

5.3 Druckmessung

Die Untersuchung der Druckverhältnisse im Tumor wurde mit Hilfe der Wick-in-needle Technik an 18 Tieren durchgeführt. Die erste Messung wurde an der breitesten Stelle des Tumors durchgeführt, die zweite Messung in geringem Abstand zu dieser Position und zeitlich direkt nach Abschluss der ersten Messung. In der Abbildung sind aus Gründen der Übersichtlichkeit die Messungen der Positionen 1 bis 15 Millimeter wiedergegeben. Die Position 0 mm kennzeichnet den Startpunkt der Messung, die seitliche Öffnung der Kanüle hat sicher die Haut durchdrungen und ist von außen nicht mehr zu sehen. Der Druckwert ist hier gleich Null, alle weiteren Messungen sind in der Differenz zu diesem Wert angegeben. Im Zuge der Messung wurde die Kanüle fortschreitend Millimeter für Millimeter in die Tiefe des Tumors bewegt.

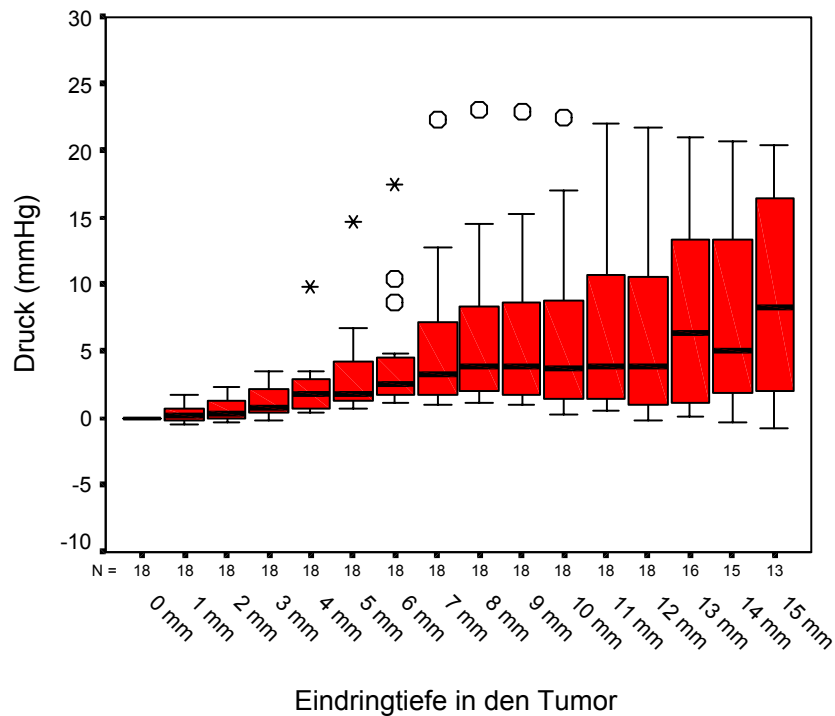


Abbildung 28: Druckmessung 1: Druckwerte im Tumor.

In dem verwendeten Tumor aus der Zelllinie CC351 konnten mit der Wick-in-needle Technik erhöhte Druckwerte aufgezeichnet werden. Die gemessenen Werte verhalten sich nach einem bestimmten Muster. Vom Startpunkt 0 mm aus steigen die Werte bis zum Messpunkt 8 mm kontinuierlich an. Von dort an bewegen sie sich plateauförmig auf einem Druckniveau. Dieses Muster ist besonders deutlich zu erkennen, indem die relativen Effekte betrachtet werden.

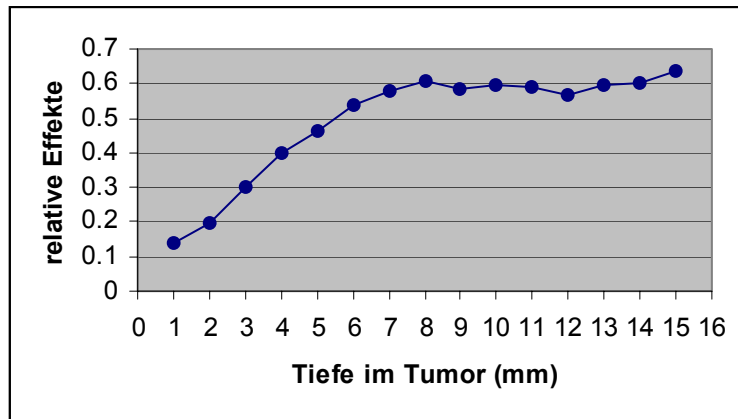


Abbildung 29: Druckmessung 1: Relative Effekte, ermittelt aus den gemessenen Druckwerten.

Am Messpunkt 9 mm, der in der Plateauphase liegt, befindet sich der Median der gemessenen Druckwerte bei 3,9 mmHg. Als Maximalwert wurden hier an einem Tier 22,9 mmHg aufgezeichnet. Der Anstieg im Messbereich 1 mm bis 8 mm weist im Test mittels nichtparametrischer Varianzanalyse statistische Signifikanz auf ($p < 0,01$). Die Werte der Plateauphase unterscheiden sich vom Startpunkt nach dem Wilcoxon-Test signifikant ($p < 0,01$).

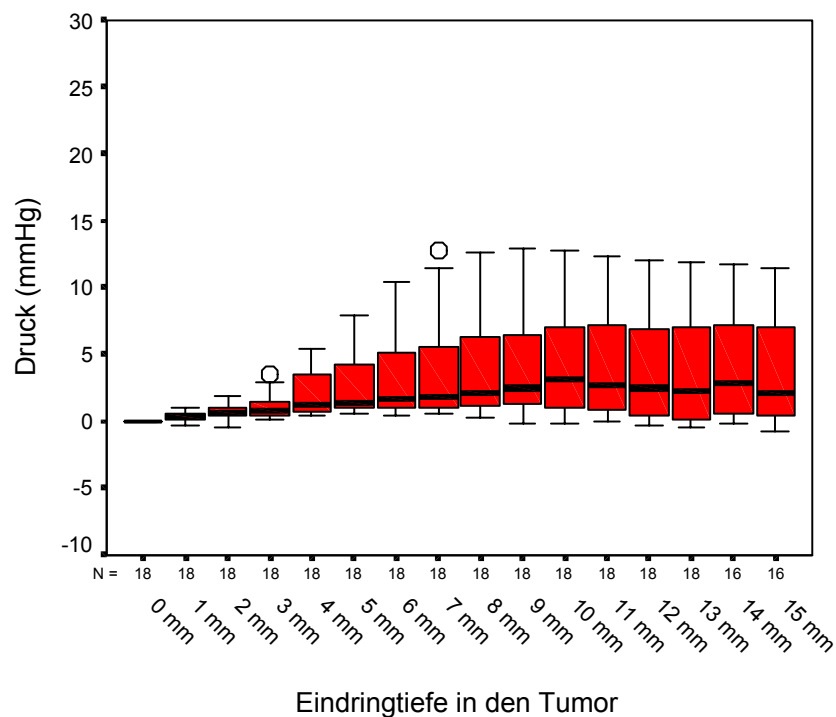


Abbildung 30: Druckmessung 2: Druckwerte im Tumor.

