniel-Rassen, Terrier, Setter, Deutsche Schäferhunde und Pudel gezeigt werden (MacVean, Monlux et al. 1978, Priester 1979, Kurzman and Gilbertson 1986, Sorenmo, Shofer et al. 2000, Moe 2001, Egenvall, Bonnett et al. 2005, Dias, Andrade et al. 2016, Rodriguez, Santana et al. 2022, Zheng, Du et al. 2022). In einer Untersuchung über eine Beagle-Kolonie entwickelten 71% der Hündinnen im Laufe ihres Lebens mindestens einen Mammatumor (Benjamin, Lee et al. 1999).

Aufgrund der länderspezifischen Rassevorlieben, wie bspw. kleine bis mittelgroße Rassen im asiatischen Raum, müssen die Ergebnisse zu Rasseprädispositionen mit Vorsicht interpretiert werden (Komazawa, Sakai et al. 2016).

2.1.3 Ernährung und Umgebung

In der Humanmedizin geht man davon aus, dass u.a. der Ernährung sowie Umweltkarzinogenen eine große Rolle in der Tumorentstehung zugeschrieben werden kann. Insbesondere einer Diät reich an Fettsäuren sowie einer Adipositas wird eine metabolische Dysregulation und prokarzinogene Wirkung nachgesagt (Arendt, McCready et al. 2013, Zhu, Aupperlee et al. 2017). Dies wird zum einen über inflammatorische Zytokine, Adipokine und aktivierte Makrophagen, welche zu gesteigerter Angiogenese, Entzündung und stromalen Veränderungen in der Tumorzell-Umgebung führen, vermittelt (Hursting and Dunlap 2012, Arendt, McCready et al. 2013, Zhu, Aupperlee et al. 2017, Garcia-Estevez and Moreno-Bueno 2019), zum anderen konnte gezeigt werden, dass die im Fettgewebe verstärkt vorhandene Aromatase-Aktivität zu vermehrter lokaler Östradiol-Synthese und damit parakriner Stimulation auf das umgebende Mammaparenchym führt (Enriori and Reforzo-Membrives 1984, Bulun, Mahendroo et al. 1994, Simpson and Zhao 1996, Cleary, Grossmann et al. 2010, Lim, Im et al. 2015).

Dieselben Mechanismen scheinen beim Hund eine Rolle zu spielen (Marchi, Vendramini et al. 2022). Auch bei der Hündin geht man von einem Zusammenhang zwischen Übergewicht im Junghundalter oder einem Jahr vor der Diagnose und einem gesteigerten Tumorrisiko und ggf. schlechterer Prognose aus (Shofer, Sonnenschein et al. 1989, Sonnenschein, Glickman et al. 1991, Perez Alenza, Rutteman et al. 1998). Vor allem eine selbstgekochte Fütterung (mit viel rotem Fleisch) führte im Vergleich zu einer kommerziellen Diät zu einem gesteigerten Body Condition Score und damit auch einem erhöhten Mammatumor-Risiko (Perez Alenza, Rutteman et al. 1998, Tesi, Millanta et al. 2020). Auch in der Humanmedizin wird ein gesteigertes Brustkrebsrisiko beim vermehrten Konsum von rotem Fleisch bzw. verarbeiteten Fleischwaren diskutiert (Steck, Gaudet et al. 2007, Farvid, Cho et al. 2014, Farvid, Cho et al. 2015, Mourouti, Kontogianni et al. 2015, Parada, Steck et al. 2017, Lo, Park et al. 2020, Omofuma, Steck et al. 2022), wohingegen der Konsum von Fisch, Geflügelfleisch oder

Hülsenfrüchten das Risiko reduzieren soll (Farvid, Cho et al. 2014, Lo, Park et al. 2020, Omofuma, Steck et al. 2022).

Auch eine Vielzahl von Umweltkarzinogenen (bspw. Pyrethroide oder polychlorierte Bisphenole) werden mit dem Auftreten von kaninen Mammatumoren assoziiert (Rudel, Attfield et al. 2007, Andrade Fábio HE 2010, Severe, Marchand et al. 2015). Ihre genaue Rolle in der Karzinogenese ist, wie auch in der Humanmedizin, nicht abschließend geklärt (Brody, Moysich et al. 2007, Gray, Rasanayagam et al. 2017, Rodgers, Udesky et al. 2017, Gautam, Sood et al. 2020, Pullella and Kotsopoulos 2020, Schmidt and Gedon 2022).

Mykotoxinen wie Zearalenon und Aflatoxinen wird ebenfalls eine Rolle in der Mammatumor- und Brustkrebsentstehung zugesprochen (Belhassen, Jimenez-Diaz et al. 2015, Frehse, Martins et al. 2015, Yip, Wan et al. 2017). Zearalenon hat eine strukturelle Ähnlichkeit zu 17-beta-Östradiol und kann über die Bindung an den Östrogenrezeptor eine östrogene Wirkung induzieren (Belli, Bellaton et al. 2010, Molina-Molina, Real et al. 2014, Rai, Das et al. 2020). Aflatoxin B1 und Aflatoxin M1 werden von der internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) in die Gruppe 1 bzw. 2B der krebserregenden Stoffe eingeteilt (Cancer 2012, Marchese, Polo et al. 2018). Aflatoxin B1-Exposition führt unter anderem zu Mutationen des ras-Proto-Onkogens und des p53-Suppressor-Gens sowie zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Eaton and Gallagher 1994, Shen and Ong 1996, Liu and Wang 2016). Oxidativer Stress wiederum kann zu Tumor-Promotion und Progression führen (Jeziarska-Drutel, Rosenzweig et al. 2013).

2.2 Beeinflussung des biologischen Charakters

Je nach Studie sind etwa 15 - 60% der Mammatumoren des Hundes maligne (Benjamin, Lee et al. 1999, Stratmann, Failing et al. 2006, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Vascellari, Capello et al. 2016). Heutzutage geht man davon aus, dass es, wie beim Brustkrebs der Frau (Hartmann, Sellers et al. 2005, Cichon, Degnim et al. 2010, Sinn, Elsawaf et al. 2010, Renshaw and Gould 2016), auch beim Hund zu einer Progression von benignen Parenchymveränderungen zum malignen Mammatumor kommt („histologisches Kontinuum“) (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009). In der Humanmedizin werden hier sowohl genetische (wie bspw. BRCA1-Mutation) als auch

nicht-genetische Einflussfaktoren (Gewicht, Alkoholkonsum, Hormontherapie etc.) diskutiert (Singletary 2003, Kaminska, Ciszewski et al. 2015, Feng, Spezia et al. 2018). So scheinen bspw. Alter und ethnische Zugehörigkeit einen großen Einfluss auf die Dignität des Tumors und die Prognose zu haben (Dunn, Agurs-Collins et al. 2010, Newman 2014, Chen, Zhou et al. 2016, Shoemaker, White et al. 2018). Ebenso konnte ein Zusammenhang zwischen Östrogen und der Entstehung und Progression von (BRCA1-negativem) Brustkrebs gezeigt werden (Wang, Bai et al. 2018).

2.2.1 Alter

In einigen Studien wird ein Zusammenhang zwischen Alter und Dignität des Tumors diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass maligne Tumoren häufiger bei älteren Hündinnen nachgewiesen werden (Hellmen, Bergstrom et al. 1993, Stovring, Moe et al. 1997, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Gunnes, Borge et al. 2015, Vascellari, Capello et al. 2016, Burrai, Gabrieli et al. 2020, Banchi, Morello et al. 2022, Rodriguez, Santana et al. 2022, Zheng, Du et al. 2022). In einer Studie wird das mediane Alter für einen malignen Tumor mit 9,5 Jahren signifikant höher als für benigne Tumoren (8,5 Jahre; $p = 0,009$) angegeben (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009). Ähnliche Zahlen finden sich auch in einer norwegischen Studie von 2015, in der das mittlere Alter für eine maligne oder benigne Neoplasie der Mamma mit 8,6 Jahren ($\pm 2,4$ Jahre) bzw. 8,1 Jahre ($\pm 2,4$ Jahre) angegeben wird, wohingegen Hündinnen mit einer Hyperplasie des Mammaparenchyms im Durchschnitt nur 7,7 Jahre ($\pm 1,9$ Jahre) alt waren. Es wird jedoch in dieser Publikation keine Angabe zur statistischen Signifikanz dieser Werte gemacht (Gunnes, Borge et al. 2015). Prozentual steigt der Anteil maligner Tumoren von 39% in jüngeren Jahren auf 69% bei älteren Tieren an (Vascellari, Capello et al. 2016). Das Alter wird in einer Studie als bester klinischer Indikator für die Prognose angegeben. So war das Alter bei Mammatumorentfernung sowohl bei uni- als auch multivariabler Analyse signifikant mit tumor-bedingtem Tod assoziiert (Hellmen, Bergstrom et al. 1993).

Auch in einer aktuellen Studie konnten mittels logistischer Regression Alter und Tumorgöße als beste Indikatoren für Malignität bestimmt werden (Burrai, Gabrieli et al. 2020). Patienten mit gutartigen Mammatumoren waren median 9 Jahre alt, wohingegen Patienten mit unterschiedlichen malignen Tumorsubtypen median 10 Jahre und älter waren. In anderen Studien hingegen konnte kein Einfluss des Alters

auf die Dignität nachgewiesen werden (Salas, Marquez et al. 2015, Litterine-Kaufman, Casale et al. 2019, Ariyathna, Aberdein et al. 2022).

2.2.2 Geschlecht

Durch (juvenile) Kastration kann das allgemeine Risiko einen Mammatumor zu entwickeln deutlich reduziert werden (Moe 2001, Sorenmo 2003, Egenvall, Bonnett et al. 2005). So wurden in einer aktuellen Untersuchung von Burrai et al. (2020) über 83% der Mammatumoren bei den intakten Hündinnen diagnostiziert.

In einer weiteren Studie wird gezeigt, dass kastrierte Hündinnen eine signifikant längere krankheitsfreie Überlebenszeit haben (Sorenmo, Durham et al. 2019): Die mediane krankheitsfreie Überlebenszeit wird hier für kastrierte Hündinnen mit 754 Tagen und für Intakte mit 422 Tagen angegeben ($p = 0,026$). Auch die Inzidenz einer Lymphknotenmetastasierung oder eines Tumorrezidivs war für intakte Hündinnen signifikant höher ($p = 0,026$). Die Zeit bis zur Metastasierung oder die Gesamt-Überlebenszeit wurde jedoch vom Kastrationsstatus nicht beeinflusst.

Trotzdem wurde mittels Multivarianzanalyse der Kastrationsstatus als negativ prognostischer Faktor bestimmt (Peña, De Andres et al. 2013). Kastrierte zeigten in dieser Population ein 4,5-fach erhöhtes Risiko für ein Tumorrezidiv oder eine Metastasierung, zudem hatten kastrierte Hündinnen insgesamt eine schlechtere Überlebenszeit. Obwohl in einer aktuellen italienischen Studie etwas mehr als die Hälfte der Tumoren bei der intakten Hündin maligne waren, konnte kein signifikanter Zusammenhang bzgl. der Malignität festgestellt werden ($p = 0,260$). Die Autoren heben jedoch hervor, dass bei intakten Hündinnen eine hohe Prävalenz für benigne Tumoren diagnostiziert wurde, wohingegen bei Kastrierten mit hoher Prävalenz maligne Tumoren auftraten (Burrai, Gabrieli et al. 2020). Auch in einer Studie zu prognostischen Faktoren beim inflammatorischen Mammakarzinom fällt auf, dass dieses mit 70% überproportional häufig bei kastrierten Hündinnen diagnostiziert wird (Marconato, Romanelli et al. 2009).

Andere Studien zeigen keinen signifikanten Einfluss des Reproduktionsstatus auf die Prävalenz, einen malignen Tumor oder höhergradigen Tumor zu entwickeln (Litterine-Kaufman, Casale et al. 2019, Burrai, Gabrieli et al. 2020, Ariyathna, Aberdein et al. 2022, Banchi, Morello et al. 2022). Interessanterweise konnte in einer dieser Studien

aber ein signifikanter Zusammenhang zwischen Kastrationsstatus und Tumorgroße festgestellt werden (Banchi, Morello et al. 2022): So hatten kastrierte Tiere Tumordurchmesser von durchschnittlich $2,75\text{cm} \pm 2,72\text{cm}$, wohingegen intakte Hündinnen mit durchschnittlich $1,76\text{cm} \pm 2,04\text{cm}$ signifikant kleinere Tumoren aufwiesen. Zudem war die krankheitsfreie Überlebenszeit für Hündinnen, die zum Zeitpunkt der Mammatumorentfernung kastriert wurden, signifikant besser, im Vergleich zu intakten Hündinnen ($p = 0,00064$) oder bereits vorher kastrierten ($p = 0,0098$) (Banchi, Morello et al. 2022). Auch in einer älteren Studie, die den Einfluss des Kastrationszeitpunkts auf Tiere mit Mammakarzinomen untersuchte, konnte gezeigt werden, dass Hunde, die in den letzten 2 Jahren vor der Mammatumorentfernung kastriert worden waren, signifikant länger überlebten, als Hündinnen, die intakt oder bereits früher kastriert worden waren (Sorenmo, Shofer et al. 2000). Eine im Verhältnis zur Mastektomie zeitnahe Kastration führte zu einer fast 50% längeren Überlebenszeit im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen (mediane Überlebenszeit von 755 Tagen vs. 286 vs. 301 Tage). Eine aktuelle amerikanische Studie hat sich etwas genauer mit dem Einfluss von Östrogen auf die Überlebenszeit auseinandergesetzt und konnte nachweisen, dass Tiere mit einer fortgeschritteneren aggressiveren Tumorerkrankung von einem höheren Östrogen-Serumgehalt profitierten und daher eine Kastration einen negativen Effekt bei diesen Patienten hätte (Sorenmo, Durham et al. 2019). Eine aktuelle französische Studie hingegen gibt an, dass kastrierte Hündinnen ein im Vergleich zu Intakten 4-fach niedrigeres Risiko zeigten, an ihrem Mammatumor zu versterben ($\text{OR} = 0,23$; 95% CI 0,11–0,47, $p < 0,0001$) (Beaudu-Lange, Larrat et al. 2021). Sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin geht man davon aus, dass Östrogen über diverse Mechanismen zu einer Mammatumor-Promotion und Progression beiträgt (Schmitt 1995, Sorenmo, Durham et al. 2019, Torres, Iturriaga et al. 2021). Neuere Studien postulieren aber auch einen gewissen protektiven Effekt, welcher nicht über den Hormonrezeptor (Sorenmo, Durham et al. 2019) oder andere immunregulatorische Mechanismen (Muñoz-Cruz, Togno-Pierce et al. 2011, Mucha, Rybicka et al. 2016) vermittelt wird.

Die Gabe von (niedrig-dosiertem) Medroxyprogesteronacetat zur Läufigkeitsunterdrückung führt anfangs meist zu benignen Veränderungen im Mammaparenchym (Frank, Kirton et al. 1979, Concannon, Spraker et al. 1981, Selman, van Garderen et al. 1995). Konträr dazu sind die Ergebnisse einer

norwegischen Studie mit insgesamt 98 Mammatumoren-Patienten. Der Großteil (91%) der Mammatumoren in dieser Studie war maligne und in 40% der Fälle hatte eine vorherige Behandlung mit Medroxyprogesteronacetat stattgefunden. Nur 25% der Patienten mit benignen Tumoren waren mit dem Präparat behandelt worden (Stovring, Moe et al. 1997).

2.2.3 Rasse

Teilweise wird sowohl einer Reinrassigkeit als auch der Rasse selbst, ein Einfluss auf die Dignität von Mammatumoren zugesprochen. So konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass reinrassige Hunde im Vergleich zu Mischlingen häufiger maligne Mammatumoren entwickeln (MacVean, Monlux et al. 1978, Vascellari, Baioni et al. 2009, Vascellari, Capello et al. 2016). In einer älteren deutschen Studie waren vornehmlich große Rassen, wie Deutscher Schäferhund, Rottweiler, Dobermann und Boxer, überproportional häufig von malignen Tumoren betroffen (Gottwald 1998). Konträr dazu stehen die Ergebnisse aus einer norwegischen Studie, laut der Boxer am seltensten maligne Mammatumoren hatten und Cocker Spaniel mit 62,5% überproportional häufig einen malignen Mammatumor entwickelten (Gunnes, Borge et al. 2015). Auch der Samoyede scheint ein höheres Risiko für maligne Mammatumoren aufzuweisen (Vascellari, Capello et al. 2016, Rodriguez, Santana et al. 2022), wohingegen beim Englischen Setter sowie Golden und Labrador Retriever im Vergleich zur gesamten Population unterdurchschnittlich oft ein maligner Tumor diagnostiziert wird (Vascellari, Capello et al. 2016). In einigen asiatischen Studien konnte gezeigt werden, dass kleinwüchsige Rassen im Allgemeinen einen höheren Anteil benigner Tumoren und damit auch eine teils signifikant bessere Prognose hatten (Itoh, Uchida et al. 2005, Komazawa, Sakai et al. 2016, Zheng, Du et al. 2022). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse aus einer aktuellen italienischen Studie, in der keine signifikante Assoziation zwischen Rasse und der Prävalenz für benigne oder maligne Mammatumoren gefunden wurde, auch wenn benigne Tumoren am häufigsten beim Yorkshire Terrier und maligne Tumoren am häufigsten beim Deutschen Schäferhund diagnostiziert wurden (Burrai, Gabrieli et al. 2020). Einen fehlenden Einfluss der Rasse auf die Dignität des Mammatumors berichten auch andere Studien (Salas, Marquez et al. 2015, Ariyaratna, Aberdein et al. 2022, Banchi, Morello et al. 2022). In einer aktuellen italienischen Studie entwickelten die reinrassigen Hündinnen aber in einem

signifikant jüngeren Alter Mammatumoren als die Mischlingshündinnen ($p = 0,005$). Die am häufigsten vertretenen Rassen waren hier Yorkshire Terrier, Englischer Cocker Spaniel, Dackel, Labrador Retriever und Deutscher Schäferhund (Banchi, Morello et al. 2022).

2.2.4 Ernährung und Umgebung

Einige Studien konnten bei Hündinnen mit Mammatumoren einen Zusammenhang zwischen Übergewicht und gesteigerter Aggressivität nachweisen. So hatten übergewichtige Hündinnen häufiger infiltrativ wachsende und schlechter differenzierte Tumoren (Lim, Im et al. 2015, Costa-Santos, Damasceno et al. 2019, Tesi, Millanta et al. 2020, Lim, Seung et al. 2022). Zudem zeigten übergewichtige und adipöse Hündinnen mit Mammatumoren eine signifikant kürzere krankheitsspezifische Überlebenszeit (Tesi, Millanta et al. 2020). Wie in der Humanmedizin wird ein Zusammenhang zwischen Dyslipidämie und Tumor-Malignität vorgeschlagen (Costa-Santos, Damasceno et al. 2019, Kumie, Melak et al. 2020, Chowdhury, Islam et al. 2021). Eine Substitution mit Fischöl, welches reich an Omega-3 Fettsäuren ist, könnte, sowohl beim Mensch als auch beim Hund, eine präventive Wirkung haben (Fabian, Kimler et al. 2015, Costa-Santos, Damasceno et al. 2019). Einschränkend ist zu sagen, dass es in der Humanmedizin auch konträre Stimmen gibt, die keine Assoziation zwischen erhöhtem Body-Mass-Index und schlechterer Prognose nach Brustkrebsdiagnose sehen (den Tonkelaar, de Waard et al. 1995, Dignam, Wieand et al. 2003, Carmichael, Bendall et al. 2004).

Zum Einfluss anderer Umgebungsfaktoren auf die Tumordignität ist wenig bekannt, auch wenn einige veterinärmedizinische Studien einen Zusammenhang nahelegen (Andrade Fábio HE 2010, Severe, Marchand et al. 2015, Gearhart-Serna, Hoffman et al. 2020). In der Humanmedizin wird ebenfalls eine Verbindung zwischen langlebigen organischen Schadstoffen und der Promotion und Progression von Brustkrebs diskutiert (Reaves, Ginsburg et al. 2015, Ennour-Idrissi, Ayotte et al. 2019).

2.2.5 Tumorgroße

Die Theorie des histologischen Kontinuums in der Mammatumorentstehung (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009) basiert unter anderem auf den Erkenntnissen

diverser Studien, in denen teils sehr heterogene Tumoren mit Arealen unterschiedlicher Dignität diagnostiziert wurden (Gilbertson, Kurzman et al. 1983, Antuofermo, Miller et al. 2007, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009). Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen fortgeschrittener Tumorgröße und Malignität nachgewiesen werden (Yamagami, Kobayashi et al. 1996, Ferreira, Bertagnolli et al. 2009, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Burrai, Gabrieli et al. 2020, Ariyaratna, Aberdein et al. 2022, Banchi, Morello et al. 2022, Zheng, Du et al. 2022). In der ursprünglichen Studie zum histologischen Kontinuum hatten im Gegensatz zu 48% der benignen Tumoren nur 3% der malignen Tumoren einen Tumordurchmesser von $< 1\text{cm}$. Das Malignitätsrisiko stieg mit Größenzunahme sukzessive an, und maligne Tumoren waren mit durchschnittlich $4,7\text{cm}$ Durchmesser signifikant größer als die benignen Mammatumoren mit durchschnittlich $2,1\text{cm}$ ($p = 0,0002$) (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009). In einer aktuellen italienischen Studie konnten diese Beobachtungen bestätigt werden, wobei der durchschnittliche Tumordurchmesser etwas kleiner war ($2,7\text{cm}$ für maligne Tumoren bzw. $1,7\text{cm}$ für benigne Tumoren; $p = 0,001$) (Burrai, Gabrieli et al. 2020). Die Tumorgröße ist auch (proportional) mit den drei Tumorgraden nach Peña assoziiert (Peña, De Andres et al. 2013, Banchi, Morello et al. 2022, Zheng, Du et al. 2022). In einer Studie waren Grad III Tumoren mit durchschnittlich $3,6\text{cm}$ ($\pm 2,2\text{cm}$) signifikant größer als Grad I und II Mammatumoren mit einem durchschnittlichen Tumordurchmesser von $1,6\text{cm}$ ($\pm 1,1\text{cm}$) (Banchi, Morello et al. 2022). Zudem konnte auch gezeigt werden, dass größere Tumoren auch mit kürzeren Überlebenszeiten bzw. kürzeren krankheitsfreien Intervallen (Philibert, Snyder et al. 2003, Chang, Chang et al. 2005, Ferreira, Bertagnolli et al. 2009, Santos, Correia-Gomes et al. 2015, Rasotto, Berlato et al. 2017, Banchi, Morello et al. 2022) oder höherer Metastasierungswahrscheinlichkeit (Chang, Chang et al. 2005, Rasotto, Berlato et al. 2017) assoziiert sind.

In einigen älteren Studien konnte die Tumorgröße nicht als prognostischer Faktor bestätigt werden (Shofer, Sonnenschein et al. 1989, Hellmen, Bergstrom et al. 1993).

Auch in der Humanmedizin gilt die Tumorgröße neben dem Lymphknotenstatus als ein prognostischer Faktor und wird weiterhin auch beim aktuellen Brustkrebs-Staging Systems des American Joint Committee on Cancer (AJCC) mit angeführt (Abdel-Rahman 2018, Giuliano, Edge et al. 2018). Selbst unter Berücksichtigung neuerer molekularer Untersuchungsmethoden (bspw. auf Hormonrezeptor-Expression),

welche heutzutage mit in das Staging einfließen, ist die Tumorgöße in einer aktuellen Studie weiterhin ein signifikanter prognostischer Faktor, unabhängig vom molekularen Phänotyp (Liu, He et al. 2021).

In einer Studie mit fast 1.900 Patienten mit invasivem Brustkrebs erwies sich die Tumorgöße als stark mit der 15-Jahres Überlebensrate assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine um 1,5cm geringere Größe mit einer geringeren Mortalität von 23% in der Patientengruppe mit Lymphknotenmetastasen und fast 11% in der Gruppe ohne Lymphknotenmetastasen assoziiert war (Narod 2012). Des Weiteren konnte ein (linearer) Zusammenhang zwischen Tumorgöße und Lymphknotenmetastasierung nachgewiesen werden (Carter, Allen et al. 1989, Gajdos, Tartter et al. 1999).

Hervorzuheben ist, dass es auch in der Humanmedizin Beschreibungen von kleineren Patienten-Subgruppen mit kleinen sehr invasiven Tumoren und bereits ausgeprägter Lymphknotenmetastasierung und damit verbundener hoher Brustkrebs-spezifischer Mortalität gibt (Carter, Allen et al. 1989, Wo, Chen et al. 2011). Ebenso gibt es Fälle, in denen trotz eines sehr großen Mammatumors nur eine indolente Erkrankung ohne Metastasierung vorliegt (Yu, Jiang et al. 2012).

2.2.6 Tumoranzahl

In der Veterinärmedizin werden häufig zeitgleich mehrere Knoten in der Mammaleiste diagnostiziert (Fowler, Wilson et al. 1974, Moulton, Rosenblatt et al. 1986, Benjamin, Lee et al. 1999, Stratmann, Failing et al. 2006, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Gunnes, Borge et al. 2015, Zheng, Du et al. 2022). In einer älteren Studie über eine Beagle-Kolonie und den Einfluss von Strahlung konnte bspw. gezeigt werden, dass 223 Hündinnen insgesamt 1.112 Tumoren entwickelten. Gutartige Veränderungen (Adenom, hyperplastischer Knoten, benigner Misch tumor) wurden durchschnittlich 1,5 - 3,5 Mal pro Tier diagnostiziert, wohingegen maligne Tumoren (Karzinom, maligner Misch tumor und Myoepitheliom) nur selten gehäuft beim gleichen Tier auftraten (Moulton, Rosenblatt et al. 1986). Bisher ist die Ursache für das synchrone Auftreten multipler Mammatumoren nicht abschließend geklärt.

Zwei Studien, die sich näher mit der Dignität synchron-auftretender kaniner Mammatumoren beschäftigten, schlugen einen biologischen Zusammenhang zwischen den Knoten vor (Stratmann, Failing et al. 2006, Gunnes, Borge et al. 2015).

