

2 Material und Methode

2.1 Klinisches Material

Es wurden im Universitätsklinikum Benjamin Franklin Berlin aus den Jahren 1987-2000 Präparate unterschiedlicher epithelial ovarial-zytologischer Befunde von 221 Patientinnen mit Hilfe eines computergesteuerten Bildanalysegerätes vermessen. Von den 221 Proben entstammten 44 benigne Zystadenome dem Archiv des Universitätsklinikums Benjamin Franklin FU Berlin. Die 53 Borderlinetumoren und 124 malignen Tumoren stammten aus der Gewebebank der GTOC (Gruppe zur Therapie des Ovarialkarzinoms). Die Untersuchung erfolgte am archivierten, paraffineingebetteten Tumormaterial der Ovarien. Verwendet wurde eine Schnittdicke von 8 µm [55][62][118]. Auf einem Mikrotom wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebe unter standardisierten Bedingungen hergestellt. Die einzelnen Schnitte wurden danach mit einem Pinsel vom Messer abgenommen und in ein Wasserbad mit 3-4 Tropfen Eiweißglycerin gegeben.

Die Schnitte wurden 30 Minuten bei 80° im Brutschrank getrocknet. Durch die Hitze denaturiert das Eiweiß und haftet an dem Objektträger. Von jedem in Paraffin eingebetteten Block wurden mehrere gefärbte Hämatoxylin-Eosin Proben und Feulgen-Proben erstellt. Es wurden 15 Schnitte pro Färbekitt gesammelt und mit einem Kontrollobjektträger gefärbt.

2.2 Methode

Für die Messung repräsentative Gewebsareale (region of interest) wurden an der Diskussionsbrücke markiert und anschließend am Bildanalysegerät vermessen. Alle untersuchten Präparate wurden durch einen Gynäkopathologen (K., W.) reevaluiert nach den Kriterien der World Health Organisation ,WHO [114][115] in benigne, borderline und maligne Tumore.

Die malignen Tumore wurden nach dem histopathologischen Grading der UICC (International Union Against Cancer) klassifiziert in:

GX	Differenzierungsgrad nicht beurteilbar
GB	Borderline Malignität
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3-4	schlecht differenziert bis undifferenziert

Dies ist nötig, um den histologischen Typ und Grad des Tumors zu bestätigen und die Interobserver- Abweichung zu minimieren. Hochdifferenzierte Tumore sind niedrigmaligne (Grad 1), wenig- bis undifferenzierte Tumore sind hochmaligne (Grad 3 und Grad 4), und mäßig differenzierte Tumore besitzen einen mittleren Malignitätsgrad (Grad 2). Tumore, deren Dignität nicht als eindeutig maligne oder benigne erkennbar ist, werden als Tumore von Borderline oder Grenzfallmalignität bezeichnet. Es wird von G1 bis G3 differenziert, da die Pathologen G3 und G4 gleichsetzen [40][65][61][100].

Gemessen wurde der relative Anteil der einem Ploidiebereich zugeordneten Zellen an der Gesamtzahl der gemessenen Zellen.

Anmerkung: Es wurden stets die diploiden, tetraploiden, $>5c$ - $<oktoploiden$, oktoploiden, $>9c$ - $<16c$ und $>16c$ Zellen vermessen. Nicht berücksichtigt wurden die hypo- und triploiden Zellen, so dass die Summierung in den Tabellen nicht 100% beträgt.

2.2.1 Feulgen-Färbung

Die histochemische Färbung nach Feulgen und Rosenbeck [46] ist für die DNA spezifisch und erlaubt die photometrische Quantifizierung über die Absorptionsmessung des Reaktionsproduktes. Die Reaktion dient dem selektiven Nachweis von DNA in basophilen Strukturen.

Zur spezifischen Anfärbung der DNA der Zellkerne nach Feulgen wurde der quantitative DNA-Färbe-Kitt der Firma Becton Dickinson Cellular Imaging System

B.V., Leiden, Holland verwendet. Mit einem Färbekitt können jeweils 15 Präparate gefärbt werden. Beim Färben wurden immer die Kontrollobjektträger mitgefärbt, da diese als Standard zur Kalibration eingesetzt wurden. Zur eigentlichen Färbung wurde eine 60 minütige Hydrolyse der Präparate in 5N HCL durchgeführt. Die Salzsäure hydrolysiert die Ribose-Purin-Bindungen in der DNA zu Zucker-Aldehydresten. Die Objektträger wurden nach der Hydrolyse direkt in die neu angesetzte Feulgen-Farblösung gebracht und 60 Minuten inkubiert. Der Farbstoff bindet über die Schiffsche Reaktion an die Aldehydreste, und es kommt dadurch zu einer intensiv Rot-Violetten-Färbung.

Die Reaktion mit der fuchsinschwefeligen Säure beruht auf der Eigenschaft, dass eine mit schwefliger Säure entfärbte Fuchsinlösung mit echten Aldehyden eine rote Farbe entwickelt [30][52][26].