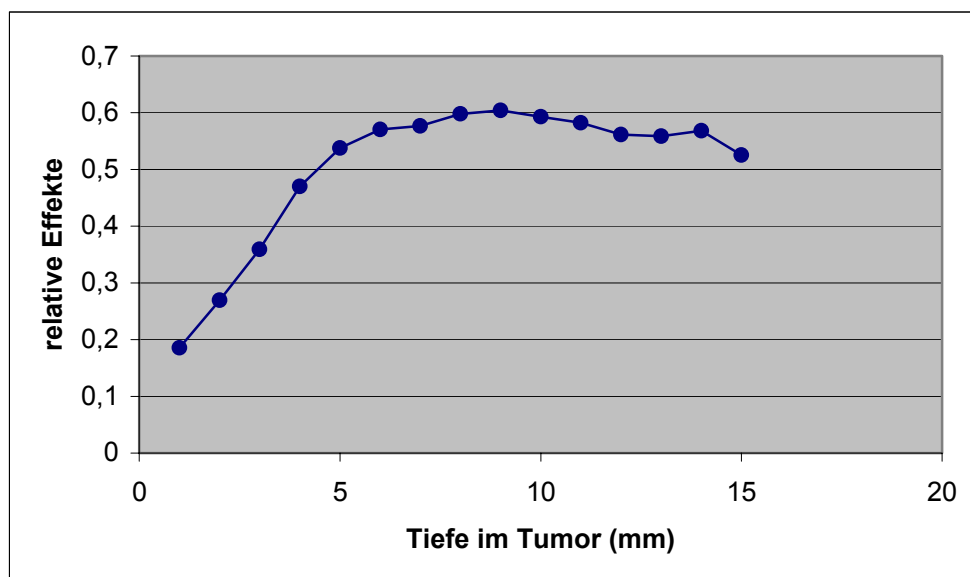


Abbildung 31: Druckmessung 2: Relative Effekte, ermittelt aus den gemessenen Druckwerten.

Das Profil der Ergebnisse der zweiten Messung entspricht dem der ersten Untersuchung. Die gemessenen Werte liegen hier grundsätzlich unter den zuerst registrierten Werten. Der Median am Messpunkt 9, also in der Plateauphase, liegt bei 2,5 mmHg. Der hier gemessene Maximalwert liegt bei 12,9 mmHg. Die Steigung im Bereich der Messwerte 1 mm bis 8 mm stellt sich im Test mittels nichtparametrischer Varianzanalyse signifikant dar ($p < 0,01$). Die Werte der Plateauphase lassen sich nach dem Wilcoxon-Test signifikant ($p < 0,01$) von denen des Startpunktes unterscheiden.

Bis zum Messpunkt 5 mm unterscheiden sich die Wertepaare der vergleichbaren Messpunkte (Messpunkt 1 mm Druck 1 und Messpunkt 1 mm Druck 2 etc.) zwischen den Messungen nach dem Wilcoxon-Test nicht signifikant. Die folgenden Wertepaare der Messpunkte 6 mm bis 15 mm und hier vor allen Dingen die Paare der Messpunkte 8 bis 15 mm in der Plateauphase unterscheiden sich voneinander nach dem Wilcoxon-Test signifikant ($p < 0,05$).

Für beide Messungen wurde durchschnittlich eine Zeit von 90 Minuten benötigt, was in etwa der Narkosedauer entspricht.

5.4 Histologische Untersuchung

5.4.1 Auswertung der Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung

Das Tumorgewebe kann in drei Gewebезonen eingeteilt werden, die sich histologisch deutlich unterscheiden lassen.

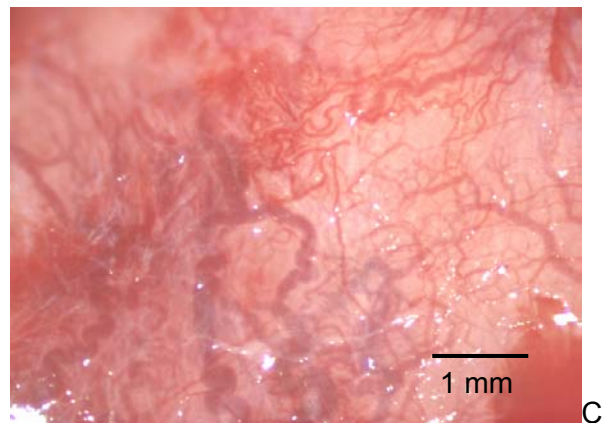
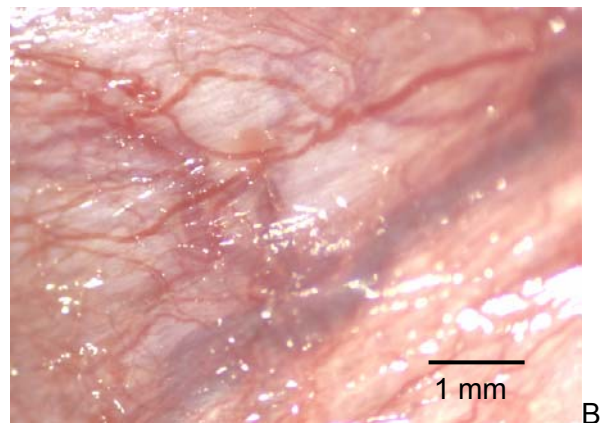
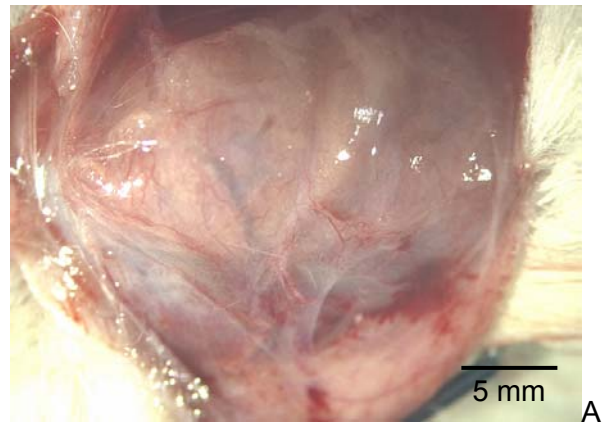
- **Kapsel**

Als Tumorkapsel wurde das Gewebe definiert, welches sich nach außen an das solide Tumorgewebe anschließt. Hierbei dominieren entsprechend des Wachstumsortes des Tumors die Merkmale des subkutanen Bindegewebes. Physiologischerweise sind in der Subkutis Bindegewebszellen sowie Stränge von locker angeordneten Bindegewebsfasern anzutreffen, diese fanden sich auch hier zu. Zwischen den Bindegewebsstrukturen sind reichlich Fettzellen eingelagert. Das Gewebe ist leicht ödematös. An einigen Präparaten ziehen bindegewebige Stränge mitsamt Gefäßstrukturen in das vitale Tumorgewebe. Im Unterschied zum gesunden Gewebe sind viele mononukleäre Entzündungszellen anzutreffen, die einen regelrechten Wall am Übergang zum vitalen Tumorgewebe bilden. Außerdem finden sich hier einzelne Tumorzellen und wenige Tumorzellanhäufungen. Der hervorstechendste Unterschied zum gesunden Unterhautgewebe ist jedoch die Art der Vaskularisation. In der Tumorkapsel finden sich extrem viele Gefäße, vornehmlich Kapillaren aber auch Arteriolen und Venolen, welche massiv dilatiert sind und sinusoidartige Strukturen bilden. An einigen Kapillaren ist der Einbruch von Tumorzellen in das Lumen zu erkennen. In sehr großen Kapselgefäßen sind hin und wieder bereits in Organisation befindliche Thromben aufzufinden.

Abbildung 32: Intravitalmesoskopische Aufnahmen des Tumors nach Ablösen der Haut.

A: Blick auf die Tumorkapsel.

B, C: Vaskularisation in der Kapsel in der Nahaufnahme.