So zeigten Stratmann, Failing et al. (2006), dass zwischen den Tumordignitäten benachbarter Mammakomplexe der gleichen Leiste ein hochsignifikanter Zusammenhang bestand, wohingegen dies für benachbarte, aber gegenüberliegende Komplexe nicht gezeigt werden konnte. In einer aktuellen chinesischen Studie mit 504 Hunden hatten 44,6% der Tiere multiple Mammatumoren, welche zu fast 75% maligne waren (Zheng, Du et al. 2022). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse einer amerikanischen Studie, in der kein signifikanter Zusammenhang zwischen Tumor-Multiplizität und einer Prävalenz für Malignität gezeigt werden konnte (Litterine-Kaufman, Casale et al. 2019).

Bei der Frau kommen synchrone bilaterale Knoten in der Mamma bei bis zu 3% der Patientinnen und damit deutlich seltener als beim Hund vor (Eliyatkina, Zengel et al. 2015, Padmanabhan, Subramanyan et al. 2015). Ursächlich für eine synchrone Tumorentwicklung könnten autokrine, (nicht-) hormonelle oder genetische Faktoren oder auch eine lokale bspw. lymphogene Metastasierung sein (Imyanitov, Suspitsin et al. 2002, Stratmann, Failing et al. 2006, Imyanitov and Kuligina 2020). Basierend auf histopathologischen und molekularen Analysen geht man in der Humanmedizin jedoch eher davon aus, dass bilateral auftretende, synchrone Knoten als einzelne Entitäten zu betrachten sind. Mögliche molekulare bzw. histopathologische Ähnlichkeiten können unter anderem dadurch bedingt sein, dass das Gewebe denselben karzinogenen Einflüssen ausgesetzt ist (Imyanitov, Suspitsin et al. 2002, Intra, Rotmensz et al. 2004, Saad, Denning et al. 2008, Girolimetti, Marchio et al. 2021).

3. Veröffentlichungen

3.1 Publikation 1

Canine mammary tumours: Size matters – a progression from low to highly malignant subtypes

Eigener Anteil an der Publikation

Initiation: Julia Gedon, Martin Kessler, Axel Wehrend

Projekt-/Publikations-Planung: Julia Gedon, Martin Kessler, Axel Wehrend

Datenerhebung: Julia Gedon

Datenauswertung: Julia Gedon, Klaus Failing

Erstellung der Publikation: Julia Gedon, Martin Kessler, Axel Wehrend



Received: 27 February 2020 | Revised: 18 August 2020 | Accepted: 28 August 2020
 DOI: 10.1111/vco.12649

ORIGINAL ARTICLE



Canine mammary tumours: Size matters—a progression from low to highly malignant subtypes

Julia Gedon¹ | Axel Wehrend² | Klaus Failing³ | Martin Kessler¹

¹Small Animal Clinic Hofheim, Hofheim am Taunus, Germany

²Clinic of Obstetrics, Gynaecology and Andrology of Large and Small Animals of the Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany

³Unit for Biomathematics and Data Processing of the Veterinary Faculty of the Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany

Correspondence

Julia Gedon, Small Animal Clinic Hofheim, Hofheim am Taunus, Germany.
 Email: j.gedon@tierklinik-hofheim.de

Abstract

The purpose of this study was to evaluate a possible association between mammary tumour size and increasing degree of malignancy. Data of 625 dogs with a total of 1459 mammary tumours were analysed retrospectively. 80.3% dogs were intact, mean age at diagnosis was 9.7 ± 2.5 years, 75.8% were pure breed dogs. Median body weight was 20.0 kg. Malignant tumours ($n = 580$) were significantly larger than their benign counterparts (1.94 cm vs 0.90 cm in mean, respectively; $P \leq .0001$), resulting in a positive correlation between increasing tumour size and a change from benign to malignant ($P \leq .0001$; $r_s = 0.214$). When malignant tumours were grouped into four degrees of increasing malignancy (complex/simple/solid/anaplastic carcinomas) a significant positive correlation between increasing tumour size and more malignant tumour degree ($P \leq .0001$; $r_s = 0.195$) could be demonstrated. In a number of cases, highly malignant tumours were found to arise within less malignant lesions, supporting the concept of a further progression within the malignant tumour subtypes. In patients with multiple tumours, mean tumour sizes for malignant tumours were significantly smaller compared to patients with only one tumour (1.67 vs 2.71 cm in mean, respectively; $P < .0001$). These findings suggest that mammary tumours progress not only from benign to malignant but also from low to highly malignant. An increase in diameter of only a few millimetres may therefore have a big impact on the patient's outcome.

KEYWORDS

carcinoma, dog, malignant transformation, mammary tumour, oncology

1 | INTRODUCTION

Mammary tumours (MT) are the most common neoplasms in female dogs.^{1,2}

Dogs tend to have multiple tumours simultaneously or develop several tumours through lifetime.^{3–6} Approximately 30% to 60% of canine MT are considered malignant and can be subdivided into various subtypes and malignancy grades following reported classification criteria.^{1,3,5,7–12} For histological diagnosis, most pathology institutions use the WHO classification system or the revised 2011 classification system.^{12,13} Histological classification is based on criteria of malignancy, such as nuclear and cellular pleomorphism, intratumoural

necrosis, vascular invasion and lymph node metastasis.^{12,13} In addition, various grading systems for epithelial MT have been established; most by adapting the Elston and Ellis grading system for breast cancer in women¹⁴ to a canine model.^{10–12,15–17} Histopathological information about tubule formation, nuclear pleomorphism and mitotic index is used to score each tumour. Tumour grade has been found predictive regarding prognosis.^{11,15–17} In one study grade III tumours had a 7.1 times higher risk of death compared to grade I tumours. Mean survival times differed significantly with 7.8 months to 30.3 months in grade III and grade I tumours, respectively.¹⁷

Benign and malignant MT have traditionally been considered static entities, and a progression over time from a benign to a

malignant phenotype was not a commonly accepted concept for canine MT. However, in women a multistep carcinogenesis from a benign hyperplastic or preneoplastic lesion to an invasive carcinoma has been proven.¹⁸⁻²¹ Similar observations were made for canine patients and therefore the question was raised whether atypical ductal hyperplasia could serve as a precursor for malignant and invasive tumours, indicating a similar neoplastic transformation and dedifferentiation as in women.^{3,22-24}

In 2009 the term "histological continuum" was established by Sorenmø et al. They found that malignant MT were significantly larger than benign tumours (4.7 vs 2.1 cm; $P = .0002$), and suggested a progression from benign to malignant with increasing tumour size.²⁵ Other studies support this idea of a histological continuum from benign to malignant with increasing tumour size. It has been shown that dogs with larger MTs have significantly shorter survival times and disease-free intervals.^{15,17,26-28} Additionally, dogs with larger tumours are more likely to develop metastases, which is a feature of high grade carcinomas.^{17,27}

Different degrees of malignancy of mammary carcinomas have been identified and it has been demonstrated that there is a continuous increase in malignant behaviour from complex carcinoma to simple carcinoma to undifferentiated and further to anaplastic carcinomas.^{3,9,17,29} To the authors' knowledge it remains unclear whether there is a correlation between the size of the tumour and increasing malignant phenotype. A loss of epithelial markers (eg, e-cadherin, cytokeratin) and a gain of mesenchymal markers (eg, vimentin, fibronectin) is associated with epithelial-mesenchymal-transition, which is an important step in tumour progression and metastasis.³⁰⁻³³ In malignant canine MT, a significant association between tumour size and advanced malignancy expressed by vimentin over-expression³⁴ and loss of e-cadherin expression could be demonstrated.³⁵ Based on this, the authors hypothesize there is not only a correlation between the size of the tumour and malignancy in general, but also a correlation between the degree of malignancy and size.

The purpose of this study is to prove Sorenmø's concept of association between tumour size and malignancy in a large population of intact and castrated female dogs with MTs. Second, this study examines whether there is a relationship between increasing malignant phenotype and increasing tumour size, supporting the idea of a histologic continuum not only from benign to malignant but from lesser to higher degrees of malignancy with increasing tumour size.

2 | MATERIALS AND METHODS

For this retrospective study, the medical records of 880 privately owned female dogs were reviewed. All dogs were presented with one or more nodules in their mammary glands to the oncology service of Small Animal Clinic Hofheim, Germany from January 2006 to December 2016 and were treated by tumour excision.

Only patients with complete history of age, breed, weight and neuter status and in which the number, location, and largest diameter of the MT(s) had been documented were included in the study.

General examination findings, results from staging procedures (thoracic radiographs, abdominal ultrasound), and the extent of the surgical treatment (lumpectomy, local, regional or radical mastectomy) were retrieved from the patients' records. All tumour excisions had been performed with the intent of reaching clean margins.

Histological examinations were carried out by a single pathology lab, led by a board-certified pathologist. Tumour diagnosis was based on established classification systems by Misdorp (1999) and Goldschmidt et al (2011).^{12,13}

All histopathological reports were reviewed concerning tumour type, lymphatic invasion and surgical margins. In all cases in which the resection included the fifth mammary complex, the data set also included information on the histopathological examination of the superficial inguinal lymph node.

Cases with benign non-tumorous nodules (eg, hyperplasia or dysplasia) or without complete clinical and/or histopathological data were excluded from analysis.

For the purpose of this study the subtypes of malignant tumours were grouped into four degrees of increasing malignancy based on the systems published by Misdorp¹³ and Goldschmidt et al¹² and the proposed classification by Schmidt and Kessler⁹:

Degree I: Complex carcinoma (and in situ carcinoma) (Figure 1).

Degree II: Simple carcinoma (including tubulopapillary/papillary/cystic/ductal/mucinous types) (Figure 2).

Degree III: Solid carcinoma (Figure 3).

Degree IV: Anaplastic, inflammatory and invasive carcinoma (including tumours with lymphangiosis carcinomatosa) (Figure 4).

If different subtypes or entities were present within one nodule, the most malignant diagnosis was used for assigning the mass to a specific malignancy group. All benign tumours were grouped together.

Dogs neutered less than 6 months prior to presentation were counted as intact as a reflection of the canine oestrus cycle.

All statistical analyses were performed using the statistical software packages BMDP/Dynamic, Release 8.1 (Dixon, 1993)* and StatXact, Vers. 9.0.0 (Cytel, 2010).† The exact Wilcoxon-Mann-

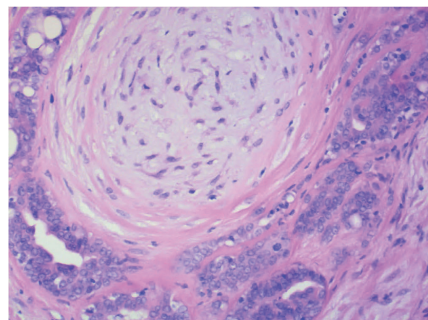


FIGURE 1 Complex carcinoma

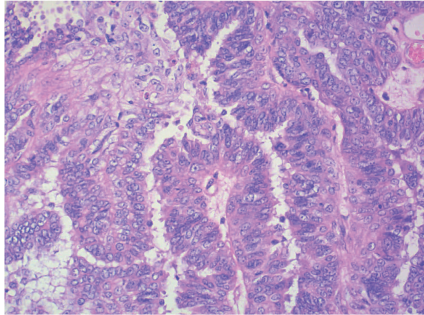


FIGURE 2 Simple carcinoma

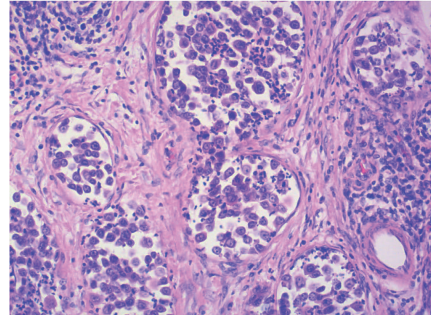


FIGURE 4 Anaplastic carcinoma

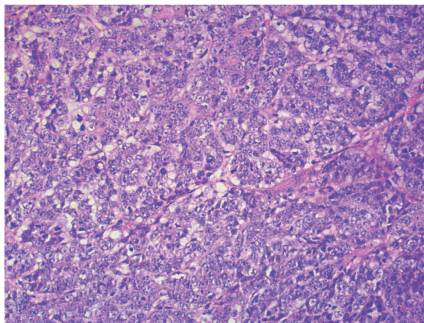


FIGURE 3 Solid carcinoma

Whitney test was used to determine whether there was an association between tumour size and malignancy. Furthermore, the rank correlation coefficient of Spearman was calculated to identify a correlation between tumour size and the different tumour subtypes. A possible raw association between body weight and malignancy (only benign tumours, only malignant tumours, benign and malignant tumours) was analysed by the chi-square test. In addition, a multiple logistic regression analysis was used to determine the possible multiple association between malignancy and different possible influencing variables in common. From these results, the adjusted odds ratios (OR) were computed supplemented by their 95% confidence intervals (95%-CI). Statistical significance was defined as $P \leq 0.05$.

3 | CELL LINE VALIDATION STATEMENT

No cell lines were used in the current study.

4 | RESULTS

4.1 | Characteristics of the study population

A total of 625 female dogs with a total of 1459 tumours met the inclusion criteria. At time of presentation, 80.3% ($n = 502$) patients were intact and 19.7% ($n = 123$) had been spayed >6 months prior to presentation.

Mean age at diagnosis was 9.7 ± 2.5 years. A total of 75.8% were pure breeds ($n = 474$), with Dachshunds ($n = 35$) and Golden Retrievers ($n = 30$) most commonly represented. One hundred and forty-nine dogs (23.8%) were mixed breeds. Breed information was not available for two dogs. Median body weight was 20.0 kg (range 1.4–67.5 kg). For 3 patients, no weight was recorded. A total of 622 of the 625 dogs were grouped into three body weight groups (< 10 kg, 10–25 kg, ≥ 25 kg) to evaluate the effect of dog size (defined as body weight) on tumour malignancy.

4.2 | Characteristics of the tumours

Of the 1459 tumours 60.2% ($n = 879$) tumours were benign and 39.8% ($n = 580$) were malignant. Of the malignant tumours, 525 could be grouped into the four malignancy groups (Table 3). For 55 patients, no exact subgroup could be determined, they were therefore excluded from subgroup-specific analysis.

A total of 285 patients (= 45.6%) had a single tumour, 340 patients (= 54.4%) had multiple tumours. In the population with multiple tumours, a total of 1174 tumours (2–12 tumours per dog) were identified. Four or more MTs were present in 117 patients.

Age was significantly associated with malignancy ($P < .0001$) and the chance of having a malignant tumour (OR) increased 1.19 times with every additional year of age in multiple logistic regression analysis (Table 1). Also, the tumour size was significantly associated with malignancy ($P < .0001$) in the multiple logistic regression leading to an OR = 1.31 (chance increase per 1 cm).

However, a significant effect of body weight could not be shown in this analysis ($P = .15$; Table 1). The raw association between degree of malignancy and body weight showed only a low correlation ($r_s = 0.07$) that was not statistically significant ($P = .081$). Even after grouping patients according to their body weight, no association between weight group and malignancy could be established (Chi-square value = 6.0867; $P = 0.19$; Table 2).

Considering each tumour as a single case malignancy was strongly associated with tumour diameter. Only 31% of the tumours <1 cm, but 67% of the tumours >2 cm were malignant (cp Table 4). With every cm increase in tumour size, the chance of having a malignant MT increased 1.48 times (Table 5; OR = 1.48, logistic regression: $P < 0.0001$). The distribution of the tumour size was strongly skewed to the right: Benign tumours had a significantly smaller mean tumour size compared to malignant counterparts [0.90 cm (median 0.50 cm; quartile [Q] 1.0-3.0 cm; Q3: 1.00 cm) vs 1.94 cm (median 1.00 cm; Q1: 0.45 cm; Q3: 2.93 cm), respectively; $P \leq .0001$].

In patients with single tumours, mean tumour size was 1.17 cm (median 0.85 cm; Q1: 0.48 cm; Q3: 1.50 cm) vs 2.71 cm (median 2.00 cm; Q1: 0.70 cm; Q3: 4.00 cm (benign vs malignant; $P \leq .0001$). In patients with multiple tumours, benign tumours had a mean tumour size of 0.85 cm (median: 0.50 cm; Q1: 0.30 cm; Q3: 1.00 cm) compared to malignant ones (1.67 cm; median: 0.75 cm; Q1: 0.40 cm; Q3: 2.00 cm; $P \leq .0001$). Malignant MT had significantly smaller tumour sizes in patients with multiple compared to solitary tumours ($P < .0001$; 95%CI - 1.48-0.59). Overall, a positive correlation between increasing tumour size and a change from benign to malignant was noted ($r_s = 0.214$; $P \leq .0001$).

When tumours were divided into the four different degrees of malignancy ($n = 525$) (cp Table 3), a positive correlation between increasing tumour size and increasing malignant phenotype was identified ($r_s = 0.195$; $P \leq .0001$). The correlation presented in patients

TABLE 1 Association between malignancy and other possible influencing variables (results of the multiple logistic regression model analysis)

Variable	Coefficient	Odds Ratio	P-value	95% CI
Body weight	0.991·10 ⁻²	1.01	.15	0.997-1.02
Age	0.172	1.19	<.0001	1.11-1.28
Tumour size	0.271	1.31	<.0001	1.17-1.47

TABLE 2 Body weight and malignancy of MT in 622 dogs

Body weight	n dogs	Only benign tumours		Only malignant tumours		Benign + malignant tumours	
		n dogs	Percentage	n dogs	Percentage	n dogs	Percentage
< 10 kg	174	77	44.2	49	28.2	44	27.6
10-25 kg	187	75	40.1	68	36.4	48	23.5
≥ 25 kg	261	91	34.9	94	36.0	76	29.1
Total	622	243		211		168	

Note: Chi-square: value = 6.087; $P = .193$.

Abbreviation: MT, mammary tumour.

with solitary ($r_s = 0.267$; $P = .0011$) as well as multiple ($r_s = 0.126$; $P = .0142$) tumours.

In 33 cases, the pathologists noted the transition of benign to malignant and further from low grade malignancy to a higher malignant phenotype within a tumour. In this respect, a malignant tumour arising within an adenoma was identified in eight cases (Figure 5). In additional 25 cases, a progression from a low to higher degree of malignancy within one tumour was documented. As examples, there were tumours with features of a solid carcinoma within a complex phenotype, simple carcinomas arising within carcinoma-in-situ and an anaplastic carcinoma within a solid carcinoma.

5 | DISCUSSION

The population characteristics regarding age, breed, and weight distribution is similar to previous studies.^{1,2,25} Older dogs were significantly more likely to have malignant tumours, as the chance of having a malignant tumour increased 1.19 times with every year of age (cp. Table 1). This supports the idea of a histologic progression over time and confirms previous data, in which age was significantly related to malignancy.^{1,25} The overrepresentation of Dachshunds and Golden Retrievers likely reflects the popularity of these breeds in Germany, rather than actual breed predispositions. A predisposition for more benign tumours in our small-breed-group, as it had been reported earlier,⁸ could not be confirmed ($P = .19$). However, in the previous

TABLE 3 Degrees of malignancy and histological subgroups of canine MT

Subgroup	n tumours	Percentage of malignant tumours
Degree I (complex carcinoma)	149	25.7
Degree II (simple carcinoma)	197	34.0
Degree III (solid carcinoma)	56	9.6
Degree IV (anaplastic/inflammatory carcinoma/lymphatic invasion)	123	21.2
Malignant, no subgroup	55	9.5
Total	580	100%

Abbreviation: MT, mammary tumour.

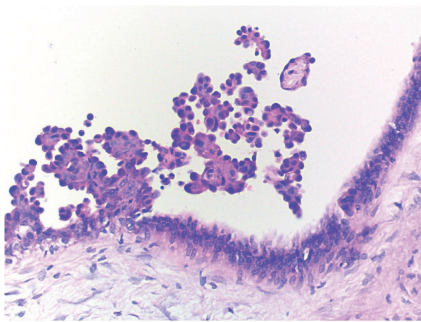
TABLE 4 Canine mammary tumour diameter and malignancy

Tumour diameter	Benign		Malignant		Total n
	n	Percentage	n	Percentage	
< 1 cm	599	69.0	269	31.0	868
1 to <2 cm	179	62.8	106	37.2	285
2 to <3 cm	52	46.4	60	53.6	112
3 to <5 cm	29	26.1	82	73.9	111
≥ 5 cm	20	24.1	63	75.9	83
Total	879	60.2	580	39.8	1459

TABLE 5 Association of tumour size and malignancy (benign vs malignant) in a logistic regression model (base: 1 case = 1 MT)

MT group	n of MT	Coefficient	Odds Ratio	P-value	95% CI
All MT	1459	0.394	1.48	<.0001	1.36-1.61
Solitary MT	285	0.521	1.68	.0001	1.39-2.04
Multiple MT	1174	0.321	1.38	<.0001	1.26-1.51

Abbreviation: MT, mammary tumour.

**FIGURE 5** Histological continuum: Carcinoma in situ arising in a mammary adenoma

study, different weight groups had been used and only dogs with a mean body weight of 3.8 ± 2.0 kg were considered as small breed dogs.

In contrast to Sorenmo's study²⁵ our population included intact and castrated female dogs. The influence of the neuter status on number and malignancy of the tumours was not evaluated in the present study.

This study supports the theory of a histological continuum from a benign to a malignant phenotype in canine MT as published by Sorenmo et al.²⁵ Since their study is limited by a fairly small sample size ($n = 90$ patients, all intact) with a total of 236 MT (with only 37 of the 236 tumours malignant), verification of this hypothesis using a larger study population seemed warranted. In our population, a total of 39.7% of all tumours were malignant, which is similar to previous studies.^{3,8} A clear demonstration of an increase in the proportion of

malignant tumours with increasing size, confirms tumour size as a valuable predictor of biological behaviour in canine MT^{25,28} (cp Table 4).

In the present study mean tumour sizes were smaller than in the study published by Sorenmo et al.²⁵ (benign 2.1 cm vs malignant 4.7 cm; $P = .0002$). This might be attributed to the fact, that in the current study population, a higher proportion of the tumours were < 1 cm in size (59.5%, compared to 42.4% in Sorenmo's study²⁵). This could be attributed to an earlier detection and treatment of MT in the dog population of the present study.

The development of a malignant neoplasia is well-accepted as a multi-step process involving the accumulation of a number of genetic and epigenetic changes in a clonal population of cells.³⁶ Small tumours of < 1 cm diameter were benign in over 2/3 cases (69%), but with only 1 cm increase in diameter, 2/3 of the cases were diagnosed as malignant (cp Table 4). Consequently, the mean tumour size was significantly smaller in benign tumours (0.90 cm) compared to malignant tumours (1.94 cm; $P \leq .0001$). These findings not only suggest that there is in fact a progression from benign to malignant, but more so that this process frequently becomes evident in the phase of tumour growth between 1 and 2 cm in diameter, representing a phase in which the tumour quadruples its volume from 0.524 cm^3 (mass of 1 cm) to 4.189 cm^3 in a mass of 2 cm in diameter. This is in agreement with observations in other studies, where malignancy is noted when the lesion has accumulated a sufficient number of mutations, which is typically once it has reached a diameter of 1-2 cm³⁷. According to the present study, this process seems to occur frequently in the phase between 1 and 2 cm diameter in canine MT. An increase in tumour size lead to an almost 1.5-fold higher chance to have a malignant tumour (OR: 1.48; cp. Table 5). The influence of tumour size on malignancy tended to be even higher, when solitary MT vs multiple tumours was compared (OR: 1.68 vs 1.38, respectively). The correlation between tumour size and malignancy could also be explained by the observation that degree of malignancy impacts tumour growth rate (more malignant

tumours seem to grow faster). This is supported by studies demonstrating an increase in proliferation markers in malignant tumours.²⁸

Different authors have noticed an increasing degree of malignancy in different MT subtypes. Misdorp et al (1976) identified complex carcinomas as less malignant compared to simple carcinomas.²⁹ Anaplastic carcinomas are thought to have a worse prognosis than solid carcinomas and those are considered more malignant than simple and complex carcinomas.¹⁷ This has been confirmed by clinical observations, and specific survival times for the different histological subtypes have been published.^{17,26} In Sorenmo's study,²⁵ the question whether there is a further progression from low to high malignancy with increasing tumour growth remained unanswered as the study did not distinguish between the different malignant subgroups. In women, a further progression and dedifferentiation has been shown to occur in breast cancer²¹ and a canine study reported that 90% of the dogs with ductal carcinoma-in-situ went on to develop mammary carcinomas.²³ The present study evaluated both tumour size as a predictor for malignancy and the process of increasing dedifferentiation, and thus progression of malignant behaviour with increasing tumour size. Histological subtype groups based on degree of malignancy⁹ were evaluated regarding the respective tumour sizes. A significant positive correlation between increasing tumour size and more malignant phenotype ($P \leq .0001$; $r_s = 0.195$) could be demonstrated, supporting the concept of a histologic continuum within the malignant tumour subtypes. This is further supported by the observation that highly malignant tumours were found to arise within less malignant lesions in several histologic specimens.

The same observation was reported in the study by Sorenmo in which histologic slides were presented that demonstrated a transition from benign to malignant.²⁵

It is possible that a histological progression within the same specimen was underreported in our study as pathologists may not have always documented the less malignant areas of a section due to its clinical irrelevance. The number of tumours in which malignant progression was directly visible may have been higher, if a review of all malignant tumours specifically looking for this feature had been performed.

In addition, grading of the malignant tumours according to the most recent grading system for canine MT reported by Pena in 2010^{10,11} could have strengthened our argument. Histological tumour grading, however was not taken into account since a complete review of all histological specimens was not possible due to the retrospective nature of this study, the inclusion of cases from 2006 onwards, and the limitation that wet material or histologic slides of most cases were no longer available. Future studies are needed to test our hypothesis using the most recent grading system for canine MT by Pena et al.^{10,11}

When comparing patients with solitary and multiple tumours, we demonstrated that mean tumour sizes for malignant tumours were significantly smaller in dogs with multiple tumours compared to patients with only one tumour (1.67 cm vs 2.71 cm, respectively; $P < .0001$). While it is possible that multiple tumours may be of more concern to the owners and therefore the dogs may be brought to the veterinarian's attention earlier relative to presentation of a singular tumour, it is also possible that this observation indicates an earlier malignant progression in patients with multiple tumours. Potential

reasons are changes in the tumour microenvironment, field effects or influence of hormones.^{11,25,38-43} The relationship between tumours in adjacent mammary complexes of the same chain (but not in different chains) was explained in an earlier study⁵ by a theory of local metastasis via lymphatic vessels. However, the authors disregarded any other hormonal, genetic or microenvironmental factors.⁵ In a recent study, a biologic relationship between simultaneous tumours was suggested and explained by possible field effects in carcinogenesis.⁶

These results should encourage scientists to further study the factors that have a potential to be "drivers" or "retarders" of this histological continuum. Possible players in this process could be genetic, epigenetic, hormonal, tumour microenvironmental, field effects, or a combination thereof. Especially studying the hormonal effects caused by neuter status and time of neutering may profoundly increase our understanding of mammary carcinoma development and may affect the way we manage our patients clinically. Based on the results of this study, the still common "wait-and-watch" attitude towards mammary masses should be obsolete, as even removing benign mammary masses may have an effect on the prognosis and only a few millimetres increase in diameter could change the outcome for the patient.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thank to Dr Wolf von Bomhard for supplying the pathohistological photographs.