Nach der Färbung wurden die Schnitte für jeweils 30 Sekunden, 5 und 10 Minuten in einer vorbereiteten Waschlösung (hergestellt aus 300 ml 0,05N HCL und dem Spül-Reagenz des Kitt) gewaschen. Die Objektträger wurden für 5 Minuten unter fließendem Aqua dest. gespült, für weitere 5 Minuten in Ethanol/Salzsäure-Lösung gestellt, zweimal für jeweils 3 Minuten in 100%igem Ethanol dehydriert und abschließend 2x3 Minuten lang in Xylol gebracht. Danach konnten die Objektträger eingedeckt werden. Die DNA bildet sich blau ab.

2.2.2 DNA-Image-Zytometrie

Die DNA-Messungen wurden mit einem computergestützten Bildanalysegerät CAS 200 der Firma Becton Dickinson durchgeführt.



Abb. 1 Bildanalyse-System CAS 200

Das System setzt sich zusammen aus:

- einem Reichert Diastar-Standardmikroskop
- einer auf das Mikroskop aufgebauten Charge-Coupled-Device Kamera (CCD) mit einem Spektralbereich von 380 bis 1100 nm
- zwei Farbmonitoren, wovon einer für Grafiken, Systemkontrolle und Menüauswahl verwendet wird, der zweite überträgt das analoge und digitale Videobild
- einem IBM Computer mit 250 MB Festplatte, 8 MB RAM und
- zwei Laufwerken
- einem 8 Bit Analog Digital Converter (ADC)
- einem digitalen Bildspeicher
- einem Softwarepaket
- einem Drucker

Bei der digitalen Bildanalyse werden Bilder (Muster) in Rasterpunkte oder homogene Bildelemente aufgelöst. Dadurch werden die Bilder in eine computergerechte Form gebracht. Die Raster- oder Bildpunkte werden als Pixels (picture elements) bezeichnet [95].

Das mikroskopische Bild wird durch die CCD-Kamera auf den Monitor übertragen. Dabei erzeugt es ein zur Lichtintensität proportionales Spannungssignal und ist so eingestellt, dass 800 mV Licht und 40 mV kein Licht bzw. Schwarz darstellen. Ein 8-Bit-ADC wandelt dieses Spannungssignal in 256 Grauwertstufen um. Schwarz wird bei einer Intensität von 1 (40 mV) und Weiß bei einer Intensität von 240 (800 mV) dargestellt. Die gemessenen Intensitätswerte werden in einen digitalen Bildspeicher transferiert und als Pixel (Bildelemente) auf den Bildschirm übertragen. Die Pixel des resultierenden Digitalbildes geben die Lichtintensitätswerte wieder. Mit einem gegebenen Lichtniveau als Referenz kann so in Abhängigkeit vom Lambert-Beer'schen Absorptionsgesetz (Abb.2.) die optische Dichte für jedes Pixel berechnet werden (Abb.3). Da die Feulgen-Färbung zur spezifischen Darstellung der Zellkern-DNA führt, kann durch Messung der optischen Dichte eines solchen Kerns der DNA-Gehalt errechnet werden.

$$I = I_0 e^{-\mu s}$$

I = Lichtintensität
I₀ = Lichtintensität vor Eintritt in
den Absorber
μ = Extinktionskonstante
s = im Absorber zurückgelegter
Weg der Strahlung

Abb. 2 Lambert-Beer'sches Absorptionsgesetz

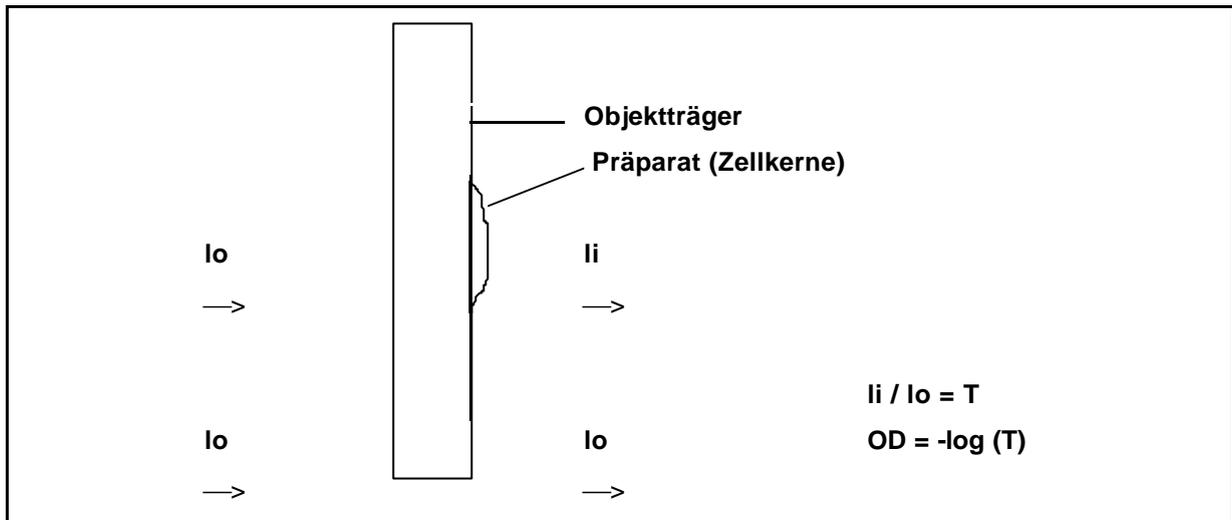


Abb. 3 Beziehung zwischen einfallendem Licht (I_0), transmittiertem Licht (I_i) und optischer Dichte in der Mikrodensitometrie. T ist das Verhältnis von transmittiertem Licht zu einfallendem Licht, die optische Dichte (OD) ist definiert als negativer Logarithmus dieses Verhältnisses, Unverricht [129].