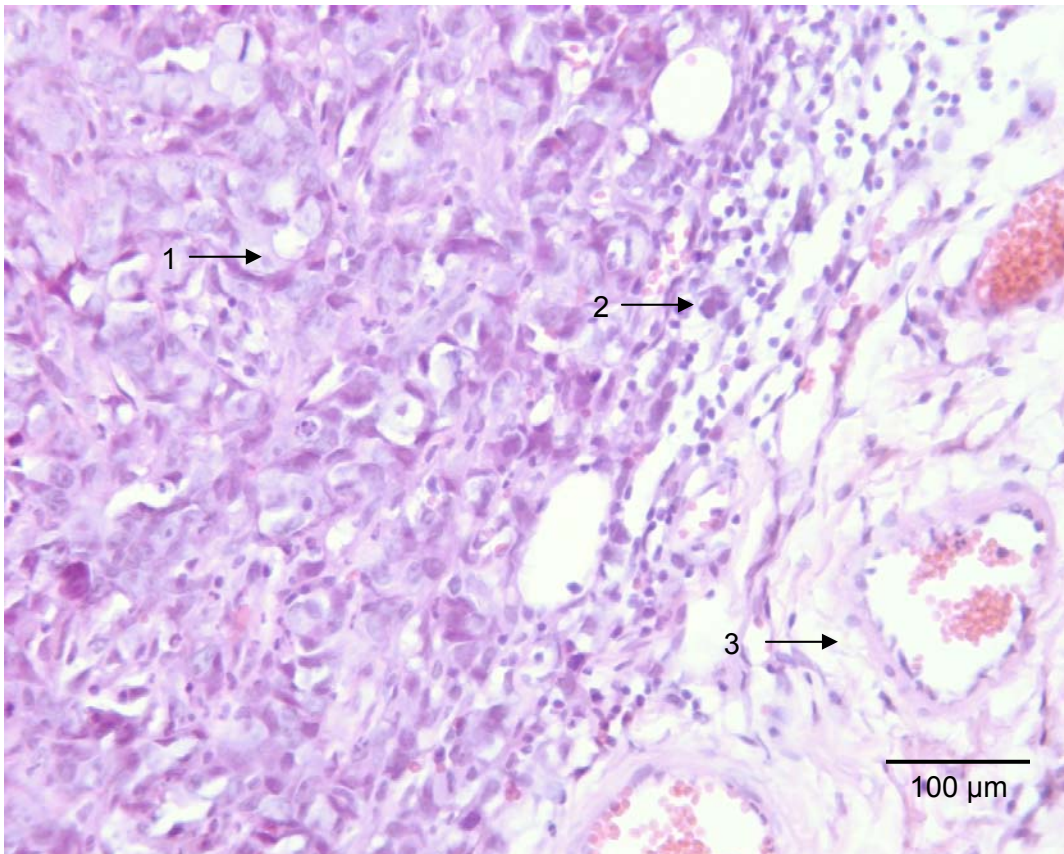


Abbildung 33: Tumorkapsel am Übergang zum Vitalgewebe.

1 vitales Tumorgewebe. 2 Am Übergang zur Kapsel wallartige Anhäufung von mononukleären Entzündungszellen. 3 Das Kapselgewebe zeigt deutliche Gefäßzeichnung und trägt Merkmale des subkutanen Ursprungsgewebes. HE-Färbung.

- **Vitalgewebe**

In diesem Bereich des soliden Tumors wird der Hauptanteil des Gewebes von den malignen Colocarzinomzellen gebildet. Diese liegen in Haufen oder sind entsprechend des Muttergewebes in drüsenartiger Struktur angeordnet. Die Tumorzellen besitzen große Zellkerne, in denen meist deutlich der eosinophile Nukleolus und basophiles Euchromatin zu erkennen ist. Der massige Cytoplasmaleib stellt sich leicht eosinophil dar. Das Kern-Plasma-Verhältnis ist im Vergleich zu gesundem Colongewebe zugunsten des Kerns verschoben. Die Tumorzellen waren unterschiedlich groß, Riesenzellen und Nucleolenvergrößerungen waren aufzufinden. Im Vitalgewebe des Tumors sind außerdem bindegewebige Strukturen zu erkennen, auch Fettzellen sind dort und zwischen den Tumorzellen anzutreffen. Es finden sich kleine Areale, in welchen die Gewebestrukturen nekrotisch zugrunde gegangen sind. Die Vaskularisation ist im Gegensatz zum Kapselbereich sehr unauffällig. An einigen Stellen sind aufgrund von Anhäufungen von Erythrozyten Einblutungen zu identifizieren. Das

Erkennen von vaskulären Strukturen in der HE-Färbung ist wesentlich erschwert, da sie meist kollabiert sind. Die Beurteilung der Vaskularisation muss anhand von glykohistochemisch bearbeiteten Präparaten erfolgen, in denen die Gefäße deutlich zu identifizieren sind.

- Mitotische Aktivität

Bei der Auszählung der in Teilung befindlichen Tumorzellen wurden pro Sichtfeld im Median 2,5 der betreffenden Zellen entdeckt.

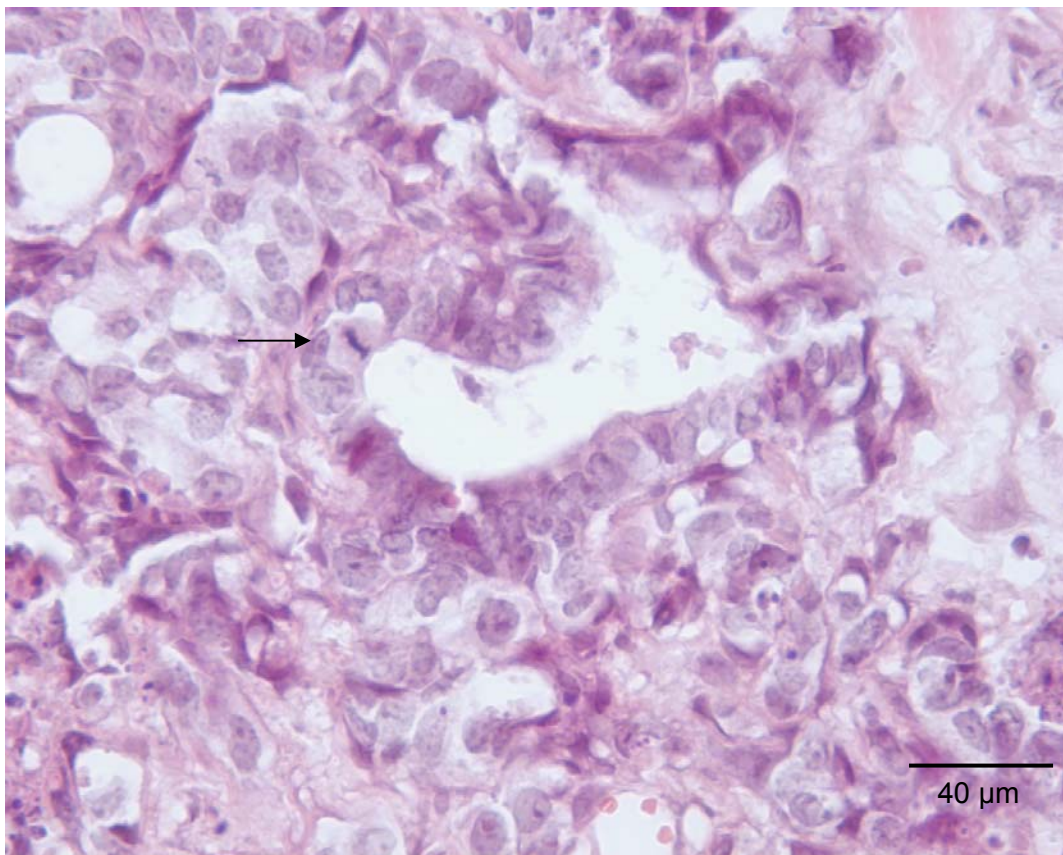


Abbildung 36: Vitales Tumorgewebe mit Mitosefiguren. Anordnung der Tumorzellen in drüsenartiger Struktur oder Zellhaufen. HE-Färbung.

- **Nekrose**

Die Nekrosezone befindet sich hauptsächlich zentral im Tumor. Sie ist unscharf vom Vitalgewebe abgegrenzt und bildet einige Ausläufer in das Vitalgewebe. In der Nekrosezone finden sich bis auf einige kleine Inseln vitaler Strukturen fast ausschließlich abgestorbene Zellen und Bindegewebsreste. In diesen Feldern sind Seen von Erythrozyten aufzufinden, die zum Teil im Zerfall begriffen sind. Die Gefäßstrukturen sind in dieser Färbung nicht zu erkennen.