CONFLICT OF INTEREST

The authors of this manuscript declare that they have no competing interests financial or non-financial that might have influenced their interpretation or presentation of the data presented in this manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Julia Gedon  <https://orcid.org/0000-0002-7435-8844>

ENDNOTE

^{*} Dixon, W. J. (chief editor), 1993. BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.

[†] Cytel Studio StatXact Vers. 9.0.0 (2010). Statistical Software for Exact Nonparametric Inference. User Manual. CYTEL Inc., Cambridge, MA 02139, U.S.A.

REFERENCES

1. Vascellari M, Capello K, Carminato A, Zanardello C, Baioni E, Mutinelli F. Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (northeastern Italy): risk factors and similarities to human breast cancer. *Prev Vet Med*. 2016;126:183-189.
2. Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst*. 1968;40(2):307-318.

3. Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Vet Pathol*. 1999;36(5):423-436.
4. Stratmann N, Failing K, Richter A, Wehrend A. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Vet Surg*. 2008;37(1):82-86.
5. Stratmann NF, Wehrend K. Investigations on localisation and dignity of mammary tumours in bitches with multiple mammary neoplasias. *Tierärztliche Praxis*. 2006;34(1):23-28.
6. Gunnes G, Borge KS, Lingaas F. A statistical assessment of the biological relationship between simultaneous canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol*. 2017;15(2):355-365.
7. Salas Y, Marquez A, Diaz D, Romero L. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: a growing animal health problem. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127381.
8. Itoh T, Uchida K, Ishikawa K, et al. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci*. 2005;67(3):345-347.
9. Schmidt JM, Kessler M, des Hundes M. In: Kessler M, ed. *Kleintieronkologie*. 3ed ed. Stuttgart: Enke Verlag; 2013:241-252.
10. Clemente M, Perez-Alenza MD, Illera JC, Pena L. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol*. 2010;47(2):265-274.
11. Pena L, De Andres PJ, Clemente M, Cuesta P, Perez-Alenza MD. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol*. 2013;50(1):94-105.
12. Goldschmidt M, Pena L, Rasoetto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 2011;48(1):117-131.
13. Misdrof W ER, Hellmen E, et al. Histologic classification of mammary tumors of the dog and the cat. *Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization*. 1999; 7(59).
14. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-410.
15. Santos M, Correia-Gomes C, Marcos R, et al. Value of the Nottingham histological grading parameters and Nottingham prognostic index in canine mammary carcinoma. *Anticancer Res*. 2015;35(7):4219-4227.
16. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol*. 2005;133(4):246-252.
17. Rasoetto R, Berlato D, Goldschmidt MH, Zappulli V. Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: an observational cohort study of 229 cases. *Vet Pathol*. 2017;54(4):571-578.
18. Hartmann LC, Degnim AC, Santen RJ, Dupont WD, Ghosh K. Atypical hyperplasia of the breast—risk assessment and management options. *N Engl J Med*. 2015;372(1):78-89.
19. Lakhani SR. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol*. 1999;187(3):272-278.
20. Sinn HP, Elswaf Z, Helmchen B, Aulmann S. Early breast cancer precursor lesions: lessons learned from molecular and clinical studies. *Breast Care (Basel)*. 2010;5(4):218-226.
21. Renshaw AA, Gould EW. Long term clinical follow-up of atypical ductal hyperplasia and lobular carcinoma in situ in breast core needle biopsies. *Pathology*. 2016;48(1):25-29.
22. Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE, Hurvitz AI, Black MM. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet Pathol*. 1983;20(2):127-142.
23. Antuofermo E, Miller MA, Pirino S, Xie J, Badve S, Mohammed SI. Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs—a model of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(11):2247-2256.
24. Ferreira E, Gobbi H, Saraiva BS, Cassali GD. Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hyperplasia as a preneoplastic marker in dogs. *Vet Pathol*. 2012;49(2):322-329.
25. Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, et al. Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol*. 2009;7(3):162-172.
26. Plickert JC, Snyder PW, Glickman N, Glickman LT, Knapp DW, Waters DJ. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J Vet Intern Med*. 2003;17(1):102-106.
27. Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc*. 2005;227(10):1625-1629.
28. Ferreira E, Bertagnoli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol*. 2009;7(4):230-235.
29. Misdrof W, Hart AA. Prognostic factors in canine mammary cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1976;56(4):779-786.
30. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-1428.
31. Sarli G, Preziosi R, De Tolla L, Brunetti B, Benazzi C. E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. *J Vet Diagn Invest*. 2004;16(6):542-547.
32. Yoshida K, Yoshida S, Choisinrachon N, et al. The relationship between clinicopathological features and expression of epithelial and mesenchymal markers in spontaneous canine mammary gland tumors. *J Vet Med Sci*. 2014;76(10):1321-1327.
33. Vora HH, Patel NA, Rajvik KN, et al. Cytokeratin and vimentin expression in breast cancer. *Int J Biol Markers*. 2009;24(1):38-46.
34. Rismanchi S, Yadegar O, Muhamadnejad S, Amanpour S, Taghizadeh-Jahed M, Muhamadnejad A. Expression of vimentin filaments in canine malignant mammary gland tumors: a simulation of clinicopathological features of human breast cancer. *Biomed Rep*. 2014;2(5):725-728.
35. Matos AJ, Lopes C, Carvalho J, Santos M, Rutteman GR, Gartner F. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinic-pathological variables. *J Comp Pathol*. 2006;134(2-3):182-189.
36. Little MP. Cancer models, genomic instability and somatic cellular Darwinian evolution. *Biol Direct*. 2010;5:19.
37. Den Otter W, Koten JW, Van der Vegt BJ, et al. Oncogenesis by mutations in anti-oncogenes: a view. *Anticancer Res*. 1990;10(2B):475-487.
38. de Souza TA, de Campos CB, De Biasi Bassani Goncalves A, et al. Relationship between the inflammatory tumor microenvironment and different histologic types of canine mammary tumors. *Res Vet Sci*. 2018;119:209-214.
39. Sorenmo KU, Durham AC, Radaelli E, et al. The estrogen effect; clinical and histopathological evidence of dichotomous influences in dogs with spontaneous mammary carcinomas. *PLoS One*. 2019;14(10):e0224504.
40. Yue W, Yager JD, Wang JP, Jupe ER, Santen RJ. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids*. 2013;78(2):161-170.
41. Kim J, Bae JS. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:1-11.
42. Chai H, Brown RE. Field effect in cancer—an update. *Ann Clin Lab Sci*. 2009;39(4):331-337.
43. Yan PS, Venkataramu C, Ibrahim A, et al. Mapping geographic zones of cancer risk with epigenetic biomarkers in normal breast tissue. *Clin Cancer Res*. 2006;12(22):6626-6636.

How to cite this article: Gedon J, Wehrend A, Failing K, Kessler M. Canine mammary tumours: Size matters—a progression from low to highly malignant subtypes. *Vet Comp Oncol*. 2021;19:707–713. <https://doi.org/10.1111/vco.12649>

3.2 Publikation 2

Ovariectomy reduces the risk of tumour of tumour development and influences the histologic continuum

Eigener Anteil an der Publikation

Initiation: Julia Gedon, Martin Kessler, Axel Wehrend

Projekt-/Publikations-Planung: Julia Gedon, Martin Kessler, Axel Wehrend

Datenerhebung: Julia Gedon

Datenauswertung: Julia Gedon, Klaus Failing

Erstellung der Publikation: Julia Gedon, Martin Kessler, Axel Wehrend



Received: 21 June 2021 | Accepted: 13 December 2021
 DOI: 10.1111/vco.12793

ORIGINAL ARTICLE



WILEY

Ovariectomy reduces the risk of tumour development and influences the histologic continuum in canine mammary tumours

Julia Gedon¹ | Axel Wehrend² | Martin Kessler¹

¹Small Animal Clinic Hofheim, Hofheim am Taunus, Germany

²Clinic for Obstetrics, Gynaecology and Andrology of Large and Small Animals, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

Correspondence

Julia Gedon, Small Animal Clinic Hofheim, Hofheim am Taunus, Germany.
 Email: j.gedon@tierklinik-hofheim.de

Abstract

Influence of neutering on canine mammary tumorigenesis has been a source of vivid discussion over the last decades. The purpose of this retrospective study was to describe the association between neuter status, tumour size and degree of malignancy in a large population of 625 female dogs with altogether 1459 removed mammary tumours (MTs). MT-bearing dogs were predominantly intact (80.3%) and intact dogs were overrepresented in the tumour population compared to the control group of >19 000 females ($p < .0001$). Multiple MT occurred in 340 patients (54.4%) and were significantly more common in intact dogs (57.8% vs. 40.7% spayed). Neutered dogs were not only significantly more likely to have a malignant MT ($p < .0001$) but were significantly more often affected by more aggressive tumour subtypes ($p < .0001$). Positive correlation between increasing tumour size and increasingly malignant phenotype was slightly stronger in spayed ($r_s = .217$; $p = .021$) compared to intact ($r_s = .179$; $p = .0003$) patients. After ovariectomy, progression from benign to malignant occurs in smaller size tumours, as MT ≥ 2 cm in diameter were malignant in 86.9% of the spayed patients, compared to 62.0% in intact patients ($p = .0002$). Intact bitches have a higher risk for MTs and tumour multiplicity. MTs in neutered females are more often malignant and belong to more aggressive subtypes compared to MTs in intact dogs. In neutered bitches, histologic progression from benign to malignant and further along the cancer progression continuum occurs at smaller tumour sizes.

KEYWORDS

canine, malignant transformation, mammary tumour, neuter status, ovariectomy

1 | INTRODUCTION

Mammary tumours (MT) are the most common tumours in female dogs.^{1–3} Endogenous sex hormones are widely accepted as risk factors for MT development⁴ rendering intact bitches more prone to tumour development compared to neutered individuals.^{1,2,5} A study published in the late 1960s by Schneider et al. laid the foundation for a long-lasting dogma. According to their study juvenile neutering, defined as ovariectomy prior to the first heat, almost completely

eliminated the risk of MT development and, while there was still some reduction in the relative risk when the neutering was performed after the first heat, adult neutering (after the second heat) no longer influenced the relative risk of tumour development compared to intact bitches. They additionally noted, that patients being neutered after the second oestrous cycle but before 2.5 years in age still experienced a protective effect, compared to patients neutered later in life.⁶ As a result, juvenile (pre-puberty) neutering became common practice in the United States and in other parts of the world, and is still

recommended for the prevention of mammary cancer.⁷⁻⁹ However, the scientific basis of this practice has been questioned¹⁰ and the influence of the timing of neutering has been discussed intensively over the years.^{6,10-16} Recent prospective studies indicated that hormonal deprivation by neutering, even when performed later in life, was protective regarding the development of new MTs.^{17,18} However, samples size was small in both publications and potential tumour progression from benign to malignant in canine mammary cancer was not evaluated.¹⁹

While juvenile neutering undoubtedly reduces mammary cancer risk, it has also been associated with an increased risk of developing other tumours such as lymphoma, haemangiosarcoma and osteosarcoma,⁹ in addition to non-neoplastic gynaecological and behavioural conditions.²⁰⁻²² A US-study analysing neuter status and life span in >40 000 dogs discovered an increased life expectancy of 26.3% for neutered females, but also an increased risk of death caused by neoplasia.²³ Therefore, the discussion about balancing the general advantages and disadvantages of elective hormonal ablation in female dogs remains pertinent.²⁴

In 2009 Sorenmo et al. introduced the term 'histological continuum' in canine mammary tumorigenesis. In a cohort of 90 intact bitches they demonstrated a histological continuum from benign to malignant with increasing size of the tumour. According to their theory small tumours are predominantly benign and the proportion of malignant tumours increases with increasing tumour size due to a malignant transformation within the macroscopic tumour.¹⁹ This hypothesis was confirmed in a much larger patient population by our group, but our data not only supported the concept of a histologic continuum from benign to malignant but also suggested a further progression from lower to higher malignant tumour subtypes with increasing tumour size.²⁵ Recently, transcriptomic studies along the continuum of cancer progression in the canine mammary gland, from healthy to early malignant and finally invasive carcinoma, were described and compared to the situation in humans, further supporting this observation.²⁶

We hypothesised that neuter status also had an influence on the before mentioned histological continuum. The first objective of this study was to compare a population of MT bearing dogs to a large control population of bitches without MTs. A second objective was to analyse prevalence, number and types of MTs as well as to examine the effect of neutering on the prevalence and type of mammary

neoplasia and the occurrence of simultaneous tumours. A third objective of the study was to evaluate the effects of neuter status on the degree of malignancy of the tumour in relation to its size, following the hypothesis of a histological continuum in canine MTs.

2 | MATERIALS AND METHODS

Data of 625 privately owned female dogs which had been treated surgically for one or more MTs at the Small Animal Clinic Hofheim, Germany from January 2006 to December 2016 were retrospectively analysed. The same cohort of dogs had been used in an earlier publication in 2020 to find support for the concept of a histologic continuum as described by Sorenmo et al.²⁵ Females that had been neutered less than 6 months prior to presentation were counted as intact as a reflection of the canine oestrus cycle. In addition to the histopathologic diagnosis, clinical information regarding the number, location and largest diameter (measured on the live dog by using a calliper) of the MTs were documented.

A large control population of altogether 31 078 female dogs that had been presented to the Small Animal Clinic Hofheim, Germany during the same time period without any MT claims was available for analysis. In regards to the age at neutering, both a comparison with the entire group, and with two age categories of the controls was performed (neutering at <1 year and <2 years). For comparison of other demographic aspects, only patients ≥ 4 years of age in the control population with complete information on breed and weight were chosen, as this age group was considered at risk for MT manifestation.

Histological examinations of the excised MTs were carried out by a veterinary pathology laboratory led by a board-certified pathologist. Tumour diagnoses were based on the established classification systems by Misdorp²⁷ and Goldschmidt et al.²⁸ Histologic tumour types and assessment of lymphatic invasion was taken from the histopathological reports.

The different malignant subtypes of mammary carcinomas were then grouped into four categories (see Table 1) according to their increasing degree of malignancy: complex and simple carcinoma types, solid carcinoma and anaplastic/inflammatory carcinoma/ tumours with (lymphatic) invasion.²⁵

TABLE 1 Degrees of malignancy and histological subgroups of canine MT included in subgroup specific analysis^a

Degree of malignancy	Tumour subtypes	n tumours	% of all malignant tumours
I	Complex carcinoma, in situ carcinoma	149	28.4
II	Simple carcinoma (incl. tubulopapillary/papillary/cystic/ductal/mucinous types)	197	37.5
III	Solid carcinoma	56	10.7
IV	Anaplastic, inflammatory, invasive carcinoma, tumours with lymphatic invasion (lymphangiosis carcinomatosa)	123	23.4
Total		525	100

Abbreviation: MT, mammary tumour.

^aFollowing the scheme proposed by Schmidt and Kessler²⁹ and used in a previous publication.²⁵

If a nodule contained different entities or subtypes, the mass was assigned to the most malignant subtype represented. All subtypes of benign tumours were grouped together as one group ("benign neoplasia").

Statistical analyses were performed using the commercially available statistical software package BMDP/Dynamic, Release 8.1.³⁰ The Chi-squared test was calculated to identify an association between neuter status and specific age groups, tumour malignancy and size. A *t* test was used to determine an association between neuter status, malignancy and mean tumour size. Furthermore, the exact Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to determine whether there was an association between neuter status and the degree of malignancy. The Spearman rank correlation coefficient was calculated to identify a correlation between tumour size and different subtypes in correlation to neuter status. Statistical significance was defined as $p < .05$.

3 | CELL LINE VALIDATION STATEMENT:

No cell lines were used in the current study.

4 | RESULTS

4.1 | Study population and comparison with the control population

The 625 female dogs presented with a total of 1459 MTs. Data on demographics has already been published in an earlier manuscript²⁵ and are only added for completeness of information in Table 2. Data on time of neutering was available for 43 of the 123 neutered MT bearing dogs: 2 patients were neutered at the age of 2 years and younger and another 2 patients at 3 years of age. Thirty-nine patients were neutered between 4 and 14 years of age.

Data of a total of 31 078 female dogs was available as control population and for description of neuter status: Intact and neutered females made up 49.0% ($n = 15 222$) and 51.0% ($n = 15 856$), respectively. Patients less than 1 year of age ($n = 3718$) were intact in 89.4%

($n = 3323$) and only 10.6% ($n = 395$) had been spayed before or after the first oestrous cycle. At 2 years of age 20.2% of the population ($n = 6578$) had been spayed whereas 79.8% were still intact, demonstrating a low rate of neutering before adulthood in the general dog population in Germany. For further statistical comparison with the MT bearing dogs, only dogs in the age risk group for MTs (≥ 4 years; $n = 19 968$, Table 2) were used: in this group 38.2% of the bitches were intact and 61.8% were neutered. Mean age at first visit was 8.9 ± 3.0 years and mean body weight was 22.3 kg (range 1.0–90.0 kg).

A significant difference in the distribution between neutered and intact bitches was found between the MT patients and the control population. In the control population ≥ 4 years of age only 38.2% were intact, compared to 80.3% of the dogs with MTs: MT were more than 6.5 times more likely to occur in intact dogs, than in neutered dogs (OR: 6.6036, 95% CI: 5.406–8.0596, $p < .0001$).

4.2 | Characteristics and number of the tumours

60.2% ($n = 879$) of the 1459 MTs were benign and 39.8% ($n = 580$) were malignant. Five hundred and twenty-five of the malignant tumours could be grouped into the aforementioned four malignancy categories (Table 1). An exclusion from subgroup-specific analysis was necessary for 55 cases, as they could not be assigned to any of the subgroups.

In 285 patients (=45.6%) only a single MT was present, 340 patients (=54.4%) had two or multiple (up to 12) tumours. Taking the neuter status into account (Table 3), only 40.7% of the spayed patients had multiple MTs ($n = 50$), whereas 57.8% of the intact dogs had more than one tumour ($p = .0006$, OR: 1.9972, 95% CI: 1.3374–2.9825). Eight or more concurrent MTs were only seen in intact patients.

4.3 | Association between tumour characteristics and neuter status

In intact dogs the majority (62.8%) of the tumours were benign, whereas in spayed dogs only 45.9% were benign (Table 4; Pearson

	MT patients	Control population
Mean age at diagnosis	9.7 \pm 2.5 years	8.9 \pm 3.0 years
Neuter status		
Intact	502 (=80.3%)	7626 (=38.2%)
Neutered	123 (=19.7%)	12 339 (=61.8%)
Breed ^a		
Pure breed	474 (=75.8%)	13 567 (=67.9%)
Mixed breed	149 (=23.8%)	6401 (=32.1%)
Mean weight (range) ^b	21.0 kg (1.4–67.5 kg)	22.3 kg (1.0–90.0 kg)

TABLE 2 Characteristics of MT patients ($n = 625$) and control population ($n = 19 968$)

Abbreviation: MT, mammary tumour.

^aBreed information was not available for two MT bearing dogs.

^bFor three MT patients, no weight had been documented in the records.

TABLE 3 Single versus multiple MT in intact and neutered female dogs

Number of tumours	Number of patients (n)	Intact		Neutered	
		n	%	n	%
1	285	212	42.2	73	59.3
2	132	104	20.7	28	22.8
3	91	82	16.3	9	7.3
4	47	41	8.2	6	4.9
5	30	25	5.0	5	4.1
6	15	14	2.8	1	0.8
7	11	10	2.0	1	0.8
8	4	4	0.8		
9	4	4	0.8		
10	4	4	0.8		
11	0				
12	2	2	0.4		
Total	625	502	100	123	100

Abbreviation: MT, mammary tumour.

TABLE 4 Neuter status and MT malignancy

Neuter status	Benign MT		Malignant MT	
	n	%	n	%
Intact	778	62.8	461	37.2
Neutered	101	45.9	119	54.1
Total	879		580	

Note: Pearson chi-square: 22.236; $p < .0001$.
Abbreviation: MT, mammary tumour.

ChiSquare: 22.236). Intact dogs were almost twice as likely to have a benign MT compared to their neutered counterparts (OR: 1.9884; 95% CI: 1.4892–2.6550; $p < .0001$).

Mean tumour sizes associated with malignancy had been published in a previous publication²⁵ and are only added for completeness of data: Malignant tumours had a significantly larger mean tumour size compared to benign tumours (1.94 cm vs. 0.90 cm, respectively; $p < .0001$). This could also be demonstrated in intact dogs (mean tumour size of malignant tumours: 1.90 cm (SD: 2.51 cm) compared

to a mean tumour size of 0.91 cm (SD: 1.23 cm) of benign tumours; $p < .0001$) and their neutered counterparts (malignant tumours: 2.13 cm [SD: 2.24 cm] vs. benign tumours: 0.85 cm [SD: 0.90 cm]; $p < .0001$). There was no significant difference in mean tumour sizes for benign or malignant tumours in association to neuter status ($p = .351$ vs. $p = .369$; respectively). Mean MT size in intact dogs (=1.27 cm (SD: 1.88 cm) was not significantly different to mean tumour size in neutered dogs (=1.54 cm [SD: 1.87 cm]), despite a numerically larger mean tumour size ($p = .053$).

A strong association between tumour size, malignancy and neuter status could be demonstrated (Table 5). Tumours <1 cm were malignant in only 29.1% of the intact but malignant in 43.2% of the neutered patients. Small MTs (<1 cm) were almost twice more likely to be malignant in neutered females than in intact females. (OR: 1.8576; 95% CI: 1.2491–2.7625; $p = .0022$). Tumours ≥ 2 cm were malignant in 62.0% of the intact, compared to 86.9% of the neutered patients. MTs ≥ 2 were four times more likely to be malignant in neutered patients compared to their intact counterparts (OR: 4.0536; 95% CI: 1.8453–8.9040; $p = .0005$). In both, intact and neutered patients, a positive correlation between increasing tumour size and a

TABLE 5 Tumour size, malignancy and neuter status

T category ^a	Tumour size (cm)	Intact				Neutered			
		Benign		Malignant		Benign		Malignant	
		n	%	n	%	n	%	n	%
T1	<1	532	70.9	218	29.1	67	56.8	51	43.2
	≥ 1 to <2	153	62.7	91	37.3	26	63.4	15	36.6
	≥ 2 to <3	49	50.0	49	50.0	3	21.4	11	78.6
T2	≥ 3 to <5	26	31.7	56	68.3	3	10.3	26	89.7
T3	≥ 5	18	27.7	47	72.3	2	11.1	16	88.9

^aT-category according to the modified TNM staging system.³¹

Neuter status		Benign	Degree I	Degree II	Degree III	Degree IV
Intact	n	778	128	150	43	91
	%	65.4	10.8	12.6	3.6	7.6
Neutered	n	101	21	47	13	32
	%	47.2	9.8	22.0	6.1	15.0

TABLE 6 Neuter status and degree of malignancy in canine MT (n = 1404)

Note: Wilcoxon Mann-Whitney two-sided p value $p < .0001$.

Abbreviation: MT, mammary tumour.

change from benign to malignant histology was confirmed ($r_s = .259$; $p < .0001$ and $r_s = .278$; $p < .0001$, respectively).

When evaluating the degree of malignancy of the MT between neutered and intact individuals a significant difference could be detected (Table 6; $p < .0001$). Tumours of advanced malignancy were approximately twice as common in neutered patients compared to intact dogs; for example, 15% of the MT in neutered dogs were anaplastic carcinomas compared to 7.6% in intact dogs (OR: 2.1234, 95% CI: 1.3782–3.2717; $p = .0006$). In addition, a positive correlation between increasing tumour size and increasingly malignant phenotype could be identified in intact ($r_s = .179$; $p = .0003$) and spayed ($r_s = .217$; $p = .021$) patients.

5 | DISCUSSION

MTs are a common finding in female canine patients. This retrospective study draws a comparison between a large MT population to a control population of non-MT-bearing dogs in Germany. Our data support the hypothesis that neutering in adulthood is still a valuable tool in decreasing the risk for MT development in general but also to reduce the risk of tumour multiplicity. In addition, this study demonstrated a significant correlation between the neuter status of the bitch, the size and degree of malignancy of canine MTs. The results of our study are of considerable clinical relevance and are therefore a valuable addition to the veterinary literature.

There are numerous studies on the demographics (breed, age and weight distribution) of dogs with MTs, but in most cases, these do not relate their data to the overall canine population of the respective country.^{3,14,19,32,33} However, in order to evaluate the characteristics of a tumour bearing population it should be compared to the general canine population of the country during the same observation period. Census data on the total population of canines in a given country or region are frequently not available, therefore it is usually necessary to choose a representative control population which most closely resembles the true canine population demographics. For control populations, many studies have selected the general hospital population. As the hospital population of a clinic may vary depending on the specialties of the clinic, as well as regional breed or dog size favourites, some studies have preferred using the data of the insured pet population as a control population for epidemiologic studies.³⁴ Lately, meta-data such as Vetcompass (a collaborative data service originally developed at the Royal Veterinary College [RVC], United Kingdom which collects and aggregates clinical records) have

been used for research.^{35,36} In the present study, a control population comprising the general hospital population of females that had been presented for issues other than MTs during the same time period was selected since meta-data sets such as Vetcompass are unavailable in Germany. In a prior study in which the hospital population was compared to a control population of over 100 000 dogs based on insurance company data in Germany, only marginal differences between both control groups were found,³⁷ making this population a useful control group. For our comparison with the control population, only patients ≥ 4 years of age were chosen, as this age group was considered at risk for MT manifestation. However, for future studies, exact age matching should be conducted to prevent confounding.