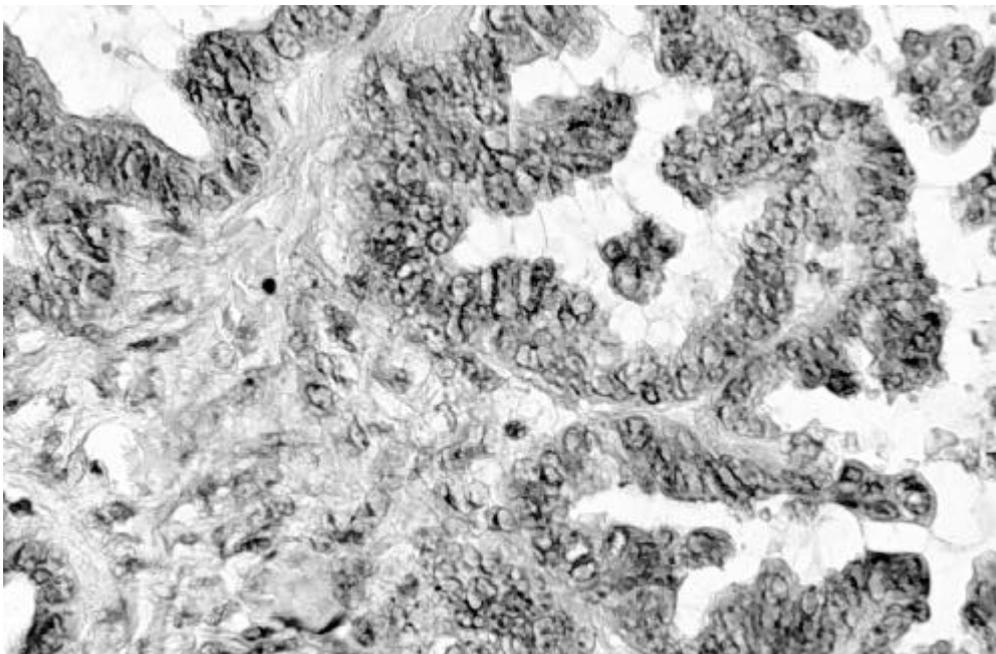


Abb. 4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Seröser Borderlinetumor