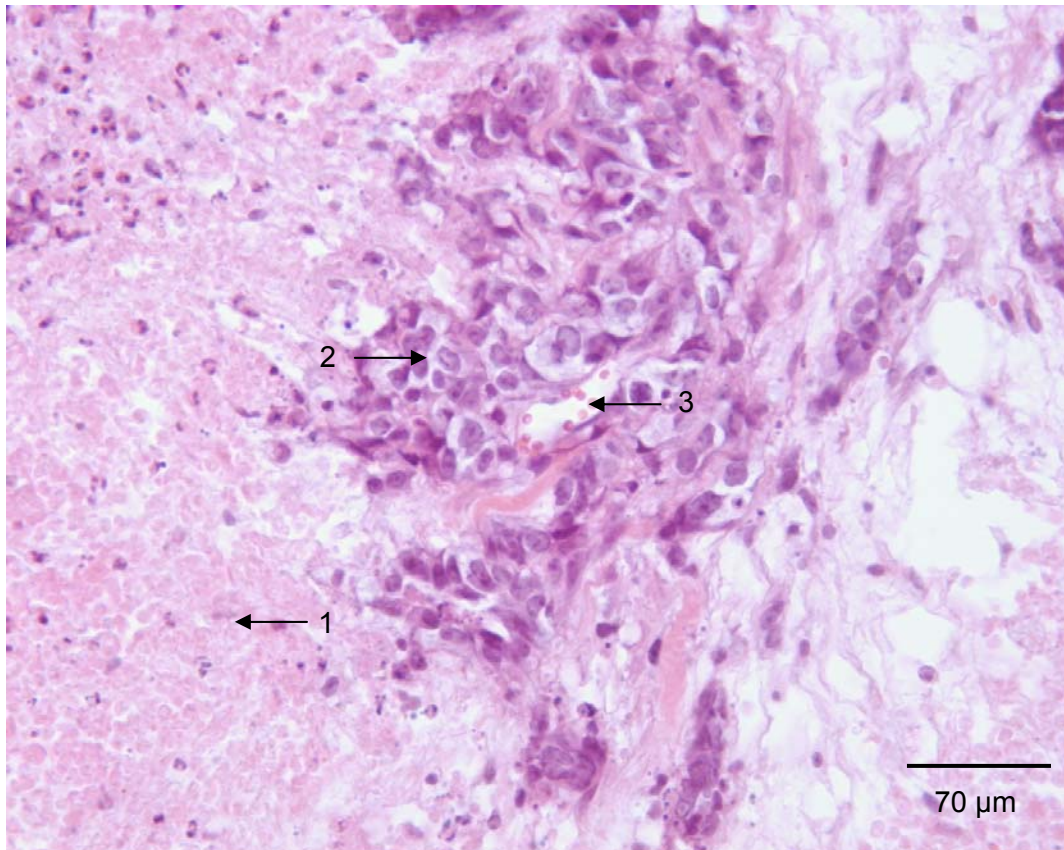


Abbildung 37: Nekrose im Tumorzentrum (1) mit einer Insel vitaler sowie in Degeneration befindlicher Zellen (2) und Blutgefäß (3). HE-Färbung.

5.4.2 Auswertung der Turnbull-Blau (TB)-Färbung

Durch diese Färbung wird das Eisen im Tumor markiert. In diesem Gewebe ist kein Eisen zu erwarten, daher handelt es sich bei dem nachgewiesenen Eisen um Rückstände des 48 h zuvor applizierten eisenhaltigen Kontrastmittels VSOP-C184. Für diese Darstellung wurden die relativen Flächenanteile des Eisens verwendet.

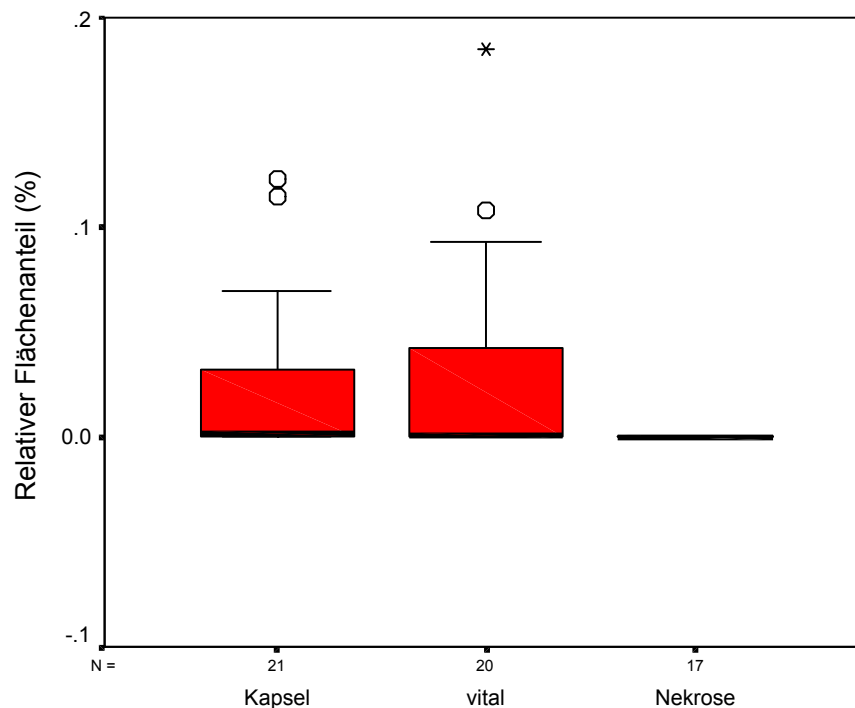


Abbildung 38: Flächenanteil des Eisens (%) in den Tumorzonen.

In der Kapsel lag der relative Flächenanteil des registrierten Eisens im Median bei $2,2 \cdot 10^{-3}$ %, im Vitalgewebe bei $6,5 \cdot 10^{-4}$ %. Bei der Untersuchung der Präparate konnte in der Nekrosezone kein Eisen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Messung im Kapselbereich und in der Vitalzone unterscheiden sich jeweils von der Messung im Nekrosebereich nach dem Wilcoxon-Test signifikant ($p < 0,05$), die Messungen in Kapsel und Vitalzone unterscheiden sich nach diesem Test nicht signifikant.

Die blau angefärbten Eisenpartikel fanden sich nur in unmittelbarer Nähe von Gefäßstrukturen und liegen zum Teil in phagozytierter Form vor.