The percentage of neutered dogs in the general canine population in Germany is largely unknown. In the United States and some other countries, the majority of canine bitches is neutered, with many ovariectomies performed early in life or even pre-puberty.^{9,38–42} For Germany, large scale studies concerning the overall percentage of neutered bitches and the rate of early gonadectomy are unavailable. Based on the data presented almost 62% of the female canine population ≥ 4 years of age has been spayed. However, early gonadectomy is not a typical procedure in Germany with only 10.6% dogs in the control group spayed earlier than 1 year of age. Even though data on time of neutering was only available for about 1/3 of the MT bearing population, 90% (=39/43) of dogs was 4 years and older at the time of neutering, also suggesting a rather late gonadectomy in the MT bearing population.

A recent French study analysing the prevalence of reproductive disorders including MT in female dogs, found similar results with only 8.3% of the patients being neutered before 2 years of age.⁴³

The predisposition of intact dogs for the development of MTs has been described by various authors,^{1,12–14,32,44} but many authors believe that the risk of MT development is not significantly decreased when hormonal ablation is performed in adulthood. From the presented data, however, one can assume a low rate of pre-puberty gonadectomy in Germany. Therefore, potential influences of juvenile or early neutering on MT development can be largely excluded in our MT population. When comparing the MT group with the controls ≥ 4 years of age (which can be considered the age group at risk for MT manifestation), a significant overrepresentation of intact dogs in the tumour population was documented making intact bitches >6.5 times more likely to develop a MT compared to their neutered counterparts. These observations suggest that even a gonadectomy later in life still significantly decreases the risk of developing MTs.

The occurrence of several or multiple simultaneous MTs in dogs has been reported to range from 23% to 70%.^{19,45–47} The general influence of sexual hormones on the mammary tissue, but also local effects or a field effect, may play a role in tumour multiplicity.⁴⁸ In a recent study statistical calculations suggested the presence of a biological relationship between simultaneously occurring tumours in the canine mammary chain.⁴⁷ A German study demonstrated a highly significant relationship between the malignancy of MTs occurring in adjacent mammary complexes in the same mammary chain but not between tumours originating from the corresponding complex on the contralateral chain, suggesting an influence of autocrine, non-hormonal or genetic factors in tumour multiplicity or local metastatic spread from a primary tumour, for example, via the lymphatic system of the mammary gland.⁴⁹ In previous studies the effects of gonadectomy on the prevalence and types of tumours in mammary cancer multiplicity had not been thoroughly investigated. In the study by Gunnes et al.,⁴⁷ 23% of 213 dogs with MT had more than one tumour simultaneously and 80% of the dogs with multiple MTs were intact. In the aforementioned German study more than 50% of intact females with radical mastectomies had more than one tumour.⁴⁹ This is consistent with the results of the current study, in which more than 50% of all patients had multiple tumours, with multiplicity occurring significantly more common in intact versus neutered dogs (57.8% vs. 40.7%; Table 3). While other effects may also play a role in the simultaneous occurrence of MT, these results suggest that sex-hormone driven carcinogenesis is a major determinant and gonadectomy at any time significantly reduces the risk of tumour multiplicity.

In the present study, there was a significant difference (Table 4; $p < .0001$) between intact and neutered patients regarding the malignancy of the mammary masses: MT in intact patients were malignant in only about one third of the cases (=37.2%), compared to more than half of the cases (=54.1%) in neutered dogs. It is noteworthy that in the current study spayed patients had significantly more tumours of advanced malignancy (Table 6; $p < .0001$). So, while reducing the overall risk for MT development, hormonal ablation at any time in life appears to lead to a higher frequency of higher malignant tumour subtypes and could therefore contribute to a poorer prognosis of neutered bitches with MTs. The same observation was reported in a previous study, which in multivariate analysis confirmed spay status as an independent negative prognostic variable. According to that study, spayed females experienced a 4.5 times higher hazard of recurrence or metastasis compared to intact females and had an overall poorer survival time.⁵⁰ In humans, the effect of surgical hormonal ablation in reducing breast cancer risk was already demonstrated in the 1960s.^{51,52} Significant differences in the characteristics of breast cancer in pre- and postmenopausal women and thus the influence of cycling ovarian hormones on breast cancer development has sparked a discussion whether the development of mammary cancer in relation to menopause has different aetiologies and may actually represent two different diseases.⁵³ It has been demonstrated that mammary cancer in premenopausal women has (among other features associated with malignancy) a higher expression of sexual hormone receptors (HR).⁵⁴ The expression of HR in canine MTs has been widely

discussed in the last years, and a more recent study⁵⁵ confirmed the results of older publications, suggesting an overall lower HR expression in mammary carcinomas compared to benign lesions.^{56–58} The HR expression decreases even further with higher degrees of malignancy,^{55,56} which also associates with a higher risk for metastases.⁵⁷ Interestingly it has been shown that HR expression is not only significantly decreased in malignant MTs of ovariectomised compared to intact females,⁵⁵ but it has also been hypothesised that ovariectomy might lead to the development of HR-negative¹³ (and therefore possibly more malignant) tumours. This supports our findings, that spayed dogs compared to their intact counterparts have significantly more malignant MT and among them significantly more aggressive subtypes.

Previous studies not only demonstrated an association between decreased HR expression and tumour size,^{33,55–57} but also between tumour size and malignancy, confirming the role of tumour diameter as predictor of MT behaviour.^{19,25,33,50} In the present study, an association between tumour size and neuter status was also demonstrated. Since in a neutered dog the mammary chain does not show any parenchymal changes throughout the year it may be possible that a mammary nodule might attract an owner's attention earlier and thus at a smaller size. However, in spayed bitches 87% of the MTs ≥ 2 cm were malignant, compared to 62% in intact bitches (Table 5). A positive correlation between size and malignancy could be demonstrated for both, intact and neutered patients. Sorenmo et al.¹⁹ demonstrated a histological continuum from benign to malignant in a rather small study group of intact canines ($n = 90$). Our results suggest that this progression occurs even at smaller tumour sizes in hormonally-deprived patients which could explain the higher percentage of malignant tumours in neutered dogs. Oestrogen has been accepted as a main hormone in mammary tumorigenesis in women and dogs.^{59–61} Besides a promoting effect on MT development in general, we suggest that there may also be a protective effect in regards to the malignant progression in the histologic continuum via non-receptor⁶⁰ or immunoregulatory mechanisms.^{62,63}

The effect of sexual hormone deprivation on the histologic continuum of canine MTs is further supported by the observation that in the current study highly malignant subtypes of carcinomas represented 15% of the MT found in spayed compared to only 7.6% in intact dogs. Similar observations were made in another study where spayed females were overrepresented by 70% in a group of patients with inflammatory mammary carcinomas.⁶⁴

As mammary tumorigenesis is a multifactorial process, other factors as obesity⁶⁵ or breed predisposition⁶⁶ might be contributing to malignancy. In our previously published paper on the same population of MT-bearing, body weight was not associated with malignancy,²⁵ however body condition score had not been documented or analysed. Further prospective studies are warranted to elucidate co-factors of tumorigenesis.

The currently most used Malignant Tumours (TNM) staging system for canine MTs is the modified staging system by Rutteman, Withrow³¹ which is based on the old classification system published by Owen.⁶⁷ In this system, T-categories are simply based on tumour

diameter, with tumours <3 cm in diameter classified as T1, tumours 3–5 cm as T2 and >5 cm as T3. Based on our findings the proportion of highly malignant subtypes at different tumour diameters is different in intact and spayed bitches (cf. Table 5). Also, the positive correlation between increasing tumour size and increasing malignant phenotype was slightly stronger in spayed patients ($r_s = .217$; $p = .021$) compared to intact ones ($r_s = .179$; $p = .0003$). It may therefore be worthwhile for future updates of the TNM system to consider different diameter increments for the T-categories based on the neuter status of the patient to account for these differences.

MTs are most common in intact females and neutering significantly reduces the risk for the development of single or multiple MTs. However, in spayed dogs, mammary nodules are more likely to be malignant and of a higher malignant subtype. Small mammary masses in neutered females should not be presumed to be benign.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to express their gratitude to Klaus Failing, Unit for Biomathematics and Data Processing of the Veterinary Faculty of the Justus-Liebig-University Giessen, Germany, for his assistance in the statistical analysis of the data.

CONFLICT OF INTEREST

The authors of this manuscript declare no competing interests financial or non-financial that might have influenced their interpretation or presentation of the data presented in this manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Julia Gedon  <https://orcid.org/0000-0002-7435-8844>

REFERENCES

- Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst.* 1968;40(2):307-318.
- MacVean DW, Monlux AW, Anderson PS Jr, Silberg SL, Roszel JF. Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Vet Pathol.* 1978;15(6):700-715.
- Vascellari M, Capello K, Carminato A, Zanardello C, Baioni E, Mutinelli F. Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): risk factors and similarities to human breast cancer. *Prev Vet Med.* 2016;126:183-189.
- Perez Alenza MD, Pena L, del Castillo N, Nieto AI. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract.* 2000;41(7):287-291.
- Gruntzig K, Graf R, Boo G, et al. Swiss Canine Cancer Registry 1955-2008: occurrence of the most common tumour diagnoses and influence of age, breed, body size, sex and neutering status on tumour development. *J Comp Pathol.* 2016;155(2-3):156-170.
- Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst.* 1969;43(6):1249-1261.
- Olson PN, Kustritz MV, Johnston SD. Early-age neutering of dogs and cats in the United States (a review). *J Reprod Fertil Suppl.* 2001;57:223-232.
- Tevejo R, Yang M, Lund EM. Epidemiology of surgical castration of dogs and cats in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 2011;238(7):898-904.
- Torres de la Riva G, Hart BL, Farver TB, et al. Neutering dogs: effects on joint disorders and cancers in golden retrievers. *PLoS One.* 2013;8(2):e55937.
- Beauvais W, Cardwell JM, Brodbelt DC. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs—a systematic review. *J Small Anim Pract.* 2012;53(6):314-322.
- Misdorp W. Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet Q.* 1988;10(1):26-33.
- Morris JS, Dobson JM, Bostock DE, O'Farrell E. Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. *Vet Rec.* 1998;142(24):656-658.
- Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J Vet Intern Med.* 2000;14(3):266-270.
- Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc.* 2005;227(10):1625-1629.
- Arlt S, Wehrend A, Reichler IM. Neutering of female dogs—old and new insights into pros and cons. *Tierarzt Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2017;45(4):253-263.
- Howe LM. Current perspectives on the optimal age to spay/castrate dogs and cats. *Vet Med (Auckl).* 2015;6:171-180.
- Kristiansen VM, Nodtvedt A, Breen AM, et al. Effect of ovariectomy at the time of tumor removal in dogs with benign mammary tumors and hyperplastic lesions: a randomized controlled clinical trial. *J Vet Intern Med.* 2013;27(4):935-942.
- Kristiansen VM, Pena L, Diez Cordova L, et al. Effect of ovariectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial. *J Vet Intern Med.* 2016;30(1):230-241.
- Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, et al. Canine mammary gland tumours: a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol.* 2009;7(3):162-172.
- Salmeri KR, Bloomberg MS, Scruggs SL, Shille V. Gonadectomy in immature dogs: effects on skeletal, physical, and behavioral development. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;198(7):1193-1203.
- Hart BL. Effects of neutering and spaying on the behavior of dogs and cats: questions and answers about practical concerns. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;198(7):1204-1205.
- Hart BL, Hart LA, Thigpen AP, Willits NH. Assisting decision-making on age of neutering for mixed breed dogs of five weight categories: associated joint disorders and cancers. *Front Vet Sci.* 2020;7:472.
- Hoffman JM, Creevy KE, Promislow DE. Reproductive capability is associated with lifespan and cause of death in companion dogs. *PLoS One.* 2013;8(4):e61082.
- Urfer SR, Kaeberlein M. Desexing dogs: a review of the current literature. *Animals (Basel).* 2019;9(12):1086. <https://doi.org/10.3390/ani9121086>
- Gedon J, Wehrend A, Failing K, Kessler M. Canine mammary tumours: size matters—a progression from low to highly malignant subtypes. *Vet Comp Oncology.* 2021;19(4):707-713.
- Mohammed SI, Utturkar S, Lee M, et al. Ductal carcinoma in situ progression in dog model of breast cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(2):418. <https://doi.org/10.3390/cancers12020418>.
- Misdorp WER, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP. *Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat.* Vol 7. Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization; 1999.

28. Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011;48(1):117-131.
29. Schmidt JM, Kessler M. Mammatumoren des Hundes. In: Kessler M, ed. *Kleintieronkologie*. 3rd ed. Enke Verlag; 2013:241-252.
30. Dixon WJ, ed. *BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2*. University of California Press; 1993.
31. Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG. Tumours of the mammary gland. In: Withrow SJ, EG ME, eds. *Small Animal Clinical Oncology*. WB Saunders; 2001.
32. Gottwald D. *Ein Beitrag zur Häufigkeit von Mammatumoren beim Hund. Statistische Auswertung der Einsendungen einer Praxis für Tierpathologie aus den Jahren 1990 bis 1995*. Dissertation Vet Med. LMU München; 1998.
33. Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcaniti MF, Schmitt FC, Cassali GD. The relationship between tumor size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol.* 2009;7(4):230-235.
34. Egenvall A, Nødtvedt A, Penell J, Gunnarsson L, Bonnett BN. Insurance data for research in companion animals: benefits and limitations. *Acta Vet Scand.* 2009;51(1):42.
35. O'Neill D, Church DB, McGreevy PD, Thomson PC, Brodbelt DC. Prevalence of disorders recorded in dogs attending primary-care veterinary practices in England. *PLoS One.* 2014;9(3):e90501.
36. McGreevy P, Thomson P, Dhand NK, et al. VetCompAss Australia: a national big data collection system for veterinary science. *Animals (Basel).* 2017;7(10):74. <https://doi.org/10.3390/ani7100074>.
37. Ernst T, Kessler M, Lautscham E, Willmizig L, Neiger R. Multicentric lymphoma in 411 dogs—an epidemiological study. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2016;44(4):245-251.
38. Howe LM, Slater MR, Boothe HW, Hobson HP, Holcom JL, Spann AC. Long-term outcome of gonadectomy performed at an early age or traditional age in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;218(2):217-221.
39. Spain CV, Scarlett JM, Cully SM. When to neuter dogs and cats: a survey of New York state veterinarians' practices and beliefs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2002;38(5):482-488.
40. Spain CV, Scarlett JM, Houpt KA. Long-term risks and benefits of early-age gonadectomy in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2004;224(3):380-387.
41. Houlihan KE. A literature review on the welfare implications of gonadectomy of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2017;250(10):1155-1166.
42. Sánchez-Vizcaino F, Noble PM, Jones PH, et al. Demographics of dogs, cats, and rabbits attending veterinary practices in Great Britain as recorded in their electronic health records. *BMC Vet Res.* 2017;13(1):218.
43. Beaudu-Lange C, Larrat S, Lange E, Lecoq K, Nguyen F. Prevalence of reproductive disorders including mammary tumors and associated mortality in female dogs. *Vet Sci.* 2021;8(9):184. <https://doi.org/10.3390/vetsci8090184>.
44. Rasotto R, Berlatto D, Goldschmidt MH, Zappulli V. Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: an observational cohort study of 229 cases. *Vet Pathol.* 2017;54(4):571-578.
45. Fowler EH, Wilson GP, Koestner A. Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification. *Vet Pathol.* 1974;11(3):212-229.
46. Benjamin SA, Lee AC, Saunders WJ. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Vet Pathol.* 1999;36(5):423-436.
47. Gunnes G, Borge KS, Lingaas F. A statistical assessment of the biological relationship between simultaneous canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol.* 2017;15(2):355-365.
48. Chai H, Brown RE. Field effect in cancer—an update. *Ann Clin Lab Sci.* 2009;39(4):331-337.
49. Stratmann N, Failing K, Wehrend A. Investigations on localisation and dignity of mammary tumours in bitches with multiple mammary neoplasias. *Tierarztl Prax.* 2006;34(1):23-28.
50. Pena L, De Andres PJ, Clemente M, Cuesta P, Perez-Alenza MD. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Vet Pathol.* 2013;50(1):94-105.
51. Hirayama T, Wynder EL. A study of the epidemiology of cancer of the breast. II. The influence of hysterectomy. *Cancer.* 1962;5:28-38.
52. Feinleib M. Breast cancer and artificial menopause: a cohort study. *J Natl Cancer Inst.* 1968;41(2):315-329.
53. de Waard F. Premenopausal and postmenopausal breast cancer: one disease or two? *J Natl Cancer Inst.* 1979;63(3):549-552.
54. Feng F, Wei Y, Zheng K, et al. Comparison of epidemiological features, clinicopathological features, and treatments between premenopausal and postmenopausal female breast cancer patients in western China: a retrospective multicenter study of 15,389 female patients. *Cancer Med.* 2018;7(6):2753-2763.
55. Mainenti M, Rasotto R, Carnier P, Zappulli V. Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *Vet J.* 2014;202(1):62-68.
56. Donnay I, Raus J, Devleeschouwer N, Wouters-Ballman P, Leclercq G, Versteegen J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *Am J Vet Res.* 1995;56(9):1188-1194.
57. Nieto A, Pena L, Perez-Alenza MD, Sanchez MA, Flores JM, Castano M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol.* 2000;37(3):239-247.
58. Millanta F, Calandrella M, Bari G, Nicolini M, Vannozzi I, Poli A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci.* 2005;79(3):225-232.
59. Feigelson HS, Henderson BE. Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis.* 1996;17(11):2279-2284.
60. Sorenmo KU, Durham AC, Radelli E, et al. The estrogen effect; clinical and histopathological evidence of dichotomous influences in dogs with spontaneous mammary carcinomas. *PLoS One.* 2019;14(10):e0224504.
61. Schmitt FC. Multistep progression from an estrogen-dependent growth towards an autonomous growth in breast carcinogenesis. *Eur J Cancer.* 1995;31a(12):2049-2052.
62. Muñoz-Cruz S, Tognio-Pierce C, Morales-Montor J. Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role. *Curr Top Med Chem.* 2011;11(13):1714-1727.
63. Mucha J, Rybicka A, Dolka I, et al. Immunosuppression in dogs during mammary cancer development. *Vet Pathol.* 2016;53(6):1147-1153.
64. Marconato L, Romanelli G, Stefanelli D, et al. Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). *J Am Vet Med Assoc.* 2009;235(8):967-972.
65. Lim HY, Im KS, Kim NH, et al. Effects of obesity and obesity-related molecules on canine mammary gland tumors. *Vet Pathol.* 2015;52(6):1045-1051.
66. Itoh T, Uchida K, Ishikawa K, et al. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci.* 2005;67(3):345-347.
67. Owen LN. World Health Organization Veterinary Public Health Unit, WHO Collaborating Center for Comparative Oncology. *TNM Classification of Tumours in Domestic Animals*/edited by LN. Owen. World Health Organization. 1980; pp. 16-18. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68618>

How to cite this article: Gedon J, Wehrend A, Kessler M. Ovariectomy reduces the risk of tumour development and influences the histologic continuum in canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol.* 2022;20(2):476-483. doi:10.1111/vco.12793

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Fragestellung

Die häufigste Tumorerkrankung, die dem Praktiker im Alltag bei der Untersuchung einer Hündin begegnet, ist der Mammatumor (Brodey, Fidler et al. 1966, Dorn, Taylor et al. 1968, MacVean, Monlux et al. 1978, Vascellari, Capello et al. 2016). Je nach Studie geht man davon aus, dass bis zu 60% der Mammatumoren maligne sind (Benjamin, Lee et al. 1999, Stratmann, Failing et al. 2006, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Vascellari, Capello et al. 2016). Mammatumoren werden nach dem aktuell gültigen histopathologischen Klassifikationsschema in verschiedene Subtypen unterteilt und seit einigen Jahren zusätzlich nach dem Gradierungsschema nach Peña in drei verschiedene Grade eingeteilt (Clemente, Perez-Alenza et al. 2010, Goldschmidt, Peña et al. 2011, Peña, De Andres et al. 2013). Maligne Mammatumoren verhalten sich unterschiedlich aggressiv und es kann eine Zunahme an Malignität von komplexen zu einfachen, weiter zu soliden und dann anaplastischen Karzinomen beobachtet werden (Misdorp and Hart 1976, Rasotto, Berlato et al. 2017). In einer Studie werden auch subtypen-spezifische Überlebenszeiten betroffener Hunde beschrieben: Tiere mit komplexen Karzinomen hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 36 Monaten (mediane Überlebenszeit nicht erreicht), wohingegen bspw. Patienten mit einem soliden Karzinom nur 15,6 Monate (mediane Überlebenszeit 8 Monate) und Hündinnen mit einem anaplastischen Karzinom nur 4,2 Monate (mediane Überlebenszeit 3 Monate) überlebten.

Lange ging man davon aus, dass es sich beim Mammatumor der Hündin um eine statische Entität handelt, obwohl bei der Frau eine mehrstufige dynamische Karzinogenese von einer gutartigen Hyperplasie, über eine präneoplastische Läsion mit milden Atypien zum invasiven Karzinom schon lange akzeptiert ist (Lakhani 1999, Hartmann, Sellers et al. 2005, Cichon, Degnim et al. 2010, Sinn, El Sawaf et al. 2010, Thike, Iqbal et al. 2013, Hartmann, Degnim et al. 2015, Renshaw and Gould 2016). Ähnliche Beobachtungen wurden in den letzten Jahrzehnten auch beim Hund gemacht (Gilbertson, Kurzman et al. 1983, Benjamin, Lee et al. 1999, Antuofermo, Miller et al. 2007, Ferreira, Gobbi et al. 2012). Die häufigste präneoplastische Veränderung im kaninen Mammaparenchym stellt hier der hyperplastische alveoläre Knoten dar (Cameron and Faulkin 1971), ebenso kommen atypische duktale Hyperplasien vor (Antuofermo, Miller et al. 2007, Ferreira, Gobbi et al. 2012). Damit drängt sich die Frage auf, inwieweit auch in der Tiermedizin eine neoplastische Transformation und

Progression auftritt. In diesem Zusammenhang wurde von Sorenmo, Kristiansen et al. (2009) der Begriff des histologischen Kontinuums etabliert. In einer Studie mit 90 intakten Hündinnen mit insgesamt 236 Mammatumoren konnten die Autoren zeigen, dass maligne Tumoren signifikant größer als benigne Tumoren waren. Sie schlussfolgerten, dass Karzinome das Endstadium einer kontinuierlichen Entdifferenzierung darstellten. Zum anderen war in einigen Fällen auch mikroskopisch eine Tumorprogression nachweisbar. So wurde in 4 Fällen ein maligner Tumor innerhalb einer benignen Läsion diagnostiziert (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009).

Mammatumoren werden überproportional häufig bei intakten Hündinnen diagnostiziert (MacVean, Monlux et al. 1978, Gruntzig, Graf et al. 2016, Vascellari, Capello et al. 2016, Burrai, Gabrieli et al. 2020), und im Gespräch mit den Besitzer*innen stellt sich daher immer wieder die Frage nach möglichen präventiven Maßnahmen oder auch nach einer Kastration zum Zeitpunkt der Mammatumorentfernung. Man geht zwar davon aus, dass eine frühe Kastration das Mammatumor-Risiko deutlich senken kann (Schneider, Dorn et al. 1969, Moe 2001, Sorenmo 2003, Egenvall, Bonnett et al. 2005), kritische Stimmen hinterfragen aber die Aussagen der Literatur, auf der diese Theorie basiert (Beauvais, Cardwell et al. 2012). Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass ein protektiver Effekt einer Kastration nicht auszuschließen ist, die Datenlage aber nicht ausreicht, um darauf eine Empfehlung zu stützen. Auch der Nutzen einer späten oder zeitgleich zur Mastektomie durchgeführten Kastration ist abschließend nicht geklärt (Sorenmo, Shofer et al. 2000, Kristiansen, Nodtvedt et al. 2013, Kristiansen, Peña et al. 2016, Sorenmo, Durham et al. 2019, Banchi, Morello et al. 2022). Zudem ist bekannt, dass bei kastrierten Hunden das Risiko für andere neoplastische, degenerative oder gynäkologische Erkrankungen und Verhaltensstörungen erhöht sein kann (Cooley, Beranek et al. 2002, Torres de la Riva, Hart et al. 2013, Hart, Hart et al. 2014, Zink, Farhooody et al. 2014, Hart 2016, Pegram, Brodbelt et al. 2019). Eine neue Publikation schlägt sogar rassespezifische Kastrationszeiträume vor, die das Risiko für degenerative oder neoplastische Probleme minimieren soll (Hart, Hart et al. 2020). Weiterhin ist anzumerken, dass das Deutsche Tierschutzgesetz (§6 Abs.1) die Indikation der Prävention einer Erkrankung durch die Amputation eines Organs, was die Kastration darstellt, nicht nennt (Arlt, Wehrend et al. 2017).

Ziel dieser Arbeit war es zum einen epidemiologische Faktoren wie Alter, Gewicht und Reproduktionsstatus und deren Einfluss auf das Mammatumor-Risiko, eine mögliche Tumorprogression und Tumorcharakteristika wie Größe und Multiplizität näher zu beleuchten. Zum anderen sollte untersucht werden, inwieweit die angesprochenen Tumorcharakteristika einen Einfluss auf die Malignität des Mammatumors haben und damit die Frage nach einem weiteren histologischen Kontinuum innerhalb des malignen Spektrums klären. Die Bestimmung eines „Cut-Off“-Wertes, ab dem ein Mammatumor sicher benigne oder maligne ist, könnte dabei helfen, die Empfehlung zur Mastektomie wissenschaftlich fundiert zu belegen. Somit sind die Fragestellungen dieser Studie als höchst signifikant für den klinischen Alltag der Kleintierpraxis zu bewerten.