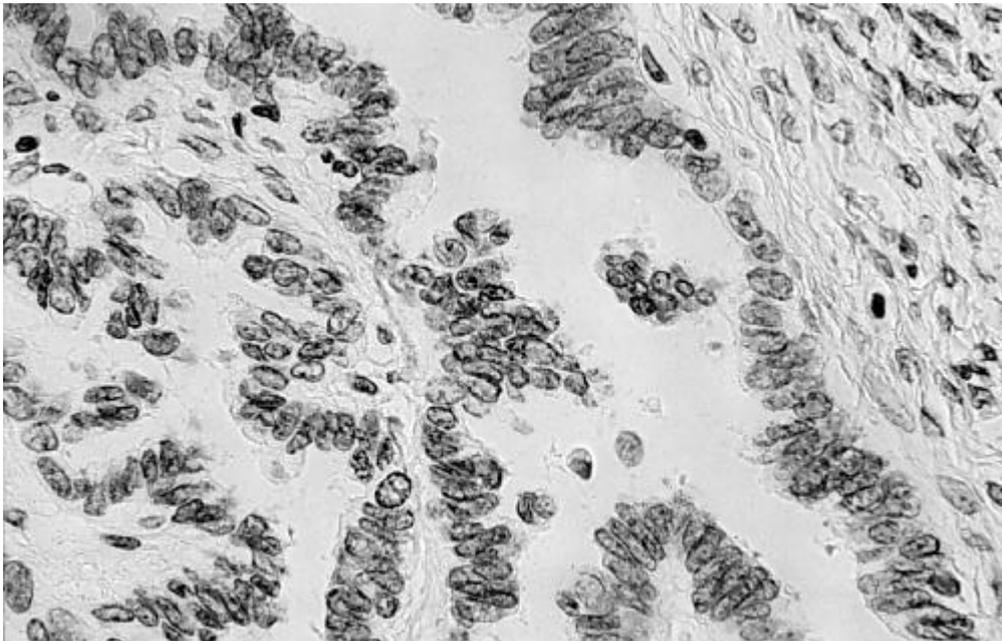


Abb. 5 Feulgen-Färbung: Seröser Borderlinetumor

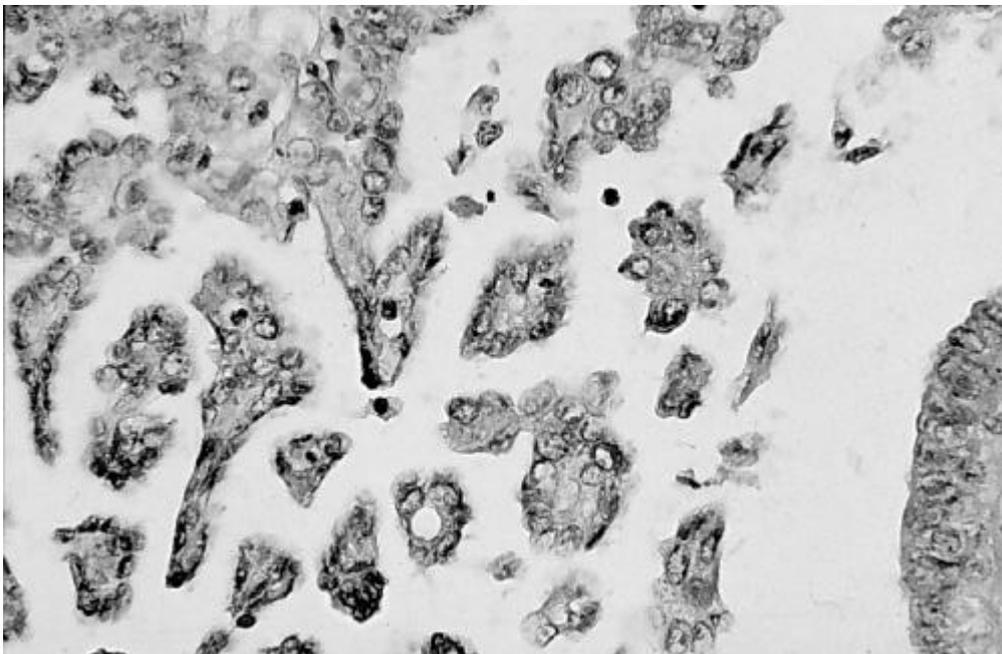


Abb. 6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Seröses G1 Karzinom

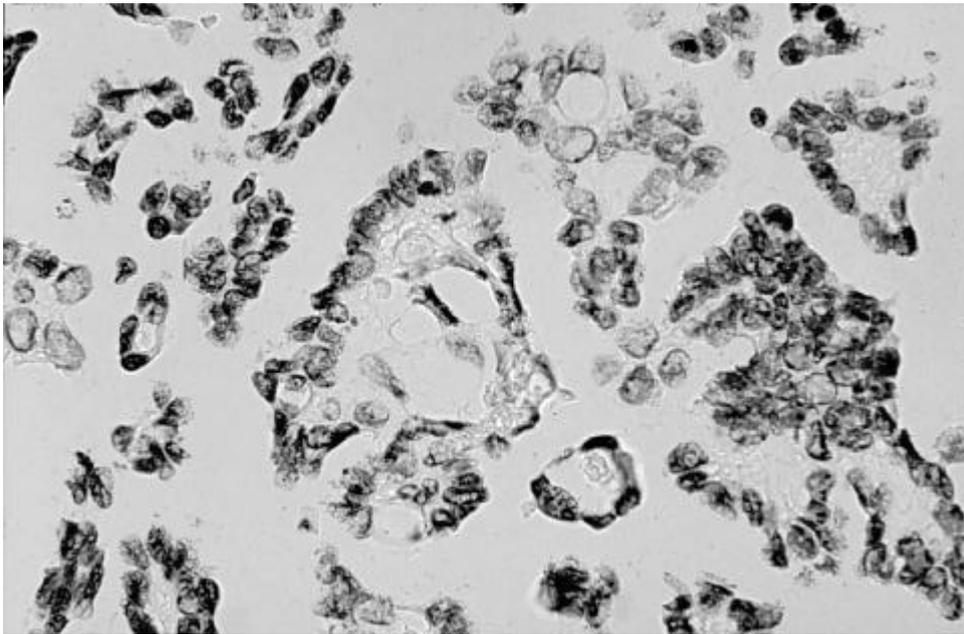


Abb. 7 Feulgen-Färbung: Seröses G1 Karzinom



Abb. 8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Seröses G3 Karzinom

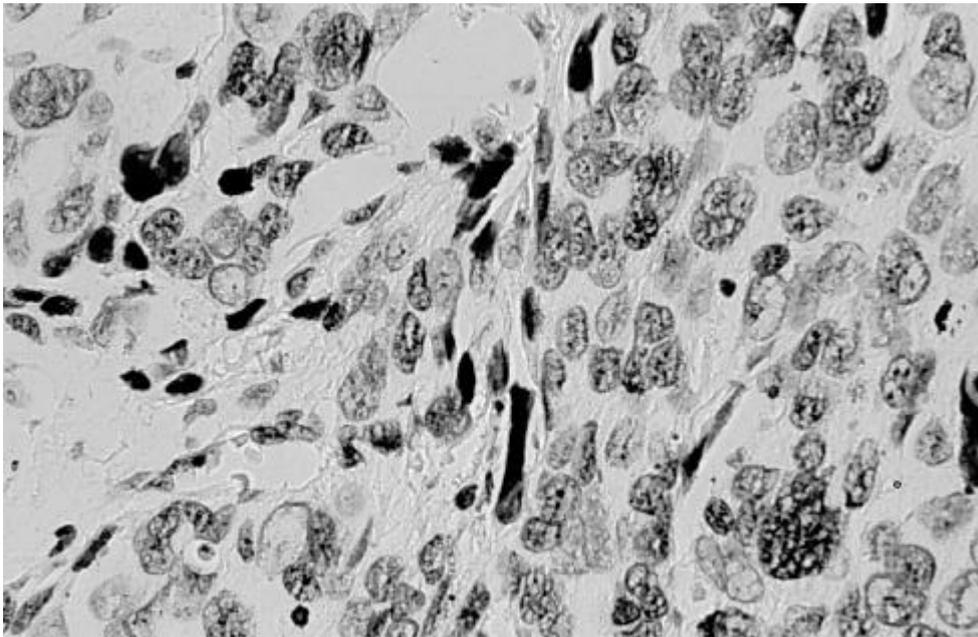


Abb. 9 Feulgen-Färbung: Seröses G3 Karzinom

2.3 Karyometrie

Sie dient der Bestimmung des DNA-Gehaltes. Durch Aktivierung eines „Cell measurement program“ können im gleichen Arbeitsvorgang parallel zur DNA-Zytometrie Kernparameter wie die Kernfläche, der Formfaktor, optische Dichte, Chromatinstruktur „blobness“ und Entropie bestimmt werden.

2.4 Messvorgang und Qualitätsprüfung

Vor dem Messvorgang wird das Mikroskop nach dem Köhlerschen Beleuchtungsprinzip justiert. Die Einstellung des Lichts wird an einem leeren, d.h. zell- und artefaktfreien Feld durchgeführt. Es wird für die DNA-Messungen nur das 40x Objektiv verwendet. Das System muss vor jeder Analyse neu kalibriert werden. Für die Eichung werden tetraploide Rattenhepatozyten mit einem DNA-Gehalt von 6,56 Pikogramm pro Zellkern verwendet. Davon müssen mindestens 20 vermessen

werden. Jedem Färbekitt liegt ein Objektträger mit Rattenhepatozyten bei, und er durchläuft dieselbe Färbung wie die 15 Präparate.

Nach der Kalibrierung wird an dem nach Feulgen gefärbten Präparat eine Überprüfung des Lichts und gegebenenfalls eine erneute Lichteinstellung durchgeführt, um Messfehler, die durch unterschiedliche Dicke der Objektträger entstehen können, zu vermeiden. Der Schwellenwert, der die Grenze zwischen dem Grauwert Hintergrund und dem Grauwert Objekt festlegt, wird automatisch berechnet, kann