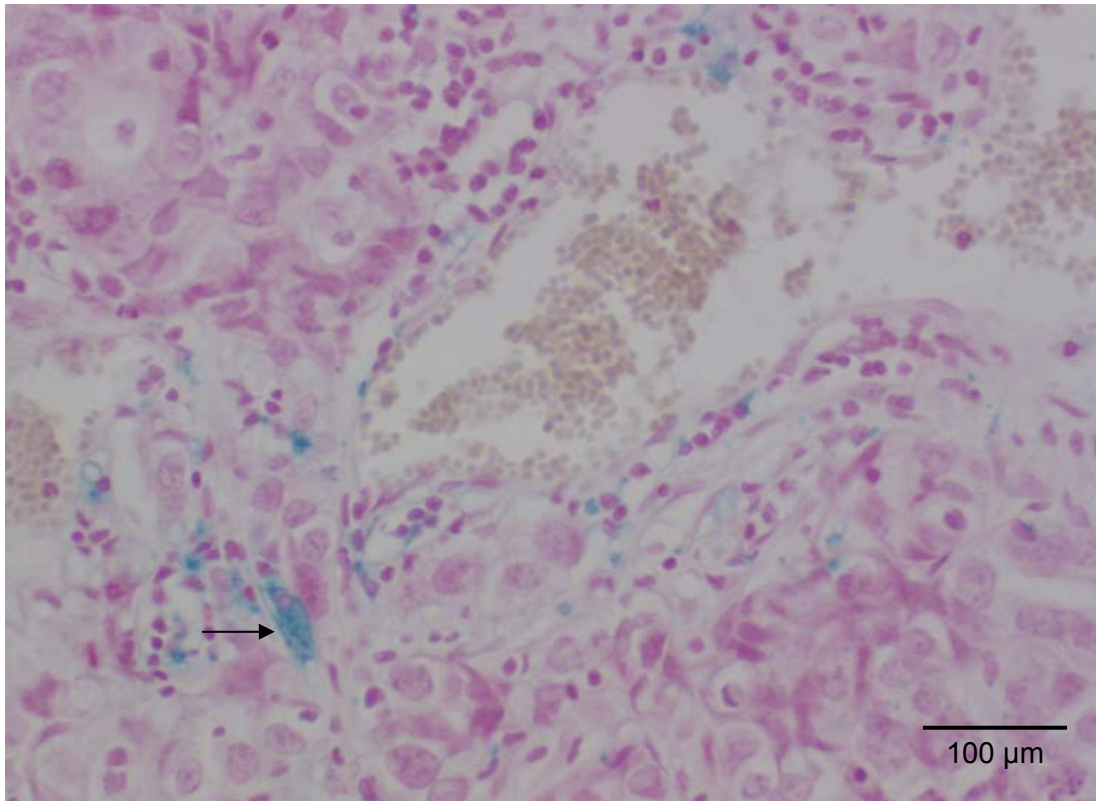


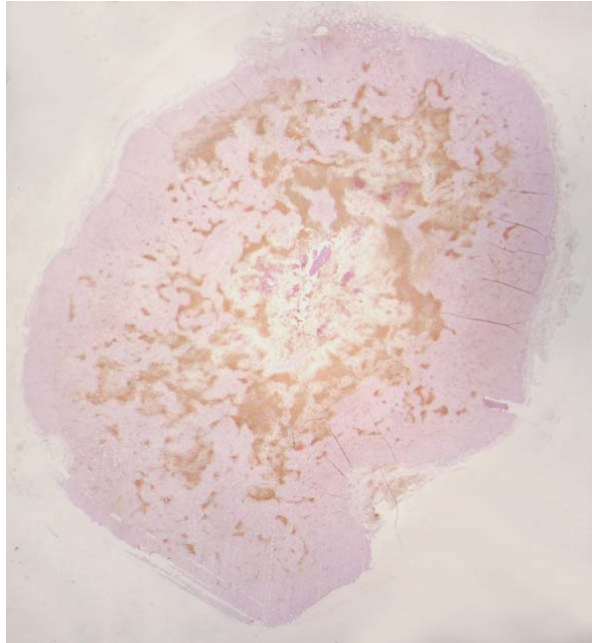
Abbildung 39: Vitales Tumorgewebe mit Gefäß. Nahe des Gefäßes Eisenpartikel, zum Teil phagocytiert. TB-Färbung.

5.4.3 Ergebnisse der glykohistochemischen Färbung

5.4.3.1 Vermessung des Tumors und Bestimmung des Nekroseanteils im Tumorgewebe

Die Vermessung des Tumors wurde an den Präparaten der Lektinfärbung (BSL 1) durchgeführt. Bei der Aufarbeitung kommt es zur Schrumpfung des Gewebes um ca. 20 %. Im Folgenden sind immer zwei Werte angegeben: der erste ist der gemessene Wert, in Klammern steht der Wert, der dem Originalwert vor der Fixierung gleicht.

Es ergab sich für die Tumoren im Median eine Gesamtfläche von 163,4 mm² (196,0 mm²). Die Tumurlänge lag im Median bei 16,1 mm (19,3 mm), die Tumorbreite im Median bei 11,1 mm (13,3 mm). Die Vitalzone weist im Median eine Breite von 1,3 mm (1,5 mm) auf. Die Nekrosefläche nimmt im Median 49,9 mm² (59,9 mm²) ein. Somit ergibt sich im Median ein prozentualer Flächenanteil der Nekrose an der Gesamtfläche von 34,4 %.



4 mm

Abbildung 40: Tumorpräparat in der Übersicht photographiert. Lockere Strukturen am Tumorrand: Tumorkapsel. Violett gefärbtes Gewebe am Rand des Tumors: Vitalgewebe. Braun- bzw. zentral schwach braungefärbtes Gewebe: Nekrose. Lektin-Färbung.

5.4.3.2 Bestimmung der vaskulären Parameter

Anhand der Darstellung der Gefäße im Tumor mit der Lektinfärbung wurde eine weitere Unterteilung der Tumorzone „Vitalgewebe“ vorgenommen. Im Vitalgewebe treten Areale vermehrter Gefäßdichte auf. Diese wurden als „Hotspot“ bezeichnet und im Gegensatz zum „Vitalgewebe“ minderer Gefäßdichte gesondert betrachtet. Im Vitalgewebe finden sich sehr kleine unauffällige Gefäße. Die Hotspots hingegen stechen bei der Betrachtung durch die markierten Gefäße stark hervor. Sie sind als Inseln im übrigen Vitalgewebe beschreibbar und von diesem nicht scharf abgegrenzt. Sie sind nicht regelmäßig verteilt, doch ihre räumliche Orientierung in der gesamten Zone des vitalen Tumorgewebes tendiert zur Nekrosezone, während kapselnah mehr gefäßarme Vitalgewebeareale festzustellen sind. Es erschien nicht sinnvoll, innerhalb der Hotspots je nach Lokalisation die Gefäßgrößen zu unterscheiden. Aber es ergab sich bei der Auswertung der Eindruck, dass die Gefäße, die näher der Nekrosezone gefunden wurden, etwas größer sind, als jene, die am Rand des Tumors gefunden wurden.

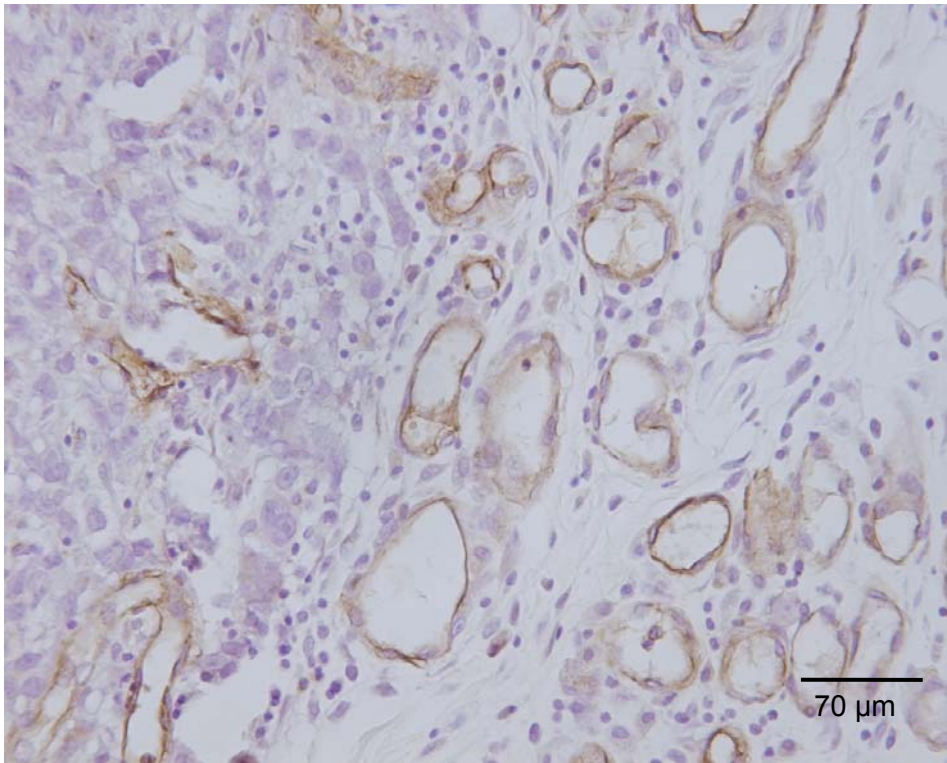


Abbildung 41: Tumorkapsel am Übergang zum vitalen Tumorgewebe mit Gefäßen. Lektin-Färbung.