4.2 Diskussion der Methodik

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine retrospektive Datenauswertung von 625 Hündinnen mit insgesamt 1.459 Mammatumoren durchgeführt und mit einer großen Kontrollpopulation verglichen. Nachteile derartiger Auswertungen sind die möglicherweise fehler- bzw. lückenhafte Dokumentation und damit mangelnde Datenqualität, nicht standardisiertes Vorgehen in Diagnostik und Therapie sowie eine Unterschätzung anderer kausaler Zusammenhänge (Hess 2004). Nachdem sich die vorliegende Arbeit auf die Auswertung demographischer Daten, Tumorgröße und pathohistologischer Befunde beschränkt, ist ein standardisiertes Vorgehen bei der Therapie oder anderer Staging-Maßnahmen für diese Zwecke irrelevant. Hündinnen mit fehlenden Angaben zu Alter, Gewicht, Rasse, Kastrationsstatus oder fehlenden bzw. unklaren Informationen zu Tumorlokalisation, -anzahl und -durchmesser wurden nicht inkludiert. Nachdem das Patientengut in einer u.a. auf Onkologie spezialisierten Tierklinik erhoben wurde, muss ein Selektions- bzw. Überweisungsbias in Betracht gezogen werden (Bartlett, Van Buren et al. 2010, O'Neill, Church et al. 2014). Im vorliegenden Patientengut könnten daher möglicherweise überproportional viele Hündinnen mit besonders großen Tumoren vertreten sein, die ggf. in anderen Praxen oder Tierkliniken als nicht operabel eingeschätzt worden sind.

Als Vergleichspopulation diente eine Gruppe an Hündinnen, die im selben Zeitraum nicht wegen eines Mammatumors in der Tierklinik Hofheim vorgestellt wurden. Um der Tatsache, dass Mammatumoren nur selten bei Hunden unter 4 Jahren auftreten

(Taylor, Shabestari et al. 1976, Gamlem, Nordstoga et al. 2008, Schmidt and Kessler 2013, Vascellari, Capello et al. 2016) Rechnung zu tragen und um einem Selektionsbias vorzubeugen, wurden nur Hündinnen ≥ 4 Jahren für die demographische Auswertung eingeschlossen. Anzumerken ist, dass eine Klinikpopulation durch regionale Vorlieben für Rasse und Hundegröße oder auch die Spezialisierung der Klinik beeinflusst sein kann, weswegen zur Auswertung epidemiologischer Charakteristika als Vergleichspopulation auch gerne die Population krankensversicherter Patienten aus dem Einzugsbereich der Tiere mit Tumoren herangezogen wird (Dobson, Samuel et al. 2002, Egenvall, Bonnett et al. 2005, Egenvall, Nødtvedt et al. 2009, Jitpean, Hagman et al. 2012). Des Weiteren wird in den letzten Jahren insbesondere für englische epidemiologische Studien auch auf die Daten von VetCompass zugegriffen (O'Neill, Church et al. 2014, McGreevy, Thomson et al. 2017, O'Neill, Pegram et al. 2020). Hierbei handelt es sich um eine Kollaboration, die einen Zugriff auf klinische Daten aus einer Vielzahl von Praxen und Kliniken ermöglicht. Im Rahmen einer anderen Dissertation zum malignen Lymphom des Hundes wurde die Klinikpopulation der Tierklinik Hofheim mit einer Kontrollpopulation von über 100.000 krankensversicherten Hunden in Deutschland verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Klinikpopulation und der Population krankensversicherter Hunde in Deutschland bestanden und beide Populationen als Vergleichsgrößen als gleichwertig betrachtet werden können (Ernst, Kessler et al. 2016, Lautscham 2017). Die demographischen Erhebungen basierend auf der Klinikpopulation der Tierklinik Hofheim eignen sich daher, um eine Aussage über den Reproduktionsstatus deutscher Hunde zu treffen.

Den Aufzeichnungen wurden neben den demographischen Daten auch klinische Informationen zu den Mammatumoren (Tumorlokalisierung, -Anzahl und -Durchmesser) entnommen. Der Durchmesser des Tumors wurde standardmäßig mit einer Schieblehre vermessen und der größte Durchmesser ist, wie im ‚Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG)‘ Consensus Dokument zur Bewertung des Tumorsprechens (Nguyen, Thamm et al. 2015) empfohlen, in die Auswertung eingeflossen. Diverse Studien in den letzten Jahren zeigen jedoch teilweise eine signifikante Inter- und Intra-Observer Varianz beim Messen von Tumoren (Euhus, Hudd et al. 1986, Jensen, Jorgensen et al. 2008, Ranganathan, Milovancev et al. 2018, Murkin, Amos et al. 2022). Eine ältere Publikation, in der Tumoren an Nacktmäusen

vermessen wurden, zeigte insbesondere bei kleinen Tumoren eine deutliche Divergenz der Messergebnisse bei wiederholten Messungen durch einen Untersucher (Euhus, Hudd et al. 1986). Auch eine aktuelle veterinärmedizinische Studie, die das Vermessen von 12 kaninen Unterhauttumoren (Mastzelltumore und Weichteilsarkome) untersuchte, schlägt zwar eine gute Interrater-Reliabilität, aber eine niedrige Interrater-Übereinstimmung vor (Ranganathan, Milovancev et al. 2018), was ggf. auch lokalisations- und tumorbedingt sein könnte, da insbesondere Mastzelltumoren teilweise schlechter abgegrenzt sein können (de Nardi, Dos Santos Horta et al. 2022). Ranganathan, Milovancev et al. (2018) diskutieren, ob ggf. eine bessere Übereinstimmung zwischen zwei Messenden in Abhängigkeit vom Ausbildungsgrad erreicht werden kann. Eine weitere Studie, die das Vermessen von Lymphknoten bei 20 Lymphom-erkrankten Hunde untersuchte, zeigte ähnliche Ergebnisse (Childress, Fulkerson et al. 2016). Die Mammatumoren wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich von Tierärzt*innen mit einer Spezialisierung in Onkologie untersucht und vermessen. Schlecht umschriebene Massen ohne konkrete Messangaben wurden nicht in die Studie aufgenommen. Trotzdem stellt die in der Literatur beschriebene Varianz beim Vermessen von Tumoren die größte Limitierung dar. Eine prospektive Studie, welche die Übereinstimmung beim Vermessen von Mammatumoren näher untersucht, wäre wünschenswert.

Trotz der genannten Limitierungen wurde sich für ein retrospektives Auswertungsverfahren entschieden, um ein Zurückgreifen auf die Daten möglichst vieler Hündinnen und Mammatumoren zu ermöglichen. In der dieser Arbeit vorangegangenen Studie zum histologischen Kontinuum wurden nur 90 intakte Hündinnen mit insgesamt 236 Mammatumoren eingeschlossen (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009), was in etwa einem Siebtel des Patientenguts der vorliegenden Arbeit von 625 Hündinnen ausmacht. Daten zur kastrierten Hündin fehlen in der zitierten Studie. Klinische Erhebungen zu Mammatumoren in der Veterinärmedizin umfassen meist deutlich weniger Patienten, so wurden in zwei Studien, die sich mit prognostischen Faktoren des Gradings und der subtypenspezifischen histologischen Einteilung beschäftigen bspw. 65 und 229 Hündinnen eingeschlossen (Peña, De Andres et al. 2013, Rasotto, Berlato et al. 2017). Eine Ausnahme stellen insbesondere epidemiologische Studien, die auf die Daten pathohistologischer Institute zurückgreifen, dar (Gottwald 1998, Vascellari, Capello et al. 2016, Ariyaratna,

Aberdein et al. 2022). In den drei genannten Arbeiten wurden bspw. 673, 2.359 und 21.566 Hunde eingeschlossen. In einer weiteren aktuellen Studie aus China, welche eine ähnliche Populationsgröße wie die vorliegende Arbeit untersucht, werden die demographischen und klinischen Daten von 504 Mammatumor-tragenden Hunden ausgewertet (Zheng, Du et al. 2022). Einschränkend muss erwähnt werden, dass es sich dabei um eine multi-institutionelle Arbeit diverser Tierkliniken handelt.

Hervorzuheben ist, dass die vorliegende Arbeit nur Hündinnen, und dabei sowohl intakte, als auch kastrierte, welche in einer einzigen Tierklinik untersucht und behandelt wurden, inkludiert. Die demographischen Daten wurden mit einer Kontrollpopulation von über 19.000 Tieren verglichen, welche ebenfalls in derselben Tierklinik über denselben Zeitraum vorgestellt wurden. In einer deutschen Studie zur Häufigkeit von Mammatumoren beim Hund wurde eine deutlich größere Kontrollpopulation von 114.000 Tieren genutzt (Gottwald 1998), wobei hier anzumerken ist, dass die Daten auf dem Einsendegut eines pathohistologischen Instituts beruhen und damit ein Selektionsbias insbesondere für ältere Tiere und häufiger an Tumoren erkrankten Rassen in Betracht zu ziehen ist.

Auch die retrospektive Auswertung der histopathologischen Berichte der eingeschlossenen 1.459 Mammatumoren bringt gewisse Limitierungen mit sich. So wurden die histopathologische Untersuchung zwar in einem einzigen, auf Mammatumoren spezialisierten Institut für Tierpathologie (von Bomhard, München, Deutschland) untersucht, die Beurteilung erfolgte jedoch durch unterschiedliche Fachtierärzt*innen für Pathologie oder einen Diplomate des European College of Veterinary Pathologists (ECVP). Nachdem es sich um eine retrospektive Arbeit handelt, bei der das Patientengut von über 10 Jahren zur Auswertung kam, war eine neuerliche Auswertung aller 1.459 Mammatumoren durch einen einzigen Pathologen nicht möglich, auch wenn dies wünschenswert gewesen wäre.

Es ist wenig über die Interobserver-Reproduzierbarkeit bei der Bewertung von kaninen Mammatumoren bekannt (Chu, Liao et al. 2011, Santos, Correia-Gomes et al. 2015, Papparella, Crescio et al. 2022). In einer aktuellen multi-institutionellen Ring-Studie von 15 Patholog*innen wurde eine moderate bis substantielle Übereinstimmung bei der Mammatumor-Klassifizierung gezeigt (Papparella, Crescio et al. 2022). Als Grundlage für die histologische Bestimmung diente hier die neue histopathologische

Klassifikation für Mammatumoren, die 2019 von der Davis-Thompson DVM Foundation publiziert wurde (Zapulli, Peña et al. 2019).

Die histologische Diagnose der eingeschlossenen Mammatumoren basiert, je nach Zeitpunkt der Patientenvorstellung, auf den publizierten histopathologischen Klassifikationssystemen von Misdorp (1999) und Goldschmidt, Peña et al. (2011). Bei dem erstgenannten offiziellen Klassifikationssystem der WHO werden sechs verschiedene benigne und 14 maligne Subtypen unterschieden (Misdorp 1999). Dem System wird teilweise ein prognostischer Wert zugesprochen, wobei dies nicht in allen Publikationen bestätigt werden konnte (Karayannopoulou, Kaldrymidou et al. 2005, Santos, Lopes et al. 2013, Santos, Correia-Gomes et al. 2015, Canadas, Franca et al. 2019). Abgelöst wurde die WHO-Klassifikation von der Klassifikation nach Goldschmidt, welche 7 benigne und 23 maligne Tumorsubtypen unterscheidet (Goldschmidt, Peña et al. 2011). Eine prospektive Studie identifizierte die Subtypeneinteilung nach Goldschmidt in der Multivariananalyse als unabhängigen prognostischen Faktor (Rasotto, Berlato et al. 2017). Dass die histopathologischen Befunde der vorliegenden Studie auf zwei verschiedenen Klassifikationssystemen basieren, mag auf den ersten Blick problematisch sein, eine aktuelle Studie (2019) hat die beiden Klassifikationssysteme jedoch verglichen und konnte keine signifikanten Unterschiede in der Einteilung der Dignität (benigne oder maligne) identifizieren. Die Bestimmung der benignen Subtypen stimmte bis auf zwei benigne Mammatumoren überein. Bei den malignen Subtypen war das Klassifikationsschema nach Goldschmidt hingegen weitaus genauer und teilte beispielsweise die ehemaligen tubulopapillären einfachen Karzinome in 8 Subtypen ein (Canadas, Franca et al. 2019). Im Rahmen der vorliegenden Studien wurden die benignen Mammatumoren für die weitere Auswertung in einer Gruppe zusammengefasst. Die malignen Subtypen wurden in die folgenden 4 Malignitätsgruppen mit aufsteigender Malignität unterteilt (Schmidt and Kessler 2013), was die entstandenen Unterschiede durch die genauere subtypenspezifischere Einteilung nach Goldschmidt weitestgehend eliminiert:

- I. Komplexes Karzinom (und in-situ Karzinom)
- II. Einfaches Karzinom (mit eingeschlossen sind hier tubulopapilläre, papilläre, zystische, duktale und muzinöse Typen)
- III. Solides Karzinom
- IV. Anaplastisches, inflammatorisches und invasives Karzinom (inkl. Fälle mit Lymphangiosis carcinomatosa)

Die Einteilung basiert auf den Erkenntnissen diverser Studien, die eine Zunahme an Aggressivität bei verschiedenen Subtypen nachweisen konnte. So konnte gezeigt werden, dass sich komplexe Karzinome, welche aus sekretorischem Epithel und Myoepithel bestehen, weniger maligne verhalten als einfache Karzinome, bei denen keine myoepitheliale Komponente mehr vorliegt (Misdorp and Hart 1976). Solide Karzinome, bei denen histologisch keine luminalen oder drüsenähnliche Strukturen mehr vorliegen, gelten hingegen als aggressiver als die beiden vorgenannten Gruppen. Besonders aggressiv verhalten sich anaplastische und inflammatorische Karzinome (Philibert, Snyder et al. 2003, Marconato, Romanelli et al. 2009, Rasotto, Berlato et al. 2017).

Neben einer histopathologischen Einteilung nach Tumorsubtyp spielt auch der Tumorgad eine unabhängige prognostische Rolle (Misdorp and Hart 1976, Hellmen, Bergstrom et al. 1993, Karayannopoulou, Kaldrymidou et al. 2005, Peña, De Andres et al. 2013, Santos, Correia-Gomes et al. 2015). Zur Gradeinteilung wird das Ausmaß an Tubuli-Formation, Kernpleomorphie und der mitotische Index herangezogen. Diverse Gradierungsschemata wurden in der Tiermedizin bereits etabliert (Karayannopoulou, Kaldrymidou et al. 2005, Goldschmidt, Peña et al. 2011, Santos, Correia-Gomes et al. 2015, Santos, Correia-Gomes et al. 2015). Auch das aktuell meist genutzte Schema nach Peña (Clemente, Perez-Alenza et al. 2010, Peña, De Andres et al. 2013) stellt eine Adaptation des ‚Elston und Ellis Grading Systems‘ für Brustkrebs des Menschen dar (Elston and Ellis 1991). In der vorliegenden Arbeit wurde keine Gradeinteilung nach Peña vorgenommen, da das Gradierungsschema erst 2010 publiziert und damit während des Erfassungszeitraums dieser Studie Verbreitung fand. Eine Überbefundung mit dem Ziel einer nachträglichen Gradeinteilung nach Peña war, wie bereits erläutert, nicht möglich. Für zukünftige (prospektive) Studien wäre eine Gradeinteilung nach Peña aber wünschenswert, um die erhobenen Ergebnisse zu verifizieren.

Die angewandte Methodik erlaubte die Erhebung einer großen Datenmenge zum kaninen Mammatumor in Deutschland. Durch den Vergleich mit einer großen Kontrollpopulation aus derselben Klinik konnten relevante Ergebnisse zu möglichen Prädispositionen erlangt werden. Eine Überbefundung der histopathologischen Befunde inkl. Gradeinteilung hätte den vorliegenden Ergebnissen möglicherweise noch mehr Gewicht gegeben, war jedoch aufgrund der großen Zeitspanne der Studie

und kürzerer Aufbewahrungszeiten der Präparate und auch ökonomisch nicht zu erreichen. Hervorzuheben ist allerdings, dass alle Tumoren vom selben pathologischen Institut, welches kanine Mammatumoren als Spezialgebiet angibt, untersucht wurden. Für zukünftige Studien wäre insbesondere die Auswertung einer standardisierten Gradeinteilung wie auch eine Untersuchung der damit verbundenen Prognose wünschenswert. Trotz der genannten Limitierungen stellen die erhobenen Daten einen großen und wertvollen Beitrag in der epidemiologischen und klinischen Forschung zum kaninen Mammatumor dar.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Mammatumoren stellen einen häufigen Befund bei der Untersuchung der Hündin mittleren Alters dar (Brodey, Fidler et al. 1966, Dorn, Taylor et al. 1968, MacVean, Monlux et al. 1978, Gottwald 1998, Jitpean, Hagman et al. 2012, Vascellari, Capello et al. 2016). Hunderte Publikationen haben sich bisher mit kaninen Mammatumoren beschäftigt. Ergebnisse aus Deutschland wurden dominierend, aber nicht ausschließlich im Rahmen von Dissertationen veröffentlicht (Gottwald 1998, Schoenrock 2006, Stratmann, Failing et al. 2006, Stratmann, Failing et al. 2008, Bornbaum 2012, Lamp 2012, Hennecke 2015).

Im Rahmen der vorliegenden kumulativen Arbeit wurden zwei sich ergänzende Publikationen angefertigt. Die erste Publikation greift die Idee des histologischen Kontinuums (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009) auf und arbeitet die Frage nach einer weiteren malignen Transformation mit Zunahme der Tumorgöße auf. Die zweite Publikation untersucht den Einfluss des Reproduktionsstatus auf die Dignität des Mammatumors und das histologische Kontinuum.

4.3.1 Demographische Faktoren

Mit einem durchschnittlichen Alter von 9,7 Jahren (\pm 2,5 Jahren) und einem durchschnittlichen Körpergewicht von 20,0kg (1,4 - 67,5kg) waren die Ergebnisse in unserer Studie ähnlich zu vorherigen Untersuchungen (Dorn, Taylor et al. 1968, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Vascellari, Capello et al. 2016, Banchi, Morello et al.

2022). Eine Überrepräsentation kleiner bzw. leichter Hündinnen, wie sie in diversen Studien beschrieben wurde (Salas, Marquez et al. 2015, Gruntzig, Graf et al. 2016, Komazawa, Sakai et al. 2016, Burrai, Gabrieli et al. 2020), konnte nicht beobachtet werden. Hündinnen mit weniger als 10kg Körpergewicht machten 28% der Mammatumorphpopulation aus, wohingegen 30% der Mammatumoren bei mittelgroßen (10 - 25kg schweren) bzw. 42% bei Hündinnen \geq 25kg Körpergewicht diagnostiziert wurden.

Auch in der vorliegenden Studie waren dominierend reinrassige Hündinnen betroffen, wie in der Literatur beschrieben (Itoh, Uchida et al. 2005, Salas, Marquez et al. 2015, Vascellari, Capello et al. 2016, Burrai, Gabrieli et al. 2020, Zheng, Du et al. 2022). Die am häufigsten vertretenen Rassen waren Dackel (5,6%) und Golden-Retriever (4,8%). In einer älteren deutschen Publikation, welche über 21.000 Hündinnen mit Mammatumoren mit einer Vergleichspopulation von 114.000 Tieren verglichen hat, wurde eine Prädisposition für Dackel postuliert, wohingegen dies für Retriever nicht nachzuweisen war (Gottwald 1998). MacVean, Monlux et al. (1978) beschreiben ebenfalls eine marginale Überrepräsentation des Dackels, wohingegen dies in anderen Studien nicht bestätigt werden kann (Priester 1979, Egenvall, Bonnett et al. 2005, Vascellari, Capello et al. 2016). Für den Golden Retriever wurde in zwei Publikationen ein geringeres Risiko einen (malignen) Mammatumor zu entwickeln, angegeben (Egenvall, Bonnett et al. 2005, Vascellari, Capello et al. 2016). Es ist in Betracht zu ziehen, dass es sich in der vorliegenden Studie insbesondere beim Golden Retriever, aber auch möglicherweise beim Dackel, eher um allgemein populäre Hunderassen und weniger um eine echte Rasseprädisposition handeln könnte. In einer retrospektiven Studie von 2016, welche die Klinikpopulation der Tierklinik Hofheim mit den krankenversicherten Tieren in Deutschland vergleicht, wurde der Golden Retriever ebenfalls mit einem Anteil von 4,9% (Klinikpopulation) und 6,7% (versicherte Hunde) angegeben (Ernst, Kessler et al. 2016). Andere in der Literatur beschriebene prädisponierte Rassen sind bspw. Terrier, Setter, Deutsche Schäferhunde, Spaniel-Rassen und Pudel (MacVean, Monlux et al. 1978, Priester 1979, Kurzman and Gilbertson 1986, Sorenmo, Shofer et al. 2000, Moe 2001, Egenvall, Bonnett et al. 2005, Dias, Andrade et al. 2016, Rodriguez, Santana et al. 2022, Zheng, Du et al. 2022). In Anbetracht landes- bzw. regionsspezifischer Rasse- und Hundegrößen-Vorlieben sind diese Angaben kritisch zu hinterfragen.

Endogene Sexualhormone wie Östrogen gelten als Risikofaktoren für die Mammatumorentwicklung (Perez Alenza, Peña et al. 2000), weswegen intakte Hündinnen in den Publikationen klassischerweise überrepräsentiert sind (Dorn, Taylor et al. 1968, MacVean, Monlux et al. 1978, Sonnenschein, Glickman et al. 1991, Gottwald 1998, Moe 2001, Gruntzig, Graf et al. 2016, Hart 2016, Vascellari, Capello et al. 2016, Zheng, Du et al. 2022). Im Vergleich zur Kontrollpopulation ≥ 4 Jahren waren auch in der vorliegenden Population signifikant mehr intakte Hündinnen betroffen. Für die intakte Hündin war das Risiko einen Mammatumor zu entwickeln 6,5 Mal höher als bei kastrierten Hündinnen (OR: 6,6036; 95% CI: 5,406–8,0596, $p < 0,0001$). Nachdem bei den Hündinnen unter einem Jahr und mit zwei Jahren nur ein Bruchteil (10,6% bzw. 20,2%) kastriert war, ist davon auszugehen, dass in Deutschland üblicherweise keine juvenile Kastration erfolgt (Olson, Kustritz et al. 2001, Trevejo, Yang et al. 2011). Dies deutet sich auch in einer aktuellen Arbeit, welche das Verhalten kastrierter und intakter Hunde in Deutschland verglichen hat, an (Brinkmann 2015). In dieser Population waren nur 11% der Hündinnen mit weniger als 6 Monaten und vor der 1. Läufigkeit kastriert worden, wohingegen dies bei 39% nach der 1. Läufigkeit (zwischen 6 – 15 Monaten) und bei den restlichen Hündinnen erst mit über 15 Monaten erfolgt war. Eine aktuelle französische Studie, welche das Risiko reproduktiver Erkrankungen (inkl. Mammatumoren) in einer Population von fast 600 Hündinnen in Abhängigkeit vom Reproduktionsstatus untersuchte (Beaudu-Lange, Larrat et al. 2021), konnte ebenfalls nachweisen, dass zwar fast 50% der Gesamtpopulation kastriert war, der Eingriff aber bei weniger als 10% der Hündinnen vor dem 2. Lebensjahr vorgenommen worden waren. Hier konnte zudem gezeigt werden, dass, auf die Gesamtpopulation gerechnet, Mammatumoren nur bei 1% der vor dem 2. Lebensjahr kastrierten, bei 5,3% der nach dem 2. Lebensjahr kastrierten, aber bei 47,4% der intakten Hündinnen diagnostiziert wurden. Dies bestätigt die Hypothese dieser Arbeit, dass auch eine im Erwachsenenalter erfolgte hormonelle Ablation einen protektiven Effekt bzgl. des Mammatumor-Risikos hat. Dies steht insbesondere im Kontrast zu der Studie von Schneider, Dorn et al. (1969), welche das Fundament für die Empfehlung zur juvenilen Kastration legte. Dieser Studie zufolge sollte eine Kastration nach der zweiten Läufigkeit im Vergleich zu intakten Hündinnen das relative Risiko für einen Mammatumor nicht mehr beeinflussen. Die Autoren gaben jedoch an, dass zumindest eine Kastration vor dem 2,5. Lebensjahr im Vergleich zu einer späteren Kastration noch mit einem gewissen protektiven Effekt verbunden war (Schneider, Dorn et al.

1969). Es ist hervorzuheben, dass eine Betrachtung des Kastrationszeitpunktes in Abhängigkeit von Lebensalter oder Läufigkeit und insbesondere ein Vergleich von Studien, die unterschiedliche Methoden genutzt haben, eine Herausforderung darstellt. Der Zeitpunkt der 1. Läufigkeit ist nicht nur abhängig von der körperlichen Entwicklung, sondern unterliegt rasseabhängigen und individuellen Schwankungen. So ist davon auszugehen, dass bspw. bei Hündinnen kleiner und mittelgroßer Rassen diese deutlich früher eintritt als bei Hündinnen großer Rassen (Günzel-Apel 2016). Des Weiteren ist zu bedenken, dass das Inter-Östrus-Intervall zwischen 5 - 12 Monaten liegen kann (Concannon 2011). Die Anzahl der Läufigkeiten, die damit bspw. bis zum 2. Lebensjahr durchlaufen worden sind, können somit sehr unterschiedlich sein.

4.3.2 Charakteristika der Mammatumoren

Malignitätskriterien, die zur histologischen Klassifizierung der Mammatumoren herangezogen werden, sind unter anderem der Tumortyp, nukleäre und zelluläre Atypien, der mitotische Index, peritumorale und lymphatische Invasion sowie eine regionale Lymphknotenmetastasierung (Misdorp 1999, Goldschmidt, Peña et al. 2011). Je nach Population und Studie werden bis zu 60% der Mammatumoren als maligne eingestuft (Benjamin, Lee et al. 1999, Stratmann, Failing et al. 2006, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Vascellari, Capello et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit waren fast 40% der Tumoren maligne. In der subgruppenspezifischen Analyse konnten fast 60% der malignen Tumoren einem weniger aggressiven Subtyp, also der Gruppe der komplexen (25,7%) oder einfachen Karzinomen (34%) zugeteilt werden. Dies deckt sich mit anderen Studien, die zeigten, dass komplexe und einfache Karzinome am häufigsten beim Hund vertreten sind, wohingegen solide und anaplastische Karzinome deutlich seltener vorkommen (Gottwald 1998, Misdorp 1999, Baioni, Scanziani et al. 2017, Rasotto, Berlato et al. 2017, Ariyathna, Aberdein et al. 2022).