aber auch interaktiv vom Untersucher festgelegt werden. Um relevante Zellkerne aufzusuchen, wird das gesamte Hämatoxylin-Eosin-Schnittpräparat mit einem Mikroskop mäanderförmig durchgemustert. Die Zellen werden nach dem höchsten Proliferationsgrad ausgesucht und die Bezirke entsprechend der Vorgaben der Standardlehrbücher der gynäkologischen Morphologie markiert. Danach werden die gegengefärbten Feulgenschnitte mit ihren auffälligen Zellkernen nach entsprechender Funktionsauswahl aus der Menüleiste des Computerprogramms auf dem Monitor „eingefroren“. Mit Hilfe eines zuvor erstellten Filters, der eine Einteilung nach Kerngröße, Form, DNA-Gehalt und optischer Dichte vornimmt, werden die Kerne in verschiedene Klassen eingeteilt. Es werden die Tumorzellen in Bildausschnitten mit dem auffälligsten Atypiegrad zur Vermessung herangezogen. Da in manchen Schnitten mehrere „regions of interest“ zu finden sind, werden diese nach Markierung und Nummerierung nach dem Schweregrad der Auffälligkeit vermessen. Nach Möglichkeit werden pro Fall 250 auffällige Kerne analysiert. Die meisten Autoren fordern mindestens 100-300 gemessene Zellen. Wir orientierten uns hier an der Mehrzahl der Autoren [51][58][88][108][118]. An 36 Tumoren war es aufgrund zu geringer Tumorgöße nicht möglich, 250 Zellen pro Fall zytometrisch zu vermessen. In einem Fall wurden bei einem serösen Borderlinetumor mehr als 250 Zellen vermessen, da an der Diskussionsbrücke eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung auffällig war, hingegen die Feulgen-Färbung am Bildanalysegerät die Grauwertstufen wesentlich heller darstellte.

Da sich epitheliale Tumore meist in Epithelverbänden präsentieren, konnten nicht immer überlagerte Kerne, Fibrozyten oder Artefakte sicher ausgeschlossen werden.