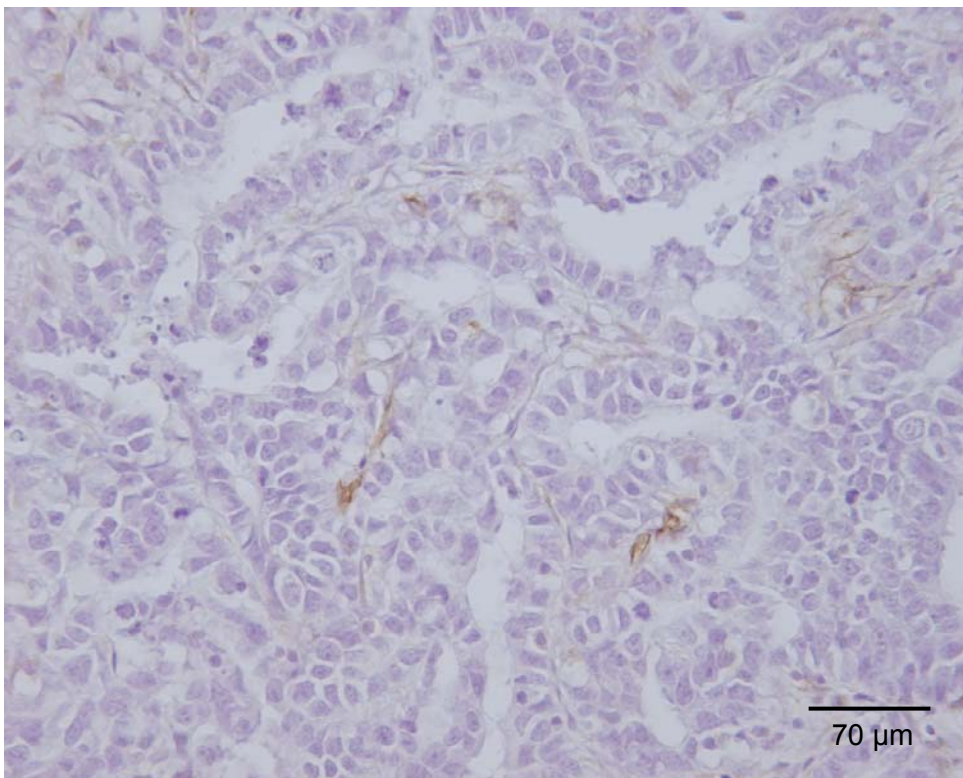


Abbildung 42: Vitalgewebe am Tumorrand, gefäßarm. Lektin-Färbung.

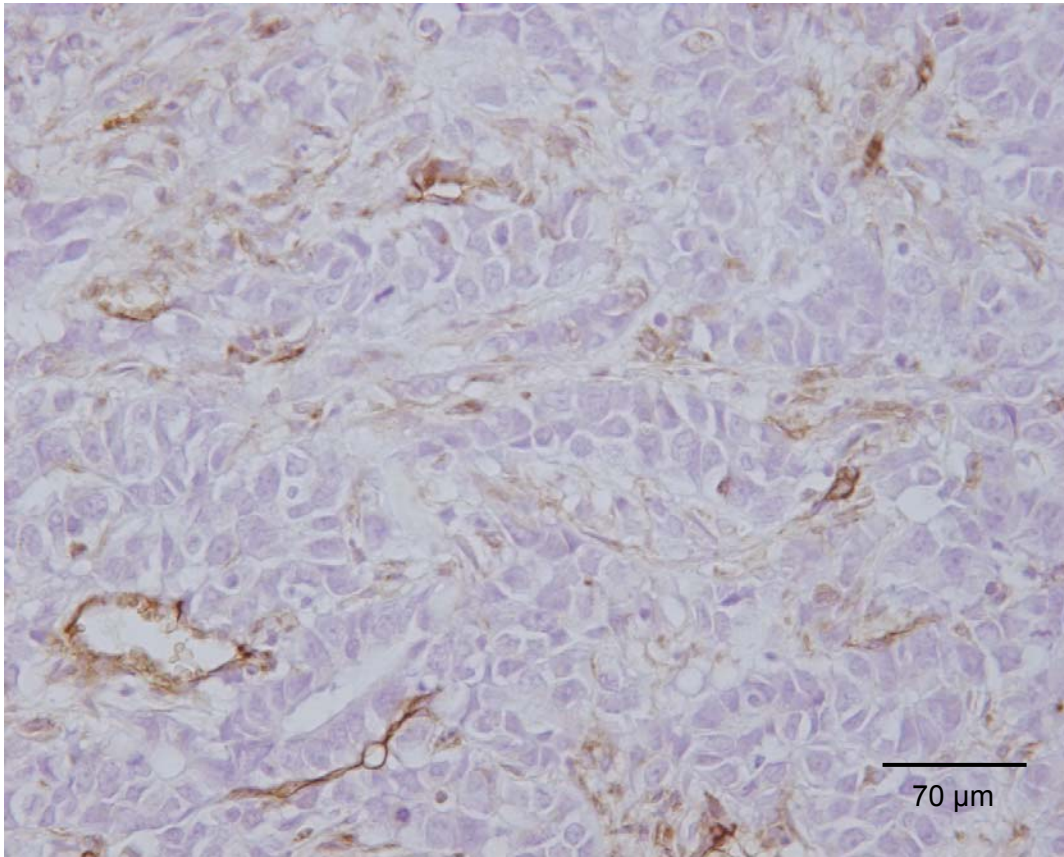


Abbildung 43: Hotspot im Tumorgewebe. Lektin-Färbung.

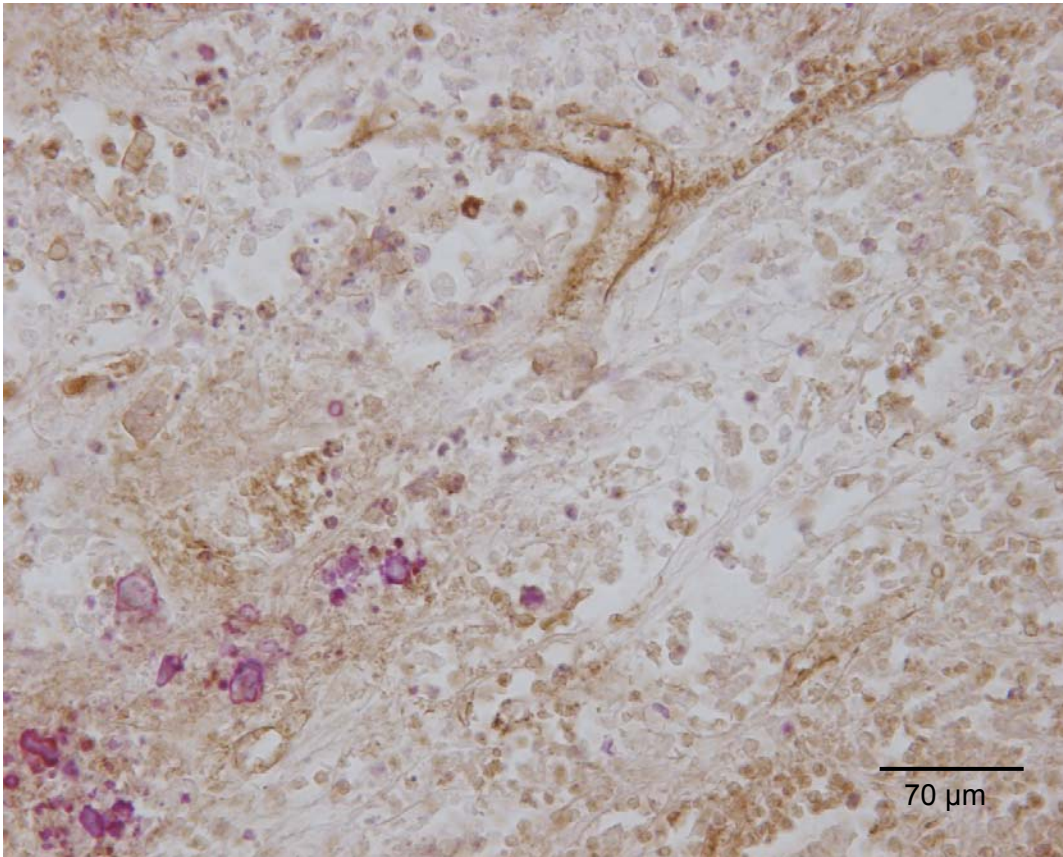


Abbildung 44: Zentrale Nekrose im Tumor, Gefäßstrukturen. Lektin-Färbung.