In der vorliegenden Arbeit konnten bei mehr als der Hälfte der Hündinnen zeitgleich multiple Tumoren festgestellt werden. Dies liegt eher im oberen Bereich dessen, was in der Literatur beschrieben wird, wo je nach Studie bei 12 - 70% der Hündinnen

multiple Mammatumoren diagnostiziert wurden (Fowler, Wilson et al. 1974, Moulton, Rosenblatt et al. 1986, Benjamin, Lee et al. 1999, Stratmann, Failing et al. 2006, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Gunnes, Borge et al. 2015, Dias, Andrade et al. 2016, Ariyaratna, Aberdein et al. 2022, Banchi, Morello et al. 2022, Zheng, Du et al. 2022). Fast 90% der Hündinnen mit multiplen Knoten hatten in unserer Studie zwei bis fünf Mammatumoren, wohingegen weniger als 1% aller Hündinnen zehn oder mehr Tumoren aufwiesen. Die Mechanismen, die zu multiplen Knoten in der Mammaleiste führen, sind bisher nicht abschließend geklärt. Eine Metastasierung wurde diskutiert (Stratmann, Failing et al. 2006), nachdem aber auch zeitgleich benigne Tumoren auftreten, ist der Einfluss anderer genetischer, immunologischer und karzinogener Effekte wahrscheinlicher (Troester, Lee et al. 2009, Sorenmo, Rasotto et al. 2011, Gadaleta, Thorn et al. 2022, Schmidt and Gedon 2022). Die vorliegenden Daten legen einen hormonellen Einfluss nahe, da nur 40% der kastrierten Hündinnen an multiplen Mammatumoren litten, diese aber bei fast 60% der Intakten vorzufinden waren ($p = 0,0006$; OR: 1,9972; 95% CI: 1,3374–2,9825). Mehr als sieben zeitgleiche Tumoren waren nur bei intakten Hündinnen vorzufinden. Auch Banchi, Morello et al. (2022) und Gunnes, Borge et al. (2015) konnten zeigen, dass intakte Hündinnen für multiple Tumoren prädisponiert sind. Zudem waren in einer italienischen Studie multiple Mammatumoren vor allem bei älteren Hündinnen anzutreffen ($p = 0,004$) (Banchi, Morello et al. 2022).

Die Durchmesser von Mammatumoren können stark variieren. Je nach Studie werden Tumordurchmesser von 0,1 - 30cm beschrieben (Stratmann, Failing et al. 2008, Peña, De Andres et al. 2013, Rasotto, Berlato et al. 2017, Burrai, Gabrieli et al. 2020, Zheng, Du et al. 2022), was sich mit den eigenen Ergebnissen (Tumordurchmesser von 0,1 - 20cm) deckt. Die Tumoren in der untersuchten Population konnten dominierend (87%) als Kategorie T1 (< 3cm) nach dem TNM-Staging-System der WHO (Owens 1980, Rutteman, Withrow et al. 2001) klassifiziert werden. Sieben Prozent der Tumoren gehörten in Kategorie T2 (3 - 5cm) und 6% in Kategorie T3 (> 5cm). Dies entspricht den Ergebnissen anderer Studien, in denen ebenfalls meist Tumoren < 5cm diagnostiziert wurden (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Peña, De Andres et al. 2013, Dias, Andrade et al. 2016, Burrai, Gabrieli et al. 2020, Zheng, Du et al. 2022), wobei anzumerken ist, dass in einer brasilianischen Studie fast 30% der Hündinnen Tumoren von > 5cm Größe aufwiesen (Dias, Andrade et al. 2016).

Interessant ist, dass in der eigenen Studie fast ein Drittel (31%) der Tumoren unter 1cm Durchmesser maligne waren. Ähnliche Ergebnisse mit fast 18 - 41% kleiner maligner Tumoren (< 1cm) konnten auch in anderen Studien erhoben werden (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Peña, De Andres et al. 2013, Burrai, Gabrieli et al. 2020). Es könnte daher sinnvoll sein, in Zukunft das TNM-Staging System der WHO (Owens 1980, Rutteman, Withrow et al. 2001) hinsichtlich der Kategorien der Tumorgößen anzupassen. Eine Möglichkeit wäre eine Unterteilung des Stadiums I (< 3cm) in die Substadien Ia mit einer Tumordurchmesser < 1cm und Ib mit einem Tumordurchmesser von 1 - 3cm (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Peña, De Andres et al. 2013, Schmidt and Gedon 2022).

4.3.3 Einflüsse auf die Dignität des Tumors

Einer Vielzahl an epidemiologischen Faktoren wird eine prognostische Aussagekraft hinsichtlich der Dignität des Mammatumors und damit verbunden der Prognose zugeschrieben. Wie bereits in anderen Publikationen beobachtet (Hellmen, Bergstrom et al. 1993, Stovring, Moe et al. 1997, Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Gunnes, Borge et al. 2015, Vascellari, Capello et al. 2016, Burrai, Gabrieli et al. 2020, Banchi, Morello et al. 2022, Rodriguez, Santana et al. 2022, Zheng, Du et al. 2022), wurde auch in der untersuchten Population das Alter als ein negativ prognostischer Faktor identifiziert. So steigt das Risiko für einen malignen Mammatumor mit jedem weiteren Lebensjahr um das 1,2-fache an, was fast identisch zu den Ergebnissen einer brasilianischen Studie ist (Dias, Andrade et al. 2016). Dies wiederum steht in Einklang zur Hypothese der histologischen Progression von benigne zu maligne mit fortschreitender Zeit (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009).

Eine mögliche Korrelation zwischen Gewicht und Dignität des Tumors bzw. der Prognose, wie es beispielsweise für kleinwüchsige Rassen und benigne Tumoren beschrieben wurde (Itoh, Uchida et al. 2005, Peña, De Andres et al. 2013, Komazawa, Sakai et al. 2016), konnte in unserer Auswertung nicht verifiziert werden. Ursächlich mag hier die Tatsache sein, dass bspw. in der Arbeit von Itoh, Uchida et al. (2005) nur Hunde mit einem durchschnittlichen Gewicht von $3,8 \pm 2,0\text{kg}$ als Zwergrassen

klassifiziert wurden, wohingegen in der vorliegenden Arbeit alle Hunde < 10kg der Gruppe der „kleinen Hunde“ zugeordnet wurden. Außerdem wurde auch in einer aktuellen chinesischen Studie beschrieben, dass gutartige Tumoren hauptsächlich bei kleinen Hunden diagnostiziert wurden, statistisch konnte aber kein signifikanter Zusammenhang zwischen Körpergröße und Tumordignität gefunden werden (Zheng, Du et al. 2022).

Der Reproduktionsstatus stellt in der vorliegenden Studie einen weiteren prognostischen Faktor dar. So hatten zwar generell intakte Hündinnen signifikant häufiger Mammatumoren, aber kastrierte Hündinnen waren deutlich häufiger von malignen Tumoren betroffen. Bei den intakten Hündinnen war nur etwa ein Drittel der Tumoren maligne, wohingegen dies bei Kastrierten in mehr als der Hälfte der Fälle vorkam. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer intakten Hündin ein gutartiger Tumor diagnostiziert wird, war somit doppelt so hoch, wie für kastrierte Hündinnen (OR: 1,9884; 95% CI: 1,4892–2,6550; $p < 0,0001$). Interessant ist auch, dass bei kastrierten Hündinnen signifikant häufiger Tumoren fortgeschrittener Malignität nachgewiesen wurden ($p < 0,0001$). Hieraus ist zu folgern, dass durch die hormonelle Ablation zwar das allgemeine Risiko für einen Mammatumor gesenkt werden kann, Kastrierten aber mehr aggressive Tumoren und damit ggf. eine schlechtere Prognose als intakte Hündinnen aufweisen. Eine Prävalenz für maligne Tumorsubtypen bei Kastrierten konnten auch andere Studien aufzeigen (Marconato, Romanelli et al. 2009, Peña, De Andres et al. 2013, Burrai, Gabrieli et al. 2020). Eine spanische Arbeitsgruppe konnte in einer Multivarianzanalyse zeigen, dass kastrierte Hündinnen ein 4,5-fach erhöhtes Risiko für ein Tumorrezidiv oder Metastasen und damit eine schlechtere Überlebenszeit hatten (Peña, De Andres et al. 2013).

Interessanterweise konnte in einer aktuellen italienischen Studie auch ein signifikanter Unterschied in der krankheitsfreien Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Kastrationsstatus nachgewiesen werden ($p = 0,0007$). Hündinnen, die zum Zeitpunkt der Mastektomie bereits kastriert waren oder intakt blieben, überlebten weniger lange als Hündinnen, die zeitgleich zur Mammatumorentfernung kastriert wurden (Banchi, Morello et al. 2022). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Sorenmo, Worley et al. (2000), die ebenfalls unterschiedliche Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom Reproduktionsstatus und Kastrationszeitpunkt vorschlugen.

Östrogen und Progesteron sind, genauso wie ihre Rezeptoren, essentiell an der physiologischen Entwicklung des Mammaparenchyms beteiligt und spielen auch in der Mammatumor-Promotion eine große Rolle (Feigelson and Henderson 1996, Platet, Cathiard et al. 2004, Hilton, Clarke et al. 2018, de Andres, Caceres et al. 2022). Unklar bleiben jedoch die genauen molekularen Mechanismen auf das Mammaparenchym und der damit verbundene hormonelle Einfluss des Östrogens auf die Karzinogenese (Sorenmo, Durham et al. 2019, Torres, Iturriaga et al. 2021). Studien haben gezeigt, dass Östrogen sowohl zu einer gesteigerten Zellteilung führen als auch Einfluss auf Reparaturmechanismen der Zellen nehmen und damit die Brustkrebsentwicklung beschleunigen kann (Hankinson, Colditz et al. 2004, Russo and Russo 2006). Des Weiteren wird diskutiert, ob Östrogen direkt erbgutschädigend wirkt und so zur Karzinogenese beiträgt (Liehr 2000). Die karzinogene Wirkung wird hier sowohl über hormonrezeptorabhängige als auch -unabhängige Mechanismen vermittelt (Yue, Yager et al. 2013). Heutzutage weiß man aber auch, dass Östrogen, neben diesen negativen Aspekten auch viele positive Auswirkungen hat und bspw. einen wertvollen Beitrag in der kardiovaskulären Gesundheit, im Wachstum und für das Immunsystem leistet (Simpson, Clyne et al. 2002, Simm, Bajpai et al. 2008, Patel, Homaei et al. 2018, Trenti, Tedesco et al. 2018). Daher geht man auch in der Veterinärmedizin davon aus, dass Östrogen nicht nur eine pro-karzinogene Wirkung auf die Mammatumorentstehung ausübt, sondern bei einigen Patienten auch einen protektiven Effekt besitzt und nicht jedes Tier von einer Östrogen-Ablation profitiert (Sorenmo, Durham et al. 2019). Dies erklärt auch, warum kastrierte Hündinnen teilweise ein erhöhtes Risiko haben, andere Neoplasien zu entwickeln (Hoffman, Creevy et al. 2013, Torres de la Riva, Hart et al. 2013). Insgesamt scheint es notwendig die Vor- und Nachteile einer Kastration und den Kastrationszeitpunkt individuell abzuwägen (Arlt, Wehrend et al. 2017, Urfer and Kaeberlein 2019, Hart, Hart et al. 2020).

Eine Ursache für die Neigung zu malignen Tumoren bei der kastrierten Hündin mag in der reduzierten Expression von Hormonrezeptoren im Mammatumor der kastrierten Hündin liegen (Sorenmo, Shofer et al. 2000, Mainenti, Rasotto et al. 2014). Nicht nur konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass Karzinome weniger Hormonrezeptoren exprimieren als benigne Tumoren, sondern auch, dass ein weiterer Rückgang der Expression mit zunehmender Malignität und damit einem erhöhten

Risiko für eine Metastasierung assoziiert ist (Donnay, Raus et al. 1995, Nieto, Peña et al. 2000, Millanta, Calandrella et al. 2005, Mainenti, Rasotto et al. 2014). Hormonrezeptornegative Mammatumoren stellen auch in der Humanmedizin eine Gruppe besonders aggressiver Tumoren da, welche mit höherem Tumorgad, größerer Metastasierungs- und Rezidivrate und damit verbundener schlechterer Prognose einhergehen (Kumar and Aggarwal 2016, Baranova, Krasnoselskyi et al. 2022).

Interessanterweise konnte in der Vergangenheit auch eine Assoziation zwischen reduzierter Hormonrezeptor-Expression und Tumorgöße nachgewiesen werden (Donnay, Raus et al. 1995, Nieto, Peña et al. 2000, Ferreira, Bertagnolli et al. 2009, Mainenti, Rasotto et al. 2014), was als Hinweis zum Einfluss der Tumorgöße auf die Dignität des Mammatumors gedeutet werden kann. Wie bereits in der Publikation von Sorenmo, Kristiansen et al. (2009), konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass maligne Mammatumoren signifikant größer sind als benigne (1,94cm vs. 0,90cm; $p \leq 0,0001$). Die durchschnittlichen Tumorgößen dieser Untersuchung liegen damit etwas unter denen anderer aktueller Studien, die zum selben Ergebnis kamen. Hier war der durchschnittliche Tumordurchmesser für benigne Mammatumoren bei 1,3 - 3cm, wohingegen maligne Tumoren durchschnittlich einen Durchmesser von 2,1 - 4,7cm aufwiesen (Sorenmo, Kristiansen et al. 2009, Burrai, Gabrieli et al. 2020, Banchi, Morello et al. 2022, Zheng, Du et al. 2022). Ursächlich für die Größenunterschiede können die Zusammensetzung der untersuchten Hundepopulation und/oder die variable Aufmerksamkeit der Besitzer*innen sein. Aufgrund der Befunde ist eine maligne Progression mit einer Zunahme der Tumorgöße anzunehmen. Dies würde der Beobachtung Rechnung tragen, dass bei einer Zunahme des Tumordurchmessers von nur 1cm (von 1 auf 2cm und damit einer Vervielfachung des Volumens) fast eine Umkehr des Verhältnisses zwischen benignen und malignen Tumoren festzustellen ist. So waren Mammatumoren in der vorliegenden Studie mit weniger als einem Zentimeter Tumordurchmesser in über 2/3 der Fälle benigne, wohingegen ab 2cm Durchmesser 2/3 der Tumoren als maligne eingestuft werden konnten. Das Risiko für einen malignen Mammatumor steigt mit jedem Zentimeter Größenzunahme des Durchmessers fast um das 1,5-fache an (OR = 1,48; Logistische Regression: $p < 0,0001$). Bei einer Unterteilung in Patienten mit singulären und multiplen Mammatumoren konnte gezeigt werden, dass der Einfluss

des Tumordurchmessers auf die Dignität des Mammatumors bei Erstgenannten etwas größer ist als bei denen mit multiplen Tumoren (OR: 1,68 vs. 1,38).

Die allgemeine Tumorforschung hat gezeigt, dass prä maligne Veränderungen bis zu einem Durchmesser von maximal 0,4cm zu beobachten sind, und mit Größenzunahme dann erste maligne Zellen auftreten. Zwischen 1 - 2cm Tumordurchmesser haben sich schließlich ausreichend Mutationen akkumuliert, die auch zu histologisch erkennbarer maligner Entartung führen (Den Otter, Koten et al. 1990). Diese Beobachtung stimmt weitgehend mit den hier vorgestellten klinischen Daten überein.

Durch die Aufteilung der malignen Tumoren in verschiedene Subgruppen konnte der Einfluss der Tumorgöße auf die weitere maligne Progression hin untersucht werden. So wurde in der vorliegenden Arbeit eine signifikante positive Korrelation zwischen Tumordurchmesser und zunehmender Aggressivität beobachtet ($p \leq 0,0001$; $r_s = 0,195$). Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen steigendem Tumordurchmesser, zunehmender Aggressivität und dem Reproduktionsstatus nachgewiesen werden. Hervorzuheben sind hier die Befunde bei kleinen Tumoren ($< 1\text{cm}$), die bei der kastrierten Hündin im Vergleich zu der intakten Hündin fast doppelt so oft maligne Befunde ergab (OR: 1,8576; 95% CI: 1,2491–2,7625; $p = 0,0022$). Eine Hypothese ist, dass Besitzer*innen kastrierter Hündinnen neu-auf tretende Knoten in der Mammaleiste aufgrund der ausbleibenden regelmäßigen läufigkeitsinduzierten Veränderungen des Mammaparenchyms früher bemerken. Allerdings ist diese Vorstellung nach unseren Daten weniger wahrscheinlich, da 20% der Tumoren bei der kastrierten Hündin $> 3\text{cm}$ Durchmesser aufwiesen verglichen mit lediglich 12% der Tumoren bei der intakten Hündin. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass bei kastrierten Hündinnen die maligne Progression bereits bei kleineren Tumoren vonstatten geht, was in gleichem Maße auch für Hündinnen mit multiplen Mammatumoren gelten könnte.

5. Zusammenfassung

Mammatumoren stellen die häufigste Neoplasie der unkastrierten Hündin dar. Alter, Reproduktionsstatus, Rasse, Ernährung und Umgebung stellen mögliche Risikofaktoren dar.

Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass es sich bei Mammatumoren um statische Entitäten handelt, die von Beginn an entweder gut- oder bösartig sind und bleiben. In der Humanmedizin ist jedoch schon lange eine mehrstufige Karzinogenese von hyperplastischen zu neoplastischen Stadien akzeptiert. Ein „*histologisches Kontinuum*“, welches eine Progression von benigne zu maligne im makroskopischen Tumor beschreibt, wurde 2009 auch in der Veterinärmedizin etabliert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten anhand einer Population von 625 Hündinnen mit insgesamt 1.459 Mammatumoren insbesondere zwei Aspekte näher beleuchtet werden:

- Kann bei malignen Mammatumoren ein Voranschreiten des histologischen Kontinuums, also eine Zunahme der Malignität in Abhängigkeit von der Tumorgroße festgestellt werden?
- Welchen Einfluss hat der Reproduktionsstatus auf die Dignität und die maligne Transformation kaniner Mammatumoren?

Die erste Publikation griff das Konzept des histologischen Kontinuums auf und untersuchte, inwieweit die Progression nicht nur von einem benignen zu einem malignen Mammatumor erfolgt, sondern auch eine weitere maligne Transformation stattfindet. Es konnte bestätigt werden, dass kleinere Tumoren signifikant häufiger benigne sind. Zudem zeigen unsere Daten, dass mit weiterer Größenzunahme eine weitere Entdifferenzierung bzw. Zunahme der Malignität stattfindet. Auch das Alter wurde als prognostischer Faktor bestätigt, was indirekt ebenfalls eine zeitabhängige maligne Transformation unterstützt.

In der zweiten Publikation wurde insbesondere der Einfluss des Reproduktionsstatus auf die Tumordignität und das histologische Kontinuum evaluiert.

Durch den Vergleich mit einer großen Kontrollpopulation von über 30.000 Tieren konnte zunächst gezeigt werden, dass in Deutschland eine juvenile Kastration, wie sie in den USA üblich ist, deutlich seltener vorgenommen wird. Nachdem Mammatumoren signifikant häufiger bei intakten Hündinnen diagnostiziert wurden, ist davon auszugehen, dass auch eine Kastration im Erwachsenenalter einen protektiven Effekt

auf die Mammatumorentstehung hat. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu intakten Hündinnen Kastraten deutlich häufiger maligne und vor allem auch aggressivere Subtypen ausbilden. Zudem scheint die maligne Transformation und Progression bei kastrierten Hündinnen bereits bei kleineren Tumorgößen aufzutreten. Daher ist davon auszugehen, dass Östrogen nicht nur eine prokarzinogene Rolle in der Mammatumor-Promotion und -Progression einnimmt, sondern auch teilweise einen protektiven Effekt ausübt und damit nicht jede Hündin vom Östrogen-Entzug profitiert.

Es scheint daher ratsam, insbesondere bei kastrierten Hündinnen, die Palpation der Mammaleiste im Rahmen einer Allgemeinuntersuchung gewissenhaft durchzuführen, da bereits sehr kleine Massen maligne sein können. Des Weiteren ist eine abwartende Haltung bei noch kleinen (und somit häufig noch benignen) Tumoren abzulehnen, da dies eine anfangs gute Prognose verschlechtern kann.

6. Summary

Mammary tumours are considered the most common neoplasia in intact female dogs. Possible risk factors include age, reproductive status, breed, nutrition and the environment. Mammary tumours have been considered static entities over decades, assuming, that they were either benign or malignant without any changes over time. However, in women a multistep carcinogenesis from a benign hyperplastic to a neoplastic lesion has been accepted. In 2009, a “histological continuum”, which describes a progression from benign to malignant within a macroscopic tumour was established in veterinary medicine. In the present study, two different aspects regarding the histological continuum in mammary tumours were evaluated in a population of 625 female dogs with overall 1,459 mammary tumours:

- Is there a relationship between increasing malignant phenotype and increasing tumour size, supporting the idea of a further histologic continuum?
- What impact has the neuter status on the diagnosis and especially the degree of malignancy in canine mammary tumours?

The goal of the first publication was to examine whether there is a relationship between increasing malignant phenotype and increasing mammary tumour size supporting a further histological progression. We were able to confirm that smaller mammary tumours are significantly more often benign. Additionally, our data suggests that there is not only a histologic continuum from benign to malignant but from lesser to higher degrees of malignancy with increasing tumour size. Age was also validated as a prognostic factor, indirectly supporting a time-dependent malignant transformation.

The objective of the second publication was to evaluate the effects of neuter status on the degree of malignancy of the tumour in relation to its size. The results from comparing our tumor population to a large control population of over 30,000 dogs, suggest a low rate of juvenile gonadectomy in Germany, compared to countries like the USA where this is common practice. Since mammary tumours are significantly more often diagnosed in intact female dogs, we can assume that even a gonadectomy later in life still has a protective effect regarding the development of mammary tumours. However, in spayed dogs, mammary nodules are more likely to be malignant and of a higher malignant subtype. Our data suggests that the malignant transformation and

progression occurs even at smaller tumour sizes in hormonally- deprived patients. It must be assumed that oestrogen does not only have a pro-carcinogenic role in mammary tumour promotion and progression, but that there may also be a protective effect leading to a lack of benefit in regards to a hormonal ablation in some female dogs.

Including a thorough palpation of the mammary chain in a routine clinical exam is especially in neutered females advisable, as small mammary masses can already be malignant. In addition, a general “wait-and-watch” attitude towards small and therefore often still benign mammary masses should be obsolete, as this can worsen an initially good outcome for the patient.

7. Literaturverzeichnis

Abdel-Rahman, O. (2018). "Validation of the 8th AJCC prognostic staging system for breast cancer in a population-based setting." Breast Cancer Res Treat **168**(1): 269-275.

Abdelmegeed, S. M. and S. Mohammed (2018). "Canine mammary tumors as a model for human disease." Oncol Lett **15**(6): 8195-8205.

Andrade Fábio HE, F. F. C., Bersano Paulo RO, Bissacot Denise Z and Rocha Noeme S (2010). "Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants." Diagnostic Pathology **5**(45).

Antuofermo, E., M. A. Miller, S. Pirino, J. Xie, S. Badve and S. I. Mohammed (2007). "Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs - a model of breast cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(11): 2247-2256.

Arendt, L. M., J. McCready, P. J. Keller, D. D. Baker, S. P. Naber, V. Seewaldt and C. Kuperwasser (2013). "Obesity promotes breast cancer by CCL2-mediated macrophage recruitment and angiogenesis." Cancer Res **73**(19): 6080-6093.

Ariyaratna, H., D. Aberdein, N. Thomson, I. Gibson and J. S. Munday (2022). "Canine mammary gland disease in New Zealand: a review of samples from 797 dogs." N Z Vet J **70**(2): 95-100.

Arlt, S., A. Wehrend and I. M. Reichler (2017). "Kastration der Hündin – neue und alte Erkenntnisse zu Vor- und Nachteilen." Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere **45**(4): 253-263.

Baioni, E., E. Scanziani, M. C. Vincenti, M. Leschiera, E. Bozzetta, M. Pezzolato, R. Desiato, S. Bertolini, C. Maurella and G. Ru (2017). "Estimating canine cancer incidence: findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy." BMC Vet Res **13**(1): 203.

Banchi, P., E. M. Morello, A. Bertero, A. Ricci and A. Rota (2022). "A retrospective study and survival analysis on bitches with mammary tumours spayed at the same time of mastectomy." Vet Comp Oncol **20**(1): 172-178.

Baranova, A., M. Krasnoselskiy, V. Starikov, S. Kartashov, I. Zhulkevych, V. Vlasenko, K. Oleshko, O. Bilodid, M. Sadchikova and Y. Vinnyk (2022). "Triple-negative breast cancer: current treatment strategies and factors of negative prognosis." J Med Life **15**(2): 153-161.

Bartlett, P. C., J. W. Van Buren, M. Neterer and C. Zhou (2010). "Disease surveillance and referral bias in the veterinary medical database." Prev Vet Med **94**(3-4): 264-271.

Bearss, J. J., F. Y. Schulman and D. Carter (2012). "Histologic, immunohistochemical, and clinical features of 27 mammary tumors in 18 male dogs." Vet Pathol **49**(4): 602-607.

Beaudu-Lange, C., S. Larrat, E. Lange, K. Lecoq and F. Nguyen (2021). "Prevalence of Reproductive Disorders including Mammary Tumors and Associated Mortality in Female Dogs." Vet Sci **8**(9).

Beauvais, W., J. M. Cardwell and D. C. Brodbelt (2012). "The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs - a systematic review." J Small Anim Pract **53**(6): 314-322.

Belhassen, H., I. Jimenez-Diaz, J. P. Arrebola, R. Ghali, H. Ghorbel, N. Olea and A. Hedili (2015). "Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: a case-control study in Tunisia." Chemosphere **128**: 1-6.

Belli, P., C. Bellaton, J. Durand, S. Balleydier, N. Milhau, M. Mure, J. F. Mornex, M. Benahmed and C. Le Jan (2010). "Fetal and neonatal exposure to the mycotoxin zearalenone induces phenotypic alterations in adult rat mammary gland." Food Chem Toxicol **48**(10): 2818-2826.

Benjamin, S. A., A. C. Lee and W. J. Saunders (1999). "Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles." Vet Pathol **36**(5): 423-436.

Boldizsar, H., O. Szenci, T. Muray and J. Csenki (1992). "Studies on canine mammary tumours. I. Age, seasonal and breed distribution." Acta Vet Hung **40**(1-2): 75-87.