Die ermittelten Messdaten wurden in Form eines Histogramms auf dem Computermonitor dargestellt, auf Diskette gespeichert und gedruckt.

Zur Qualitätsprüfung unseres CAS-Bildanalyse-Systems haben wir an einem europaweiten Kontrollprogramm der Firma Becton-Dickinson teilgenommen. Dazu wurden von Becton-Dickinson vorgefärbte Kontrollobjektträger analysiert. Es wurden die optische Dichte und der DNA-Gehalt einer Zellpopulation der G0/G1-Phase analysiert. Die Messungen unseres Labors lagen im Referenzbereich.

2.5 Interpretation der Image-Analyse

Die Image-Zytometrie ermöglicht es dem Untersucher, die gemessenen Zellen morphologisch zu beurteilen und durch Messung der Gesamtmenge der DNA eine genetische Malignitätsgradierung vorzunehmen. Das DNA-Histogramm stellt eine Häufigkeitsverteilung der optischen Dichte speziell angefärbter Zellkerne dar. Die Einheit, in der gemessen wird, ist c (c = einem einfachen Chromosomensatz entsprechender DNA-Gehalt).

Bei der Histogrammanalyse erlaubt die Stammlinieninterpretation und die Einzelzellinterpretation das Feststellen von Aneuploidie. DNA-Aneuploidie kann als quantitatives zytometrisches Äquivalent chromosomaler Aneuploidie gelten Böcking [19]. Der DNA-Gehalt einer diploiden menschlichen Zelle ist festgelegt auf 7,18 Pikogramm ($1 \text{ pg} = 1 \times 10^{-12} \text{ g}$) entsprechend $2c$. Der DNA-Index (DI) beträgt 1. Eine tetraploide Zelle ($4c$) hat daher einen DNA-Gehalt von 14,36 pg und einen DI von 2. Als sicher aneuploid gelten Zellen, deren DNA-Gehalt höher als $5c$ (17,95 pg) ist und nicht im Bereich ganzzahliger Potenzen von $2c \pm 12,5\%$ (z.B. $8c \pm 1c$, $16c \pm 2c$) liegt Böcking 1990 [18]. Wie bei allen Methoden, bei denen DNA-Analysen durchgeführt werden, umfasst die Fraktion nicht-diploider Zellen proliferierende Zellen mit normalem Chromosomensatz und Zellen mit chromosomalen Abweichungen Auer et al. [3]. Ein DNA Gehalt $>5c$ ist diagnostisch relevant Böcking et al. 1984 [17]. Mit einem von ihm entwickelten Algorithmus wurden zwei Parameter von den Einzelzell DNA-Werten errechnet: die 5c exceeding-rate (5cER) und der 2c Deviation Index (2cDI). Als 5c exceeding-rate wird der prozentuale Anteil der Zellen mit einer DNA-Menge von mehr als $5c$ (17,95 pg), als 9c-exceeding-rate von mehr als 32,31 pg

(hochaneuploide Zellen) gewertet Wiesener et al. [131][19]. Zellkerne, deren DNA-Gehalt $>5c$ entspricht, aber $<8c$, werden als niedrig aneuploid definiert. Die 5c exceeding kann aus den jeweiligen Histogrammen errechnet werden. Sie stellt den Anteil niedrig aneuploider Zellen, der 8c exceeding und der 9c exceeding rate. Die 5c- und 9c- exceeding event bezeichnet den absoluten Anteil der vermessenen Zellen, nicht den relativen.

Zellen, deren DNA-Menge zwischen 2c und 4c liegt, werden nicht als aneuploid gewertet, da nicht auszuschließen ist, dass es sich hierbei um euploide Zellen in der S-Phase handelt. Da durch euploide Polyploidisierung Zellen mit ganzzahligen Potenzen von 2c (4c, 8c, 16c, 32c, usw.) entstehen können, werden Kerne, die in diesen Bereichen gefunden werden, ebenfalls nicht als aneuploid bewertet.

Messgrößen für folgende Zellen:

- DNA-Gehalt:
- 1c = 3,59pg,
- 2c = diploid = 7,18pg
- 4c = tetraploid = 14,36pg
- $>5c < 8c$ = 17,95pg = niedrig aneuploid
- 8c = oktaploid = 28,72pg
- $>9c < 16c$ = 32,31pg = hoch aneuploid
- $>16c$ = 57,44pg