- **Mikrovaskuläre Dichte (MVD)**

Die mikrovaskuläre Dichte in den einzelnen Zonen entspricht der Anzahl der markierten Gefäße pro mm². Für die Berechnung und Darstellung wurde der Median verwendet.

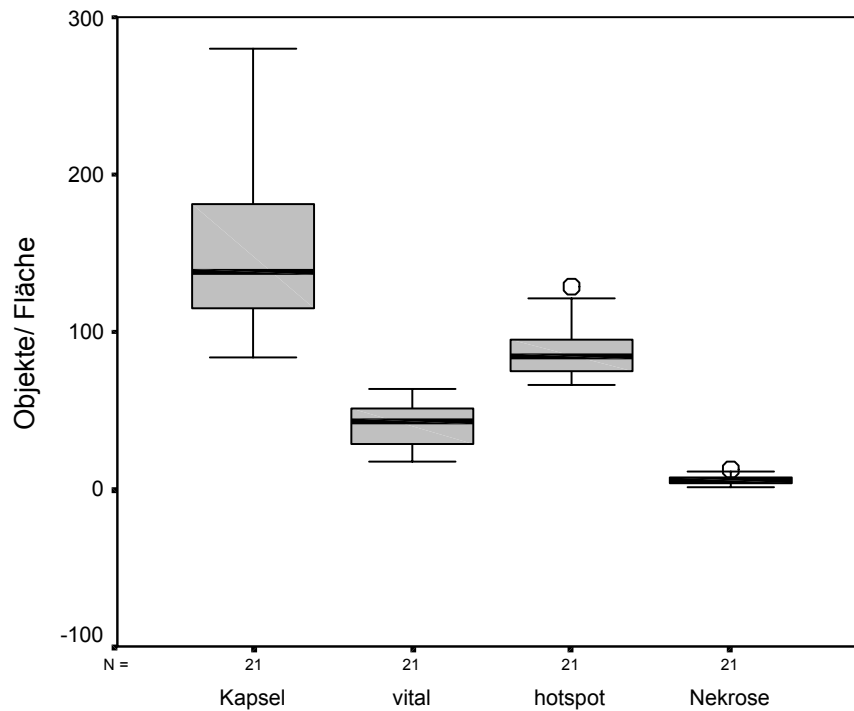


Abbildung 45: Mikrovaskuläre Dichte in den Tumorzonen.

Die Kapsel weist mit einer Anzahl von 137,7 Gefäßen/mm² die höchste mikrovaskuläre Dichte auf. Die zweithöchste Dichte findet sich mit 84,9 Gefäßen/mm² im Hotspot, im Vitalgewebe liegt der Wert mit 42,9 registrierten Gefäßen/mm² darunter. In der Nekrose befinden sich nur 5,7 Gefäße/mm². Die einzelnen Zonen unterscheiden sich jeweils untereinander nach dem Wilcoxon-Test signifikant (alle $p < 0,01$).

- **Fläche der Gefäßlumina und prozentualer Flächenanteil**

Die Bestimmung der Fläche der Gefäßlumina dient der Einordnung der Größe der Gefäße, die in den einzelnen Zonen anzutreffen sind. Die Darstellung erfolgt anhand der gemessenen Werte in μm^2 . Bei der Aufarbeitung kommt es zur Schrumpfung des Gewebes um ca. 20 %, im Text ist in Klammern der gemessene Wert plus dieser 20 % angegeben, der dem Originalwert vor der Fixierung gleicht.

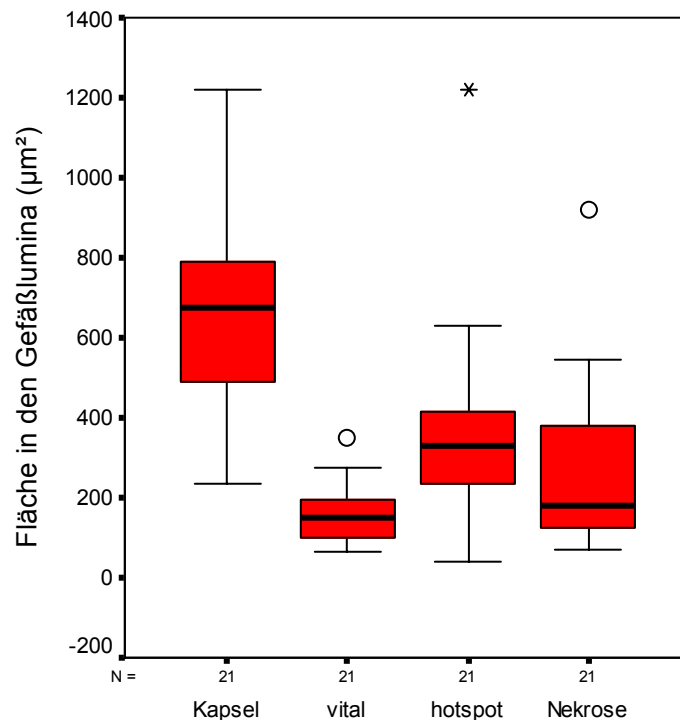


Abbildung 46: Lumenfläche (μm^2) in den einzelnen Tumorzonen.

In der Kapsel weisen die Gefäße mit einem Median von $676,8 \mu\text{m}^2$ ($821,1 \mu\text{m}^2$) die größten Lumina, also die größte Gefäßfläche auf. Im Hotspot beträgt die mediane Fläche $329,9 \mu\text{m}^2$ ($394,8 \mu\text{m}^2$), im Vitalgewebe ist sie hingegen mit $150,6 \mu\text{m}^2$ ($180,7 \mu\text{m}^2$) geringer. In der Nekrosezone ist die Fläche der Gefäßlumina größtmäßig zwischen Vitalgewebe und Hotspot angesiedelt. Die Zonen Hotspot und Nekrose unterscheiden sich nach dem Wilcoxon-Test mit $p < 0,63$ nicht signifikant. Die Werte aller anderen Zonen unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

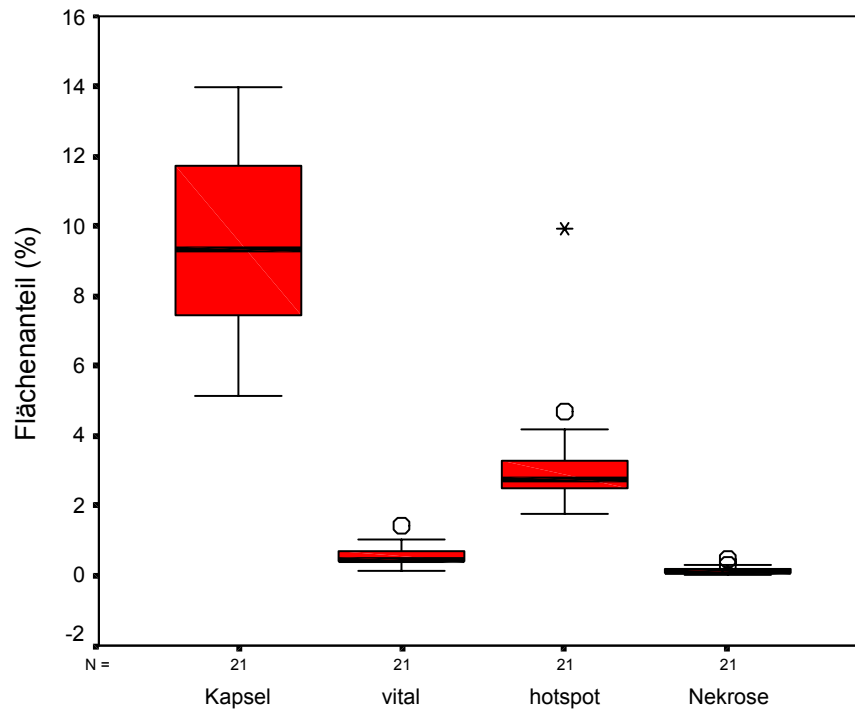


Abbildung 47: Prozentualer Flächenanteil der Gefäßlumina an der gemessenen Fläche der Zonen.