Bornbaum, J. (2012). Immunhistologische Untersuchung ausgewählter Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren in der neoplastisch veränderten Mamma und den assoziierten Lymphknoten von Hunden. Diss Vet Med., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Brinkmann, J. (2015). Verhalten sich kastrierte Hunde anders als nicht kastrierte? – Ergebnisse einer Besitzerbefragung. Diss Vet Med., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Brodey, R. S., I. J. Fidler and A. E. Howson (1966). "The relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy, and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms." J Am Vet Med Assoc **149**(8): 1047-1049.

Brody, J. G., K. B. Moysich, O. Humblet, K. R. Attfield, G. P. Beehler and R. A. Rudel (2007). "Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies." Cancer **109**(12 Suppl): 2667-2711.

Bulun, S. E., M. S. Mahendroo and E. R. Simpson (1994). "Aromatase gene expression in adipose tissue: relationship to breast cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **49**(4-6): 319-326.

Burrai, G. P., A. Gabrieli, V. Moccia, V. Zappulli, I. Porcellato, C. Brachelente, S. Pirino, M. Polinas and E. Antuofermo (2020). "A Statistical Analysis of Risk Factors and Biological Behavior in Canine Mammary Tumors: A Multicenter Study." Animals (Basel) **10**(9).

- Cameron, A. M. and L. J. Faulkin, Jr. (1971). "Hyperplastic and inflammatory nodules in the canine mammary gland." J Natl Cancer Inst **47**(6): 1277-1287.
- Canadas, A., M. Franca, C. Pereira, R. Vilaca, H. Vilhena, F. Tinoco, M. J. Silva, J. Ribeiro, R. Medeiros, P. Oliveira, P. Dias-Pereira and M. Santos (2019). "Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study." Vet Pathol **56**(2): 208-219.
- Cancer, I.-I. A. f. R. o. (2012). "Aflatoxins." IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans **100F**: 225-248.
- Carmichael, A. R., S. Bendall, L. Lockerbie, R. J. Prescott and T. Bates (2004). "Does obesity compromise survival in women with breast cancer?" Breast **13**(2): 93-96.
- Carter, C. L., C. Allen and D. E. Henson (1989). "Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases." Cancer **63**(1): 181-187.
- Chai, H. and R. E. Brown (2009). "Field effect in cancer-an update." Ann Clin Lab Sci **39**(4): 331-337.
- Chang, S. C., C. C. Chang, T. J. Chang and M. L. Wong (2005). "Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002)." J Am Vet Med Assoc **227**(10): 1625-1629.
- Chen, H. L., M. Q. Zhou, W. Tian, K. X. Meng and H. F. He (2016). "Effect of Age on Breast Cancer Patient Prognoses: A Population-Based Study Using the SEER 18 Database." PLoS One **11**(10): e0165409.
- Childress, M. O., C. M. Fulkerson, S. A. Lahrman and H. Y. Weng (2016). "Inter- and intra-rater reliability of calliper-based lymph node measurement in dogs with peripheral nodal lymphomas." Vet Comp Oncol **14 Suppl 1**: 74-81.
- Chowdhury, F. A., M. F. Islam, M. T. Prova, M. Khatun, I. Sharmin, K. M. Islam, M. K. Hassan, M. A. S. Khan and M. M. Rahman (2021). "Association of hyperlipidemia with breast cancer in Bangladeshi women." Lipids Health Dis **20**(1): 52.
- Chu, P. Y., A. T. Liao and C. H. Liu (2011). "Interobserver Variation in the Morphopathological Diagnosis of Canine Mammary Gland Tumor Among Veterinary Pathologists." Int. J. Appl. Res. Vet. Med(9): 388-391.
- Cichon, M. A., A. C. Degnim, D. W. Visscher and D. C. Radisky (2010). "Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia **15**(4): 389-397.
- Cleary, M. P., M. E. Grossmann and A. Ray (2010). "Effect of obesity on breast cancer development." Vet Pathol **47**(2): 202-213.
- Clemente, M., M. D. Perez-Alenza, J. C. Illera and L. Pena (2010). "Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer." Vet Pathol **47**(2): 265-274.

Concannon, P., N. Altszuler, J. Hampshire, W. R. Butler and W. Hansel (1980). "Growth hormone, prolactin, and cortisol in dogs developing mammary nodules and an acromegaly-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate." Endocrinology **106**(4): 1173-1177.

Concannon, P. W. (2011). "Reproductive cycles of the domestic bitch." Anim Reprod Sci **124**(3-4): 200-210.

Concannon, P. W., T. R. Spraker, H. W. Casey and W. Hansel (1981). "Gross and histopathologic effects of medroxyprogesterone acetate and progesterone on the mammary glands of adult beagle bitches." Fertil Steril **36**(3): 373-387.

Cooley, D. M., B. C. Beranek, D. L. Schlittler, N. W. Glickman, L. T. Glickman and D. J. Waters (2002). "Endogenous gonadal hormone exposure and bone sarcoma risk." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(11): 1434-1440.

Costa-Santos, K., K. Damasceno, R. D. Portela, F. L. Santos, G. C. Araujo, E. F. Martins-Filho, L. P. Silva, T. D. Barral, S. A. Santos and A. Estrela-Lima (2019). "Lipid and metabolic profiles in female dogs with mammary carcinoma receiving dietary fish oil supplementation." BMC Vet Res **15**(1): 401.

Crescio, M. I., G. Ru, L. Aresu, E. Bozzetta, M. G. Cancedda, K. Capello, M. Castagnaro, A. Carnio, C. Cocumelli, B. Degli Uberti, C. Eleni, G. Foiani, N. Fonti, L. R. Gibelli, L. Maniscalco, E. Manuali, V. Moccia, O. Paciello, A. Petrella, A. Petrini, A. Poli, R. Puleio, E. Razzuoli, P. Scaramozzino, K. Varello, M. Vascellari, V. Zappulli, A. Ferrari and N. On Behalf Of (2022). "The Italian Network of Laboratories for Veterinary Oncology (NILOV) 2.0: Improving Knowledge on Canine Tumours." Vet Sci **9**(8).

de Andres, P. J., S. Caceres, J. C. Illera, B. Crespo, G. Silvan, F. L. Queiroga, M. J. Illera, M. D. Perez-Alenza and L. Pena (2022). "Hormonal Homologies between Canine Mammary Cancer and Human Breast Cancer in a Series of Cases." Vet Sci **9**(8).

de Nardi, A. B., R. Dos Santos Horta, C. E. Fonseca-Alves, F. N. de Paiva, L. C. M. Linhares, B. F. Firmo, F. A. Ruiz Sueiro, K. D. de Oliveira, S. V. Lourenco, R. De Francisco Strefezzi, C. H. M. Brunner, M. M. M. Rangel, P. C. Jark, J. L. C. Castro, R. Ubukata, K. Batschinski, R. A. Sobral, N. O. da Cruz, A. T. Nishiya, S. C. Fernandes, S. C. Dos Santos Cunha, D. G. Gerardi, G. S. G. Challoub, L. R. Biondi, R. Laufer-Amorim, P. R. de Oliveira Paes, G. E. Lavalle, R. R. Huppes, F. Grandi, C. H. de Carvalho Vasconcellos, D. S. Dos Anjos, A. C. M. Luzo, J. M. Matera, M. Vozdova and M. L. Z. Dagli (2022). "Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors." Cells **11**(4).

Den Otter, W., J. W. Koten, B. J. Van der Vegt, F. A. Beemer, O. J. Boxma, D. J. Derkinderen, P. W. De Graaf, J. Huber, C. J. Lips, P. J. Roholl and et al. (1990). "Oncogenesis by mutations in anti-oncogenes: a view." Anticancer Res **10**(2B): 475-487.

- den Tonkelaar, I., F. de Waard, J. C. Seidell and J. Fracheboud (1995). "Obesity and subcutaneous fat patterning in relation to survival of postmenopausal breast cancer patients participating in the DOM-project." Breast Cancer Res Treat **34**(2): 129-137.
- Dias, M. L. d. M., J. M. L. Andrade, M. B. d. Castro and P. D. Galera (2016). "Survival analysis of female dogs with mammary tumors after mastectomy: epidemiological, clinical and morphological aspects." Pesquisa Veterinária Brasileira **36**(3): 181-186.
- Dignam, J. J., K. Wieand, K. A. Johnson, B. Fisher, L. Xu and E. P. Mamounas (2003). "Obesity, tamoxifen use, and outcomes in women with estrogen receptor-positive early-stage breast cancer." J Natl Cancer Inst **95**(19): 1467-1476.
- Dobson, J. M., S. Samuel, H. Milstein, K. Rogers and J. L. Wood (2002). "Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs." J Small Anim Pract **43**(6): 240-246.
- Donnay, I., J. Raus, N. Devleeschouwer, P. Wouters-Ballman, G. Leclercq and J. Verstegen (1995). "Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs." Am J Vet Res **56**(9): 1188-1194.
- Dorn, C. R., D. O. Taylor, R. Schneider, H. H. Hibbard and M. R. Klauber (1968). "Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County." J Natl Cancer Inst **40**(2): 307-318.
- Dunn, B. K., T. Agurs-Collins, D. Browne, R. Lubet and K. A. Johnson (2010). "Health disparities in breast cancer: biology meets socioeconomic status." Breast Cancer Res Treat **121**(2): 281-292.
- Eaton, D. L. and E. P. Gallagher (1994). "Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis." Annu Rev Pharmacol Toxicol **34**: 135-172.
- Egenvall, A., B. N. Bonnett, P. Ohagen, P. Olson, A. Hedhammar and H. von Euler (2005). "Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002." Prev Vet Med **69**(1-2): 109-127.
- Egenvall, A., A. Nødtvedt, J. Penell, L. Gunnarsson and B. N. Bonnett (2009). "Insurance data for research in companion animals: benefits and limitations." Acta Vet Scand **51**(1): 42.
- Eliyatkın, N., B. Zengel, A. Yagci, E. Comut, H. Postacı, A. Uslu and S. Aktas (2015). "Properties of Synchronous Versus Metachronous Bilateral Breast Carcinoma with Long Time Follow Up." Asian Pac J Cancer Prev **16**(12): 4921-4926.
- Elston, C. W. and I. O. Ellis (1991). "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." Histopathology **19**(5): 403-410.
- Ennour-Ildrissi, K., P. Ayotte and C. Diorio (2019). "Persistent Organic Pollutants and Breast Cancer: A Systematic Review and Critical Appraisal of the Literature." Cancers (Basel) **11**(8).

Enriori, C. L. and J. Reforzo-Membrives (1984). "Peripheral aromatization as a risk factor for breast and endometrial cancer in postmenopausal women: a review." Gynecol Oncol **17**(1): 1-21.

Ernst, T., M. Kessler, E. Lautscham, L. Willimzig and R. Neiger (2016). "Das multizentrische Lymphom bei 411 Hunden - eine epidemiologische Studie." Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere **44**(4): 245-251.

Euhus, D. M., C. Hudd, M. C. LaRegina and F. E. Johnson (1986). "Tumor measurement in the nude mouse." J Surg Oncol **31**(4): 229-234.

Fabian, C. J., B. F. Kimler and S. D. Hursting (2015). "Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship." Breast Cancer Res **17**(1): 62.

Farvid, M. S., E. Cho, W. Y. Chen, A. H. Eliassen and W. C. Willett (2014). "Dietary protein sources in early adulthood and breast cancer incidence: prospective cohort study." BMJ **348**: g3437.

Farvid, M. S., E. Cho, W. Y. Chen, A. H. Eliassen and W. C. Willett (2015). "Adolescent meat intake and breast cancer risk." Int J Cancer **136**(8): 1909-1920.

Feigelson, H. S. and B. E. Henderson (1996). "Estrogens and breast cancer." Carcinogenesis **17**(11): 2279-2284.

Feng, Y., M. Spezia, S. Huang, C. Yuan, Z. Zeng, L. Zhang, X. Ji, W. Liu, B. Huang, W. Luo, B. Liu, Y. Lei, S. Du, A. Vuppapapati, H. H. Luu, R. C. Haydon, T. C. He and G. Ren (2018). "Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis." Genes Dis **5**(2): 77-106.

Ferreira, E., A. C. Bertagnolli, M. F. Cavalcanti, F. C. Schmitt and G. D. Cassali (2009). "The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours." Vet Comp Oncol **7**(4): 230-235.

Ferreira, E., H. Gobbi, B. S. Saraiva and G. D. Cassali (2012). "Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hyperplasia as a preneoplastic marker in dogs." Vet Pathol **49**(2): 322-329.

Fowler, E. H., G. P. Wilson and A. Koestner (1974). "Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification." Vet Pathol **11**(3): 212-229.

Frank, D. W., K. T. Kirton, T. E. Murchison, W. J. Quinlan, M. E. Coleman, T. J. Gilbertson, E. S. Feenstra and F. A. Kimball (1979). "Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate or progesterone for four years." Fertil Steril **31**(3): 340-346.

Frehse, M. S., M. I. Martins, E. Y. Ono, A. P. Bracarense, L. Y. Bissoqui, E. M. Teixeira, N. J. Santos and R. L. Freire (2015). "Aflatoxins ingestion and canine mammary tumors: There is an association?" Food Chem Toxicol **84**: 74-78.

- Gadaleta, E., G. J. Thorn, H. Ross-Adams, L. J. Jones and C. Chelala (2022). "Field cancerization in breast cancer." J Pathol **257**(4): 561-574.
- Gajdos, C., P. I. Tartter and I. J. Bleiweiss (1999). "Lymphatic invasion, tumor size, and age are independent predictors of axillary lymph node metastases in women with T1 breast cancers." Ann Surg **230**(5): 692-696.
- Gamlem, H., K. Nordstoga and E. Glatte (2008). "Canine neoplasia - introductory paper." APMIS Suppl(125): 5-18.
- Garcia-Estevez, L. and G. Moreno-Bueno (2019). "Updating the role of obesity and cholesterol in breast cancer." Breast Cancer Res **21**(1): 35.
- Gautam, S., N. K. Sood, K. Gupta, C. Joshi, K. K. Gill, R. Kaur and I. Chauhan (2020). "Bioaccumulation of pesticide contaminants in tissue matrices of dogs suffering from malignant canine mammary tumors in Punjab, India." Heliyon **6**(10): e05274.
- Gearhart-Serna, L. M., K. Hoffman and G. R. Devi (2020). "Environmental Quality and Invasive Breast Cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **29**(10): 1920-1928.
- Geil, R. G. and J. K. Lamar (1977). "FDA studies of estrogen, progestogens, and estrogen/progestogen combinations in the dog and monkey." J Toxicol Environ Health **3**(1-2): 179-193.
- Gilbertson, S. R., I. D. Kurzman, R. E. Zachrau, A. I. Hurvitz and M. M. Black (1983). "Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs." Vet Pathol **20**(2): 127-142.
- Giles, R. C., R. P. Kwapien, R. G. Geil and H. W. Casey (1978). "Mammary nodules in beagle dogs administered investigational oral contraceptive steroids." J Natl Cancer Inst **60**(6): 1351-1364.
- Girolimetti, G., L. Marchio, A. De Leo, M. Mangiarelli, L. B. Amato, S. Zanotti, M. Taffurelli, D. Santini, G. Gasparre and C. Ceccarelli (2021). "Mitochondrial DNA analysis efficiently contributes to the identification of metastatic contralateral breast cancers." J Cancer Res Clin Oncol **147**(2): 507-516.
- Giuliano, A. E., S. B. Edge and G. N. Hortobagyi (2018). "Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer." Ann Surg Oncol **25**(7): 1783-1785.
- Goldschmidt, M., L. Peña, R. Rasotto and V. Zappulli (2011). "Classification and grading of canine mammary tumors." Vet Pathol **48**(1): 117-131.
- Gottwald, D. (1998). Ein Beitrag zur Häufigkeit von Mammatumoren beim Hund. Statistische Auswertung der Einsendungen einer Praxis für Tierpathologie aus den Jahren 1990 bis 1995. Diss Vet Med., Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Gray, J. M., S. Rasanayagam, C. Engel and J. Rizzo (2017). "State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment." Environ Health **16**(1): 94.

Greer, K. A., S. C. Canterbury and K. E. Murphy (2007). "Statistical analysis regarding the effects of height and weight on life span of the domestic dog." Res Vet Sci **82**(2): 208-214.

Gruntzig, K., R. Graf, G. Boo, F. Guscetti, M. Hassig, K. W. Axhausen, S. Fabrikant, M. Welle, D. Meier, G. Folkers and A. Pospischil (2016). "Swiss Canine Cancer Registry 1955-2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development." J Comp Pathol **155**(2-3): 156-170.

Gruntzig, K., R. Graf, M. Hassig, M. Welle, D. Meier, G. Lott, D. Erni, N. S. Schenker, F. Guscetti, G. Boo, K. Axhausen, S. Fabrikant, G. Folkers and A. Pospischil (2015). "The Swiss Canine Cancer Registry: a retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008." J Comp Pathol **152**(2-3): 161-171.

Gunnes, G., K. S. Borge and F. Lingaas (2015). "A statistical assessment of the biological relationship between simultaneous canine mammary tumours." Vet Comp Oncol.

Günzel-Apel, A.-R. (2016). Geschlechtsreife, Zuchtreife, Senium. Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze. A.-R. Günzel-Apel and H. Bostedt, Schattauer: 7-9.

Hankinson, S. E., G. A. Colditz and W. C. Willett (2004). "Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones." Breast Cancer Res **6**(5): 213-218.

Hart, B. L., L. A. Hart, A. P. Thigpen and N. H. Willits (2014). "Long-term health effects of neutering dogs: comparison of Labrador Retrievers with Golden Retrievers." PLoS One **9**(7): e102241.

Hart, B. L., L. A. Hart, A. P. Thigpen and N. H. Willits (2020). "Assisting Decision-Making on Age of Neutering for Mixed Breed Dogs of Five Weight Categories: Associated Joint Disorders and Cancers." Front Vet Sci **7**: 472.

Hart, B. L. H., Lynette A.; Thigpen, Abigail P.; Willits, Neil H. (2016). "Neutering of German Shepherd Dogs: associated joint disorders, cancers and urinary incontinence." Veterinary Medicine and Science **2**(3): 191-199.

Hartmann, L. C., A. C. Degnim, R. J. Santen, W. D. Dupont and K. Ghosh (2015). "Atypical hyperplasia of the breast--risk assessment and management options." N Engl J Med **372**(1): 78-89.

Hartmann, L. C., T. A. Sellers, M. H. Frost, W. L. Lingle, A. C. Degnim, K. Ghosh, R. A. Vierkant, S. D. Maloney, V. S. Pankratz, D. W. Hillman, V. J. Suman, J. Johnson, C. Blake, T. Tlsty, C. M. Vachon, L. J. Melton, 3rd and D. W. Visscher (2005). "Benign breast disease and the risk of breast cancer." N Engl J Med **353**(3): 229-237.

Hellmen, E., R. Bergstrom, L. Holmberg, I. B. Spangberg, K. Hansson and A. Lindgren (1993). "Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases." Vet Pathol **30**(1): 20-27.

Hennecke, S. (2015). Molekulargenetische Untersuchungen caniner Mammatumoren und ihrer zirkulierenden Nukleinsäuren. Diss Vet Med., Tierärztliche Hochschule Hannover.

Hess, D. R. (2004). "Retrospective studies and chart reviews." Respir Care **49**(10): 1171-1174.

Hilton, H. N., C. L. Clarke and J. D. Graham (2018). "Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development." Mol Cell Endocrinol **466**: 2-14.

Hoffman, J. M., K. E. Creevy and D. E. Promislow (2013). "Reproductive capability is associated with lifespan and cause of death in companion dogs." PLoS One **8**(4): e61082.

Hortobagyi, G. N., J. de la Garza Salazar, K. Pritchard, D. Amadori, R. Haidinger, C. A. Hudis, H. Khaled, M. C. Liu, M. Martin, M. Namer, J. A. O'Shaughnessy, Z. Z. Shen, K. S. Albain and A. Investigators (2005). "The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival." Clin Breast Cancer **6**(5): 391-401.

Howe, L. M., M. R. Slater, H. W. Boothe, H. P. Hobson, J. L. Holcom and A. C. Spann (2001). "Long-term outcome of gonadectomy performed at an early age or traditional age in dogs." J Am Vet Med Assoc **218**(2): 217-221.

Hursting, S. D. and S. M. Dunlap (2012). "Obesity, metabolic dysregulation, and cancer: a growing concern and an inflammatory (and microenvironmental) issue." Ann N Y Acad Sci **1271**(1): 82-87.

Imyanitov, E. N. and E. S. Kuligina (2020). "Systemic investigations into the molecular features of bilateral breast cancer for diagnostic purposes." Expert Rev Mol Diagn **20**(1): 41-47.

Imyanitov, E. N., E. N. Suspitsin, M. Y. Grigoriev, A. V. Togo, E. Kuligina, E. V. Belogubova, K. M. Pozhariski, E. A. Turkevich, C. Rodriguez, C. J. Cornelisse, K. P. Hanson and C. Theillet (2002). "Concordance of allelic imbalance profiles in synchronous and metachronous bilateral breast carcinomas." Int J Cancer **100**(5): 557-564.

Intra, M., N. Rotmensz, G. Viale, L. Mariani, B. Bonanni, M. G. Mastropasqua, V. Galimberti, R. Gennari, P. Veronesi, M. Colleoni, E. Tousimis, A. Galli, A. Goldhirsch and U. Veronesi (2004). "Clinicopathologic characteristics of 143 patients with synchronous bilateral invasive breast carcinomas treated in a single institution." Cancer **101**(5): 905-912.

Itoh, T., K. Uchida, K. Ishikawa, K. Kushima, E. Kushima, H. Tamada, T. Moritake, H. Nakao and H. Shii (2005). "Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland

tumors: differences between small-breed dogs and others." J Vet Med Sci **67**(3): 345-347.

Jensen, M. M., J. T. Jorgensen, T. Binderup and A. Kjaer (2008). "Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper." BMC Med Imaging **8**: 16.

Jeziarska-Drutel, A., S. A. Rosenzweig and C. A. Neumann (2013). "Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression." Adv Cancer Res **119**: 107-125.

Jitpean, S., R. Hagman, B. Strom Holst, O. V. Hoglund, A. Pettersson and A. Egenvall (2012). "Breed variations in the incidence of pyometra and mammary tumours in Swedish dogs." Reprod Domest Anim **47 Suppl 6**: 347-350.

Kaminska, M., T. Ciszewski, K. Lopacka-Szatan, P. Miotla and E. Staroslawska (2015). "Breast cancer risk factors." Prz Menopauzalny **14**(3): 196-202.

Karayannopoulou, M., E. Kaldrymidou, T. C. Constantinidis and A. Dessiris (2005). "Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method." J Comp Pathol **133**(4): 246-252.

Komazawa, S., H. Sakai, Y. Itoh, M. Kawabe, M. Murakami, T. Mori and K. Maruo (2016). "Canine tumor development and crude incidence of tumors by breed based on domestic dogs in Gifu Prefecture." J Vet Med Sci.

Kristiansen, V. M., A. Nodtvedt, A. M. Breen, M. Langeland, J. Teige, M. Goldschmidt, T. J. Jonasdottir, T. Grotmol and K. Sorenmo (2013). "Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with benign mammary tumors and hyperplastic lesions: a randomized controlled clinical trial." J Vet Intern Med **27**(4): 935-942.

Kristiansen, V. M., L. Peña, L. Diez Cordova, J. C. Illera, E. Skjerve, A. M. Breen, M. A. Cofone, M. Langeland, J. Teige, M. Goldschmidt and K. U. Sorenmo (2016). "Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial." J Vet Intern Med **30**(1): 230-241.

Kumar, P. and R. Aggarwal (2016). "An overview of triple-negative breast cancer." Arch Gynecol Obstet **293**(2): 247-269.

Kumie, G., T. Melak and H. Wondifraw Baynes (2020). "The Association of Serum Lipid Levels with Breast Cancer Risks Among Women with Breast Cancer at Felege Hiwot Comprehensive Specialized Hospital, Northwest Ethiopia." Breast Cancer (Dove Med Press) **12**: 279-287.

Kurzman, I. D. and S. R. Gilbertson (1986). "Prognostic factors in canine mammary tumors." Semin Vet Med Surg (Small Anim) **1**(1): 25-32.

Kwapien, R. P., R. C. Giles, R. G. Geil and H. W. Casey (1980). "Malignant mammary tumors in beagle dogs dosed with investigational oral contraceptive steroids." J Natl Cancer Inst **65**(1): 137-144.

Kwon, S. C., D. Y. Yoo, M. Ko, K. Y. Lee, H. H. Kwak, I. C. Park, I. K. Hwang, J. H. Choi and J. Y. Chung (2017). "Mammary gland tumors in a male Cocker Spaniel." Acta Vet Scand **59**(1): 20.

Lakhani, S. R. (1999). "The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast." J Pathol **187**(3): 272-278.

Lamp, O. (2012). Etablierung biochemischer Marker für Diagnostik und Prognose caniner Mammatumore. Diss Vet Med., Universität Leipzig.

Lautscham, E. (2017). Das canine multizentrische maligne Lymphom: Untersuchungen zur Epidemiologie in Deutschland und Vergleich zweier Chemotherapieprotokolle mit und ohne Erhaltungsphase. Diss Vet Med., Justus-Liebig-Universität Gießen.

Liehr, J. G. (2000). "Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen?" Endocr Rev **21**(1): 40-54.

Lim, H. Y., K. S. Im, N. H. Kim, H. W. Kim, J. I. Shin, J. Y. Yhee and J. H. Sur (2015). "Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors." Vet Pathol **52**(6): 1045-1051.

Lim, H. Y., B. J. Seung, S. H. Cho, S. H. Kim, M. K. Bae and J. H. Sur (2022). "Canine mammary cancer in overweight or obese female dogs is associated with intratumoral microvessel density and macrophage counts." Vet Pathol **59**(1): 39-45.

Litterine-Kaufman, J., S. A. Casale and P. J. Mouser (2019). "Prevalence of malignancy in masses from the mammary gland region of dogs with single or multiple masses." J Am Vet Med Assoc **255**(7): 817-820.

Liu, Y., M. He, W. J. Zuo, S. Hao, Z. H. Wang and Z. M. Shao (2021). "Tumor Size Still Impacts Prognosis in Breast Cancer With Extensive Nodal Involvement." Front Oncol **11**: 585613.