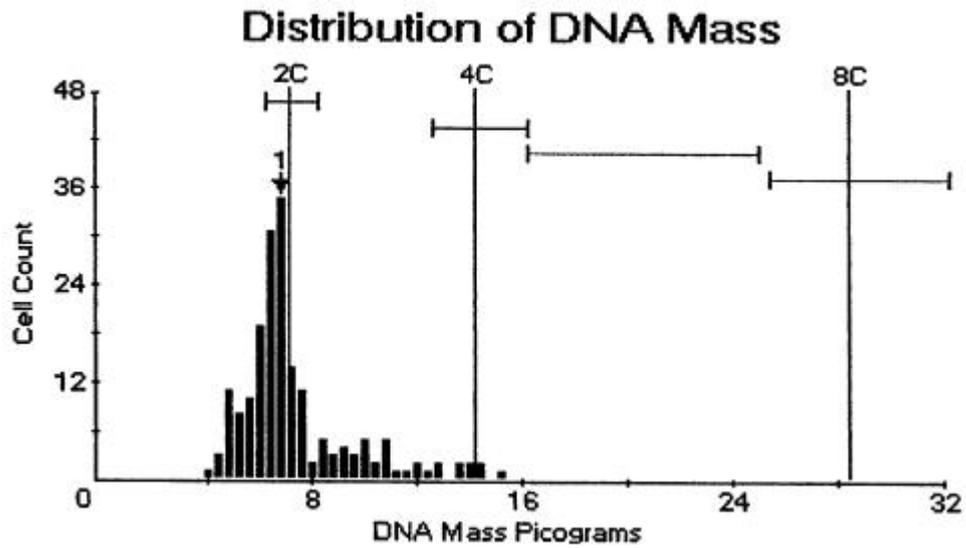


Abb.10 DNA-Histogramm eines serös benignen Tumors. 186 gemessene Zellen, Zellanteil: diploid:95; tetraploid:10; >5c-<oktoploid:0,0; oktoploid:0,0. Hypo- und triploide Zellen sind nicht berücksichtigt.

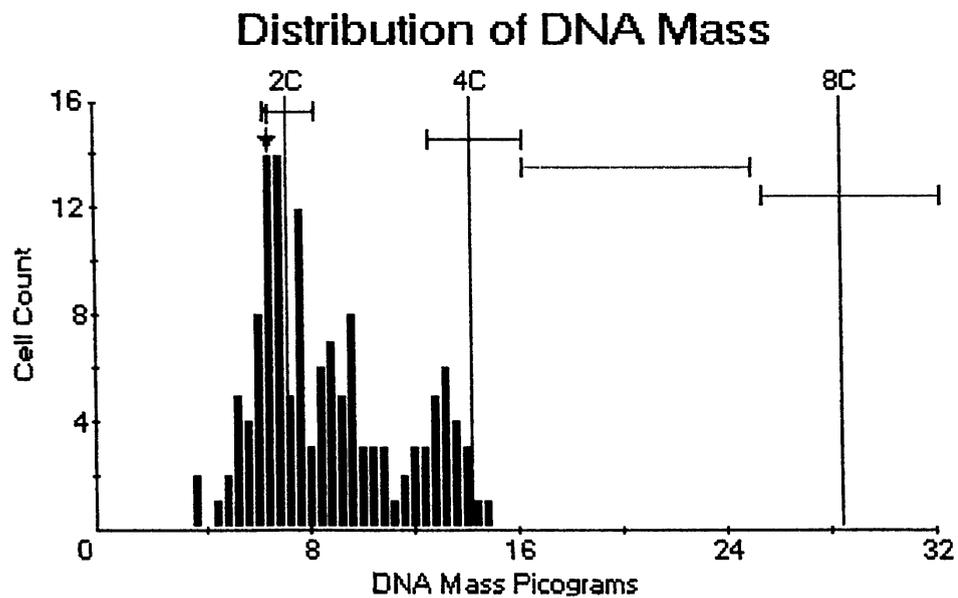


Abb.11 DNA-Histogramm eines serösen Borderlinetumors, ohne aneuploide Zellen. 134 gemessene Zellen, Zellanteil: diploid:50; tetraploid:21; >5c-<oktoploid:0,0; oktoploid:0,0. Hypo- und triploide Zellen sind nicht berücksichtigt.

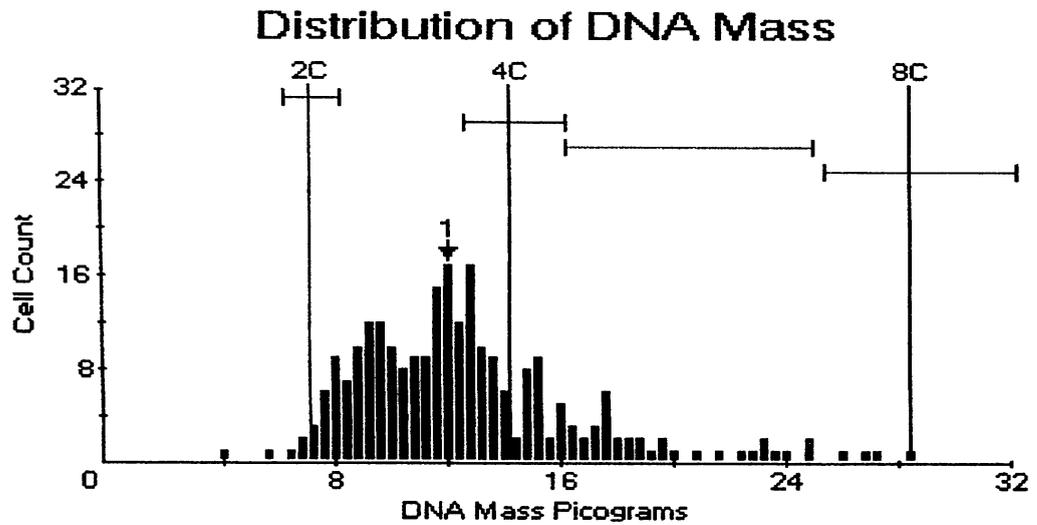


Abb.12 DNA-Histogramm eines serösen Borderlinetumors mit aneuploiden Zellen. 250 gemessene Zellen, Zellanteil: diploid:16; tetraploid:73; >5c-<oktoploid:34; oktoploid:4. Hypo- und triploide Zellen sind nicht berücksichtigt.

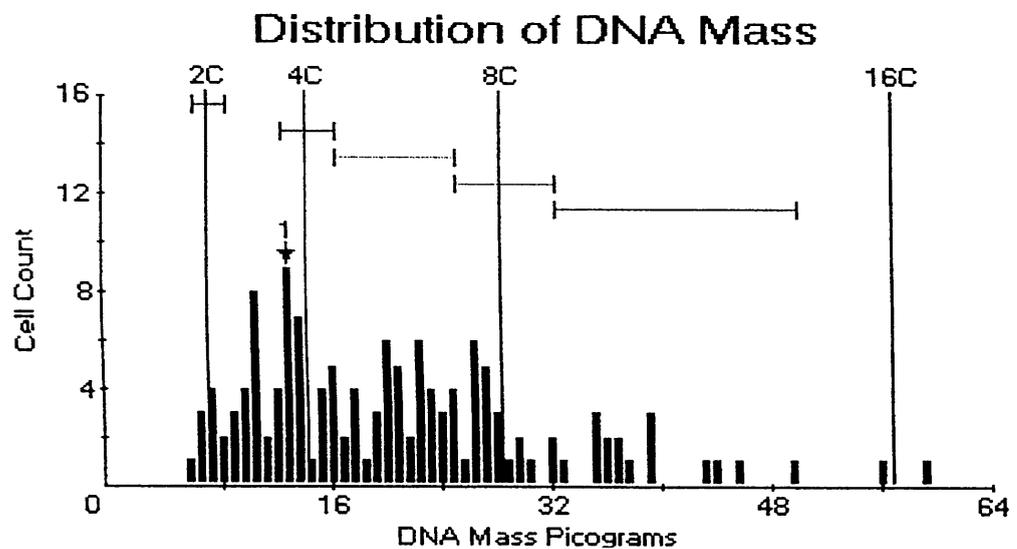


Abb.13 DNA-Histogramm eines G3 Karzinoms. 136 gemessene Zellen, Zellanteil: diploid:7; tetraploid:25; >5c-<oktoploid:41; oktoploid:21 >9c-<16c:17; >16c:0,0. Hypo- und triploide Zellen sind nicht berücksichtigt.

2.6 Statistische Analyse

Sämtliche statistischen Datenanalysen sowie die Erstellung der Grafiken wurden mit SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) für Windows Version 8 durchgeführt. Da die Normalverteilung für die DNA Profile der drei Tumortypen nicht gegeben war, wurden als deskriptive Statistiken der Median, Interquartilbereich = IQ (25-75%), sowie Minimum und Maximum berechnet. Zur graphischen Darstellung wurden Boxplots erstellt.

Zur Überprüfung der Gruppenunterschiede auf Signifikanz wurde im Fall von drei Gruppen **der Kruskal-Wallis-Test** gerechnet.

Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der **Mann Whitney-U-Test** verwendet. Der **Chi-Quadrat-Test** wurde zusätzlich gerechnet, um seröse von muzinösen Borderlinetumoren zu unterscheiden. Die Signifikanz wurde aufgrund zu geringer Zellbesetzung ($>9c < 16c$ Zellen) im **exakten Test nach Fisher** berechnet [60][110].

Für ausgewählte Vergleiche der Ovarialtumore unterschiedlicher Dignität und Malignitätsgrade wurden **Diskriminanzanalysen** gerechnet. Die Diskriminanzanalyse ist ein Verfahren, das aufgrund der linearen Gewichtung eines Satzes abhängiger Variablen zu einer maximalen Trennung der untersuchten Gruppen führt [22][36]. Ziel ist die Erzeugung einer neuen Variable (d), in der sich die bereits bestehenden Gruppen (z.B. Zystadenome versus Karzinome) im Mittelwert maximal unterscheiden. Die Absicht hierbei ist einen hohen Grad an Übereinstimmung richtig klassifizierter Tumoren zu erzielen.

Für sämtliche Analysen wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgesetzt. Bei der Beschreibung der Ergebnisse wurden darüber hinaus auch hoch signifikante Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von ($p=0,01$) beschrieben.

Liegt das Signifikanzniveau im Bereich von 5% bis 10% ($p>0,05$ bis $p=0,10$), wird der gefundene Unterschied bzw. Zusammenhang im Sinne eines Trends interpretiert [25][94].