Liu, Y. and W. Wang (2016). "Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes." Anim Sci J **87**(12): 1490-1500.

Lo, J. J., Y. M. Park, R. Sinha and D. P. Sandler (2020). "Association between meat consumption and risk of breast cancer: Findings from the Sister Study." Int J Cancer **146**(8): 2156-2165.

MacVean, D. W., A. W. Monlux, P. S. Anderson, Jr., S. L. Silberg and J. F. Roszel (1978). "Frequency of canine and feline tumors in a defined population." Vet Pathol **15**(6): 700-715.

Mainenti, M., R. Rasotto, P. Carnier and V. Zappulli (2014). "Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs." Vet J **202**(1): 62-68.

- Marchese, S., A. Polo, A. Ariano, S. Velotto, S. Costantini and L. Severino (2018). "Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development." Toxins (Basel) **10**(6).
- Marchi, P. H., T. H. A. Vendramini, M. P. Perini, R. V. A. Zafalon, A. R. Amaral, V. A. Ochamoto, J. C. Da Silveira, M. L. Z. Dagli and M. A. Brunetto (2022). "Obesity, inflammation, and cancer in dogs: Review and perspectives." Front Vet Sci **9**: 1004122.
- Marconato, L., G. Romanelli, D. Stefanello, C. Giacoboni, U. Bonfanti, G. Bettini, R. Finotello, S. Verganti, P. Valenti, L. Ciaramella and E. Zini (2009). "Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008)." J Am Vet Med Assoc **235**(8): 967-972.
- McGreevy, P., P. Thomson, N. K. Dhand, D. Raubenheimer, S. Masters, C. S. Mansfield, T. Baldwin, R. J. Soares Magalhaes, J. Rand, P. Hill, A. Peaston, J. Gilkerson, M. Combs, S. Raidal, P. Irwin, P. Irons, R. Squires, D. Brodbelt and J. Hammond (2017). "VetCompass Australia: A National Big Data Collection System for Veterinary Science." Animals (Basel) **7**(10).
- Merlo, D. F., L. Rossi, C. Pellegrino, M. Ceppi, U. Cardellino, C. Capurro, A. Ratto, P. L. Sambucco, V. Sestito, G. Tanara and V. Bocchini (2008). "Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy." J Vet Intern Med **22**(4): 976-984.
- Millanta, F., M. Calandrella, G. Bari, M. Niccolini, I. Vannozzi and A. Poli (2005). "Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues." Res Vet Sci **79**(3): 225-232.
- Misdorp, W. (1988). "Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins." Vet Q **10**(1): 26-33.
- Misdorp, W., Else, R.W., Hellmen, E., Lipscomb, T.P. (1999). "Histologic Classification of mammary tumors of the dog and the cat." Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization **7**(59).
- Misdorp, W. and A. A. Hart (1976). "Prognostic factors in canine mammary cancer." J Natl Cancer Inst **56**(4): 779-786.
- Moe, L. (2001). "Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds." J Reprod Fertil Suppl **57**: 439-443.
- Mohammed, S. I., S. Utturkar, M. Lee, H. H. Yang, Z. Cui, N. Atallah Lanman, G. Zhang, X. E. Ramos Cardona, S. K. Mittal and M. A. Miller (2020). "Ductal Carcinoma In Situ Progression in Dog Model of Breast Cancer." Cancers (Basel) **12**(2).
- Mol, J. A., E. van Garderen, G. R. Rutteman and A. Rijnberk (1996). "New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans." J Steroid Biochem Mol Biol **57**(1-2): 67-71.

Molina-Molina, J. M., M. Real, I. Jimenez-Diaz, H. Belhassen, A. Hedhili, P. Torne, M. F. Fernandez and N. Olea (2014). "Assessment of estrogenic and anti-androgenic activities of the mycotoxin zearalenone and its metabolites using in vitro receptor-specific bioassays." Food Chem Toxicol **74**: 233-239.

Momenimovahed, Z. and H. Salehiniya (2019). "Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world." Breast Cancer (Dove Med Press) **11**: 151-164.

Morris, J. S., J. M. Dobson, D. E. Bostock and E. O'Farrell (1998). "Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms." Vet Rec **142**(24): 656-658.

Moulton, J. E., L. S. Rosenblatt and M. Goldman (1986). "Mammary tumors in a colony of beagle dogs." Vet Pathol **23**(6): 741-749.

Mourouti, N., M. D. Kontogianni, C. Papavagelis, P. Plytzanopoulou, T. Vassilakou, T. Psaltopoulou, N. Malamos, A. Linos and D. B. Panagiotakos (2015). "Meat consumption and breast cancer: a case-control study in women." Meat Sci **100**: 195-201.

Mucha, J., A. Rybicka, I. Dolka, J. Szymanska, E. Manuali, M. Parzeniecka-Jaworska, W. Klucinski and M. Krol (2016). "Immunosuppression in Dogs During Mammary Cancer Development." Vet Pathol.

Muñoz-Cruz, S., C. Togno-Pierce and J. Morales-Montor (2011). "Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role." Curr Top Med Chem **11**(13): 1714-1727.

Murkin, J. T., H. E. Amos, D. W. Brough and K. D. Turley (2022). "In Silico Modeling Demonstrates that User Variability During Tumor Measurement Can Affect In Vivo Therapeutic Efficacy Outcomes." Cancer Inform **21**: 11769351221139257.

Narod, S. A. (2012). "Tumour size predicts long-term survival among women with lymph node-positive breast cancer." Curr Oncol **19**(5): 249-253.

Newman, L. A. (2014). "Breast cancer disparities: high-risk breast cancer and African ancestry." Surg Oncol Clin N Am **23**(3): 579-592.

Nguyen, S. M., D. H. Thamm, D. M. Vail and C. A. London (2015). "Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document." Vet Comp Oncol **13**(3): 176-183.

Nieto, A., L. Peña, M. D. Perez-Alenza, M. A. Sanchez, J. M. Flores and M. Castano (2000). "Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance." Vet Pathol **37**(3): 239-247.

O'Neill, D., D. B. Church, P. D. McGreevy, P. C. Thomson and D. C. Brodbelt (2014). "Prevalence of disorders recorded in dogs attending primary-care veterinary practices in England." PLoS One **9**(3): e90501.

O'Neill, D. G., D. B. Church, P. D. McGreevy, P. C. Thomson and D. C. Brodbelt (2014). "Approaches to canine health surveillance." Canine Genet Epidemiol **1**: 2.

O'Neill, D. G., C. Pegram, P. Crocker, D. C. Brodbelt, D. B. Church and R. M. A. Packer (2020). "Unravelling the health status of brachycephalic dogs in the UK using multivariable analysis." Sci Rep **10**(1): 17251.

Olson, P. N., M. V. Kustritz and S. D. Johnston (2001). "Early-age neutering of dogs and cats in the United States (a review)." J Reprod Fertil Suppl **57**: 223-232.

Omofuma, O. O., S. E. Steck, A. F. Olshan and M. A. Troester (2022). "The association between meat and fish intake by preparation methods and breast cancer in the Carolina Breast Cancer Study (CBCS)." Breast Cancer Res Treat **193**(1): 187-201.

Owens, L. N., World Health Organization (1980). TNM Classification of Tumours in Domestic Animals, Veterinary Public Health Unit & WHO Collaborating Center for Comparative Oncology.

Padmanabhan, N., A. Subramanyan and S. Radhakrishna (2015). "Synchronous Bilateral Breast Cancers." J Clin Diagn Res **9**(9): XC05-XC08.

Papparella, S., M. I. Crescio, V. Baldassarre, B. Brunetti, G. P. Burrai, C. Cocumelli, V. Grieco, S. Iussich, L. Maniscalco, F. Mariotti, F. Millanta, O. Paciello, R. Rasotto, M. Romanucci, A. Sfacteria and V. Zappulli (2022). "Reproducibility and Feasibility of Classification and National Guidelines for Histological Diagnosis of Canine Mammary Gland Tumours: A Multi-Institutional Ring Study." Vet Sci **9**(7).

Parada, H., Jr., S. E. Steck, P. T. Bradshaw, L. S. Engel, K. Conway, S. L. Teitelbaum, A. I. Neugut, R. M. Santella and M. D. Gammon (2017). "Grilled, Barbecued, and Smoked Meat Intake and Survival Following Breast Cancer." J Natl Cancer Inst **109**(6).

Patel, S., A. Homaei, A. B. Raju and B. R. Meher (2018). "Estrogen: The necessary evil for human health, and ways to tame it." Biomed Pharmacother **102**: 403-411.

Pegram, C., D. C. Brodbelt, D. B. Church, J. Hall, L. Owen, Y. M. Chang and D. G. O'Neill (2019). "Associations between neutering and early-onset urinary incontinence in UK bitches under primary veterinary care." J Small Anim Pract **60**(12): 723-733.

Peña, L., P. J. De Andres, M. Clemente, P. Cuesta and M. D. Perez-Alenza (2013). "Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics." Vet Pathol **50**(1): 94-105.

Perez Alenza, D., G. R. Rutteman, L. Peña, A. C. Beynen and P. Cuesta (1998). "Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study." J Vet Intern Med **12**(3): 132-139.

Perez Alenza, M. D., L. Peña, N. del Castillo and A. I. Nieto (2000). "Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours." J Small Anim Pract **41**(7): 287-291.

- Philibert, J. C., P. W. Snyder, N. Glickman, L. T. Glickman, D. W. Knapp and D. J. Waters (2003). "Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors." J Vet Intern Med **17**(1): 102-106.
- Place, A. E., S. Jin Huh and K. Polyak (2011). "The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment." Breast Cancer Res **13**(6): 227.
- Platet, N., A. M. Cathiard, M. Gleizes and M. Garcia (2004). "Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion." Crit Rev Oncol Hematol **51**(1): 55-67.
- Priester, W. A. (1979). "Occurrence of mammary neoplasms in bitches in relation to breed, age, tumour type, and geographical region from which reported." J Small Anim Pract **20**(1): 1-11.
- Pullella, K. and J. Kotsopoulos (2020). "Arsenic Exposure and Breast Cancer Risk: A Re-Evaluation of the Literature." Nutrients **12**(11): 3305.
- Rai, A., M. Das and A. Tripathi (2020). "Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone." Crit Rev Food Sci Nutr **60**(16): 2710-2729.
- Ranganathan, B., M. Milovancev, H. Leeper, K. L. Townsend, S. Bracha and K. Curran (2018). "Inter- and intra-rater reliability and agreement in determining subcutaneous tumour margins in dogs." Vet Comp Oncol **16**(3): 392-398.
- Rasotto, R., D. Berlato, M. H. Goldschmidt and V. Zappulli (2017). "Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes." Vet Pathol: 300985817698208.
- Rasotto, R., D. Berlato, M. H. Goldschmidt and V. Zappulli (2017). "Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases." Vet Pathol **54**(4): 571-578.
- Reaves, D. K., E. Ginsburg, J. J. Bang and J. M. Fleming (2015). "Persistent organic pollutants and obesity: are they potential mechanisms for breast cancer promotion?" Endocr Relat Cancer **22**(2): R69-86.
- Renshaw, A. A. and E. W. Gould (2016). "Long term clinical follow-up of atypical ductal hyperplasia and lobular carcinoma in situ in breast core needle biopsies." Pathology **48**(1): 25-29.
- Rodgers, K. M., J. O. Udesky, R. A. Rudel and J. G. Brody (2017). "Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms." Environ Res **160**: 152-182.
- Rodriguez, J., A. Santana, P. Herraez, D. R. Killick and A. E. de Los Monteros (2022). "Epidemiology of canine mammary tumours on the Canary Archipelago in Spain." BMC Vet Res **18**(1): 268.
- Rudel, R. A., K. R. Atfield, J. N. Schifano and J. G. Brody (2007). "Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals

testing, and risk assessment for breast cancer prevention." Cancer **109**(12 Suppl): 2635-2666.

Russo, J. and I. H. Russo (2006). "The role of estrogen in the initiation of breast cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **102**(1-5): 89-96.

Rutteman, G. R. (1992). "Contraceptive steroids and the mammary gland: is there a hazard?--Insights from animal studies." Breast Cancer Res Treat **23**(1-2): 29-41.

Rutteman, G. R., S. J. Withrow and E. G. MacEwen (2001). Tumours of the Mammary Gland. Small Animal Oncology. S. J. Withrow and E. G. MacEwen. Philadelphia, WB Saunders.

Saad, R. S., K. L. Denning, S. D. Finkelstein, Y. Liu, T. C. Pereira, X. Lin and J. F. Silverman (2008). "Diagnostic and prognostic utility of molecular markers in synchronous bilateral breast carcinoma." Mod Pathol **21**(10): 1200-1207.

Saba, C. F., K. S. Rogers, S. J. Newman, G. E. Mauldin and D. M. Vail (2007). "Mammary gland tumors in male dogs." J Vet Intern Med **21**(5): 1056-1059.

Salas, Y., A. Marquez, D. Diaz and L. Romero (2015). "Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem." PLoS One **10**(5): e0127381.

Santos, A. A., C. C. Lopes, J. R. Ribeiro, L. R. Martins, J. C. Santos, I. F. Amorim, F. Gartner and A. J. Matos (2013). "Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study." BMC Vet Res **9**: 1.

Santos, M., C. Correia-Gomes, R. Marcos, A. Santos, A. De Matos, C. Lopes and P. Dias-Pereira (2015). "Value of the Nottingham Histological Grading Parameters and Nottingham Prognostic Index in Canine Mammary Carcinoma." Anticancer Res **35**(7): 4219-4227.

Santos, M., C. Correia-Gomes, A. Santos, A. de Matos, P. Dias-Pereira and C. Lopes (2015). "Interobserver Reproducibility of Histological Grading of Canine Simple Mammary Carcinomas." J Comp Pathol **153**(1): 22-27.

Schmidt, J. M. and J. Gedon (2022). Mammatumoren des Hundes. Kleintieronkologie. M. Kessler, Thieme Verlag: 377-389.

Schmidt, J. M. and M. Kessler (2013). Mammatumoren des Hundes. Kleintieronkologie. Kessler. Stuttgart, Enke Verlag: 241-252.

Schmitt, F. C. (1995). "Multistep progression from an oestrogen-dependent growth towards an autonomous growth in breast carcinogenesis." Eur J Cancer **31a**(12): 2049-2052.

Schneider, R. (1970). "Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer." Cancer **26**(2): 419-426.

- Schneider, R., C. R. Dorn and D. O. Taylor (1969). "Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival." J Natl Cancer Inst **43**(6): 1249-1261.
- Schoenrock, D. (2006). Mammatumoren des Hundes: Untersuchung zum postoperativen Krankheitsverlauf und zur Effektivität adjuvanter Chemotherapie mit Doxorubicin und Docetaxel. Diss Vet Med., Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Selman, P. J., J. A. Mol, G. R. Rutteman and A. Rijnberk (1994). "Progestin treatment in the dog. I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis." Eur J Endocrinol **131**(4): 413-421.
- Selman, P. J., E. van Garderen, J. A. Mol and T. S. van den Ingh (1995). "Comparison of the histological changes in the dog after treatment with the progestins medroxyprogesterone acetate and proligestone." Vet Q **17**(4): 128-133.
- Severe, S., P. Marchand, I. Guiffard, F. Morio, A. Venisseau, B. Veyrand, B. Le Bizec, J. P. Antignac and J. Abadie (2015). "Pollutants in pet dogs: a model for environmental links to breast cancer." Springerplus **4**: 27.
- Shen, H. M. and C. N. Ong (1996). "Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis." Mutat Res **366**(1): 23-44.
- Shoemaker, M. L., M. C. White, M. Wu, H. K. Weir and I. Romieu (2018). "Differences in breast cancer incidence among young women aged 20-49 years by stage and tumor characteristics, age, race, and ethnicity, 2004-2013." Breast Cancer Res Treat **169**(3): 595-606.
- Shofer, F. S., E. G. Sonnenschein, M. H. Goldschmidt, L. L. Laster and L. T. Glickman (1989). "Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma." Breast Cancer Res Treat **13**(1): 49-60.
- Silva, D. M. D., L. C. Kluthcovsky, H. Jensen de Moraes, G. M. Pallu, G. C. Dos Santos, J. L. Costa Castro and J. R. Engracia Filho (2019). "Inflammatory Mammary Carcinoma in a Male Dog-Case Report." Top Companion Anim Med **37**: 100357.
- Simm, P. J., A. Bajpai, V. C. Russo and G. A. Werther (2008). "Estrogens and growth." Pediatr Endocrinol Rev **6**(1): 32-41.
- Simpson, E. R., C. Clyne, G. Rubin, W. C. Boon, K. Robertson, K. Britt, C. Speed and M. Jones (2002). "Aromatase - a brief overview." Annu Rev Physiol **64**: 93-127.
- Simpson, E. R. and Y. Zhao (1996). "Estrogen biosynthesis in adipose. Significance in breast cancer development." Ann N Y Acad Sci **784**: 18-26.
- Singletary, S. E. (2003). "Rating the risk factors for breast cancer." Ann Surg **237**(4): 474-482.
- Sinn, H. P., Z. Elsawaf, B. Helmchen and S. Aulmann (2010). "Early Breast Cancer Precursor Lesions: Lessons Learned from Molecular and Clinical Studies." Breast Care (Basel) **5**(4): 218-226.

Sleeckx, N., H. de Rooster, E. J. Veldhuis Kroeze, C. Van Ginneken and L. Van Brantegem (2011). "Canine mammary tumours, an overview." Reprod Domest Anim **46**(6): 1112-1131.

Sonnenschein, E. G., L. T. Glickman, M. H. Goldschmidt and L. J. McKee (1991). "Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study." Am J Epidemiol **133**(7): 694-703.

Sorenmo, K. (2003). "Canine mammary gland tumors." Vet Clin North Am Small Anim Pract **33**(3): 573-596.

Sorenmo, K., D. R. Worley and V. Zappulli (2020). Tumours of the Mammary Gland. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. D. Vail, D. Thamm and J. M. Liptak: 604-625.

Sorenmo, K. U., A. C. Durham, E. Radaelli, V. Kristiansen, L. Peña, M. H. Goldschmidt and D. Stefanovski (2019). "The estrogen effect; clinical and histopathological evidence of dichotomous influences in dogs with spontaneous mammary carcinomas." PLoS One **14**(10): e0224504.

Sorenmo, K. U., V. M. Kristiansen, M. A. Cofone, F. S. Shofer, A. M. Breen, M. Langeland, C. M. Mongil, A. M. Grondahl, J. Teige and M. H. Goldschmidt (2009). "Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence." Vet Comp Oncol **7**(3): 162-172.

Sorenmo, K. U., R. Rasotto, V. Zappulli and M. H. Goldschmidt (2011). "Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms." Vet Pathol **48**(1): 85-97.

Sorenmo, K. U., F. S. Shofer and M. H. Goldschmidt (2000). "Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma." J Vet Intern Med **14**(3): 266-270.

Soysal, S. D., A. Tzankov and S. E. Muenst (2015). "Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer." Pathobiology **82**(3-4): 142-152.

Stavisky, J. and C. White (2022). "Does spaying at a younger age reduce dogs' risk of developing mammary tumours?" Vet Rec **190**(3): 123-125.

Steck, S. E., M. M. Gaudet, S. M. Eng, J. A. Britton, S. L. Teitelbaum, A. I. Neugut, R. M. Santella and M. D. Gammon (2007). "Cooked meat and risk of breast cancer--lifetime versus recent dietary intake." Epidemiology **18**(3): 373-382.

Stovring, M., L. Moe and E. Glattre (1997). "A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate." APMIS **105**(8): 590-596.

Stratmann, N., K. Failing, A. Richter and A. Wehrend (2008). "Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy." Vet Surg **37**(1): 82-86.

Stratmann, N., K. Failing and A. Wehrend (2006). "Untersuchung zur Lokalisation und Dignität von Mammatumoren bei Hündinnen mit multiplen Gesäugeneoplasien." Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere **34**(1): 23-28.

Sun, Y. S., Z. Zhao, Z. N. Yang, F. Xu, H. J. Lu, Z. Y. Zhu, W. Shi, J. Jiang, P. P. Yao and H. P. Zhu (2017). "Risk Factors and Preventions of Breast Cancer." Int J Biol Sci **13**(11): 1387-1397.

Taylor, G. N., L. Shabestari, J. Williams, C. W. Mays, W. Angus and S. McFarland (1976). "Mammary neoplasia in a closed beagle colony." Cancer Res **36**(8): 2740-2743.

Tesi, M., F. Millanta, A. Poli, G. Mazzetti, A. Pasquini, D. Panzani, A. Rota and I. Vannozzi (2020). "Role of body condition score and adiponectin expression in the progression of canine mammary carcinomas." Vet Med Sci **6**(3): 265-271.

Thike, A. A., J. Iqbal, P. Y. Cheok, G. M. Tse and P. H. Tan (2013). "Ductal carcinoma in situ associated with triple negative invasive breast cancer: evidence for a precursor-product relationship." J Clin Pathol **66**(8): 665-670.

Torres, C. G., M. P. Iturriaga and P. Cruz (2021). "Hormonal Carcinogenesis in Canine Mammary Cancer: Molecular Mechanisms of Estradiol Involved in Malignant Progression." Animals (Basel) **11**(3).

Torres de la Riva, G., B. L. Hart, T. B. Farver, A. M. Oberbauer, L. L. Messam, N. Willits and L. A. Hart (2013). "Neutering dogs: effects on joint disorders and cancers in golden retrievers." PLoS One **8**(2): e55937.

Trenti, A., S. Tedesco, C. Boscaro, L. Trevisi, C. Bolego and A. Cignarella (2018). "Estrogen, Angiogenesis, Immunity and Cell Metabolism: Solving the Puzzle." Int J Mol Sci **19**(3).

Trejejo, R., M. Yang and E. M. Lund (2011). "Epidemiology of surgical castration of dogs and cats in the United States." J Am Vet Med Assoc **238**(7): 898-904.

Troester, M. A., M. H. Lee, M. Carter, C. Fan, D. W. Cowan, E. R. Perez, J. R. Pirone, C. M. Perou, D. J. Jerry and S. S. Schneider (2009). "Activation of host wound responses in breast cancer microenvironment." Clin Cancer Res **15**(22): 7020-7028.

Urfer, S. R. and M. Kaeberlein (2019). "Desexing Dogs: A Review of the Current Literature." Animals (Basel) **9**(12).

Vascellari, M., E. Baioni, G. Ru, A. Carminato and F. Mutinelli (2009). "Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats." BMC Vet Res **5**: 39.

Vascellari, M., K. Capello, A. Carminato, C. Zanardello, E. Baioni and F. Mutinelli (2016). "Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer." Prev Vet Med **126**: 183-189.

- Wang, C., F. Bai, L. H. Zhang, A. Scott, E. Li and X. H. Pei (2018). "Estrogen promotes estrogen receptor negative BRCA1-deficient tumor initiation and progression." Breast Cancer Res **20**(1): 74.
- Wo, J. Y., K. Chen, B. A. Neville, N. U. Lin and R. S. Punglia (2011). "Effect of very small tumor size on cancer-specific mortality in node-positive breast cancer." J Clin Oncol **29**(19): 2619-2627.
- Yamagami, T., T. Kobayashi, K. Takahashi and M. Sugiyama (1996). "Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification." J Vet Med Sci **58**(11): 1079-1083.
- Yip, K. Y., M. L. Y. Wan, A. S. T. Wong, K. S. Korach and H. El-Nezami (2017). "Combined low-dose zearalenone and aflatoxin B1 on cell growth and cell-cycle progression in breast cancer MCF-7 cells." Toxicol Lett **281**: 139-151.
- Yu, K. D., Y. Z. Jiang, S. Chen, Z. G. Cao, J. Wu, Z. Z. Shen and Z. M. Shao (2012). "Effect of large tumor size on cancer-specific mortality in node-negative breast cancer." Mayo Clin Proc **87**(12): 1171-1180.
- Yue, W., J. D. Yager, J. P. Wang, E. R. Jupe and R. J. Santen (2013). "Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis." Steroids **78**(2): 161-170.
- Zapulli, V., L. Peña, R. Rasotto, M. H. Goldschmidt, A. Gama and J. L. Scruggs (2019). Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals Volume 2: Mammary Tumors. Washington, DC, USA, Davis-Thompson DVM Foundation.
- Zheng, H. H., C. T. Du, C. Yu, Y. Z. Zhang, R. L. Huang, X. Y. Tang and G. H. Xie (2022). "Epidemiological Investigation of Canine Mammary Tumors in Mainland China Between 2017 and 2021." Front Vet Sci **9**: 843390.
- Zhu, Y., M. D. Aupperlee, S. Z. Haslam and R. C. Schwartz (2017). "Pubertally Initiated High-Fat Diet Promotes Mammary Tumorigenesis in Obesity-Prone FVB Mice Similarly to Obesity-Resistant BALB/c Mice." Transl Oncol **10**(6): 928-935.
- Zink, M. C., P. Farhody, S. E. Elser, L. D. Ruffini, T. A. Gibbons and R. H. Rieger (2014). "Evaluation of the risk and age of onset of cancer and behavioral disorders in gonadectomized Vizslas." J Am Vet Med Assoc **244**(3): 309-319.

8. Danksagung

Mein erster und aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. h.c. Axel Wehrend für die hervorragende Betreuung. Seine wertvollen Anregungen, sowie das außergewöhnlich schnelle Korrekturlesen haben diese Arbeit maßgeblich vorangetrieben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mentor Herrn Dr. Martin Kessler, der mir nicht nur das Thema vorgeschlagen und mich mit viel Herzblut betreut hat, sondern mir auch in den letzten Jahren eine exzellente onkologische Ausbildung ermöglicht hat. Von der Besprechung der erhobenen Daten, bis hin zur Fertigstellung der Dissertation fand sich jederzeit eine ruhige Minute zum regen Austausch.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Klaus Failing und Frau Marion Sparenberg aus der AG Biomathematik und Datenverarbeitung der JLU Gießen für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung sowie für die ausführliche Beantwortung all meiner Fragen.

Zum Abschluss geht mein größter Dank an meine Familie, die mich mit viel Liebe während der Dissertation begleitet hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

9. Erklärung

Ich erkläre: ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht-veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Arbeit, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Königstein, den 26.12.2022

Julia Gedon



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-7131-8



9 783835 197131 8