Dieser Parameter stellt den prozentualen Anteil der Gefäßfläche im Vergleich zur insgesamt ausgewerteten Fläche dar. Hier wird deutlich, dass die Gefäße im Kapselbereich den größten Flächenanteil einnehmen (Median 9,3 %). Im Hotspot liegt der mediane Flächenanteil mit 2,8 % deutlich über dem im Vitalgewebe. Dort liegt der Median bei 0,5 %, die Streuung der Werte ist hier, gekennzeichnet durch die geringen Abweichungen der Quartile (25 % : 0,4 %; 75 % : 0,7 %), sehr gering. In der Nekrosezone liegt der prozentuale Flächenanteil bei 0,1 %, die Streuung der Werte ist hier noch geringer. Die Werte aller Zonen unterscheiden sich nach dem Wilcoxon-Test signifikant ($p < 0,01$).

- **Interkapilläre Distanz**

Die interkapilläre Distanz (IKD) konnte mit der angewandten Methode in der Nekrosezone nicht bestimmt werden. Hier lag maximal eine Gefäßstruktur im Sichtfeld, so dass die Distanz größer als 860 μm (1032 μm) war. Bei der Aufarbeitung kommt es zur Schrumpfung des Gewebes um ca. 20 %, im Text ist in Klammern der gemessene Wert plus dieser 20 % angegeben, der dem Originalwert vor der Fixierung gleicht.

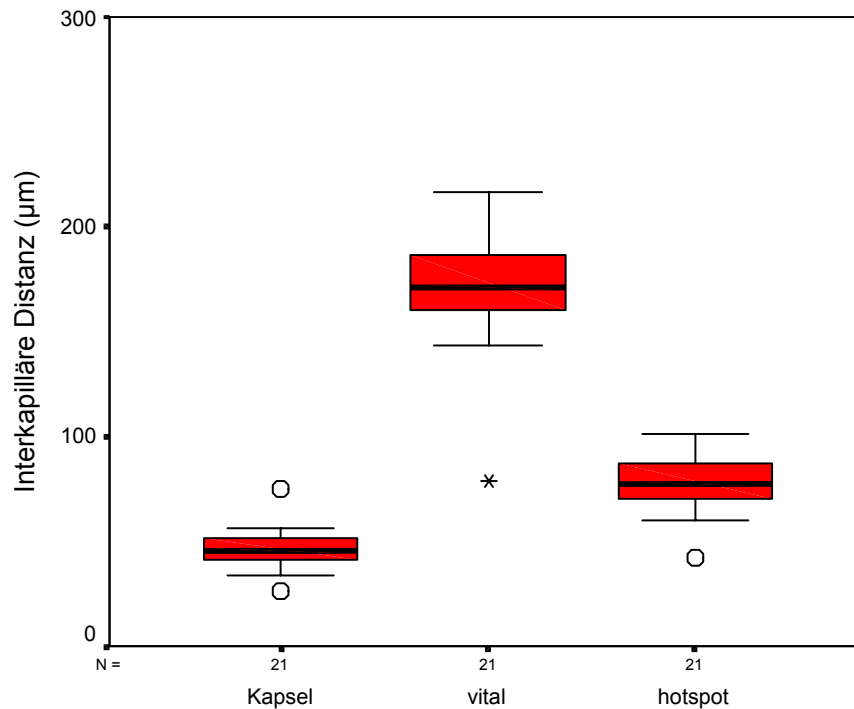


Abbildung 48: Interkapilläre Distanz in drei Tumorzonen.

Den größten Abstand weisen die Gefäße in der Vitalzone mit einem Medianwert von 170,9 μm (205,08 μm) auf. Im Hotspot liegen die Gefäße mit einem medianen Wert von 77,1 μm (92,5 μm) näher beieinander, die Distanz im Kapselbereich ist mit 45,6 μm (54,7 μm) noch geringer. Die Messwerte aller Zonen unterscheiden sich mit $p < 0,01$ nach dem Wilcoxon-Test signifikant.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass im Kapselbereich stark dilatierte Gefäße variabler Größe und Verzweigung in hoher Dichte aufzufinden sind. Sie weisen von allen ausgewerteten Zonen den größten Flächenanteil sowie die geringste interkapilläre Distanz auf. In der Vitalzone des Tumorgewebes hingegen sind die Kapillaren in geringer Dichte

relativ gleichmäßig verteilt und zeigen bezüglich ihrer Lumenfläche nur geringe Abweichungen vom Median. Hier wurde die größte interkapilläre Distanz ermittelt. Im Hotspot sind die Kapillaren mit der höchsten Dichte und der geringsten interkapillären Distanz im Tumorgewebe aufzufinden. Ihre Lumenflächen nehmen gegenüber dem Vitalgewebe absolut und relativ einen höheren Flächenanteil ein. Die in der Nekrosezone aufzufindenden Gefäßstrukturen sind rar und falls vorhanden, dilatiert und unregelmäßig verteilt.

5.5 Vergleich der magnetresonanztomographischen Untersuchung, Druckmessung und Histologie

Die vergleichenden Untersuchungen am Colocarzinom der Ratte wurden unter folgenden Aspekten durchgeführt: In der ersten MRT-Untersuchung sollte das periphere Washout mit Gd-DTPA dargestellt werden, in der zweiten Untersuchung mit VSOP-C184 sollte der Vergleich der Kontrastmitteldynamik mit einem Blood-Pool-Kontrastmittel erfolgen. Die Methode zur Druckmessung sollte etabliert werden und die Druckverhältnisse im Colocarzinom CC531 darstellen. In der Histologie sollten morphologische Korrelate zu den gefundenen pathomorphologischen und pathophysiologischen Eigenheiten dargestellt werden.

Der Vergleich der beiden MRT-Untersuchungen wurde bereits unter 5.3.2 beschrieben.

Die zonale Gliederung des Tumors, die anhand der Washout-Bilder gewählt und für beide MRT-Messungen verwendet wurde, spiegelt sich in der Histologie sehr deutlich wieder (Abb. 49).

Innerhalb der gemessenen Parameter ergab sich eine signifikante Korrelation (Wilcoxon-Test, $p < 0,01$) zwischen den Werten der Kurvenanpassung und der mikrovaskulären Dichte. Die Zuordnung von Kapsel und „marginal“ sowie Nekrosezone und „zentral“ ist hier eindeutig. Die Hotspots sind im gesamten Vitalgewebe verteilt, die Korrelation ergibt sich sowohl mit der Zone „peripher“ als auch „intermediär“.

Die Druckmessung ergab ein ansteigendes Profil im Randbereich und folgend eine Plateauphase (Abb. 29 und 31). Über das Bild des Tumors projiziert liegt die ansteigende Phase der Kurve über der Vitalzone und einem Teil der seminekrotischen Zone bzw. „peripher“ und „intermediär“, während das Plateau dem zentralen Anteil der

seminekrotischen Zone bzw. „intermediär“ und der Nekrosezone bzw. „zentral“ zuzuordnen ist.

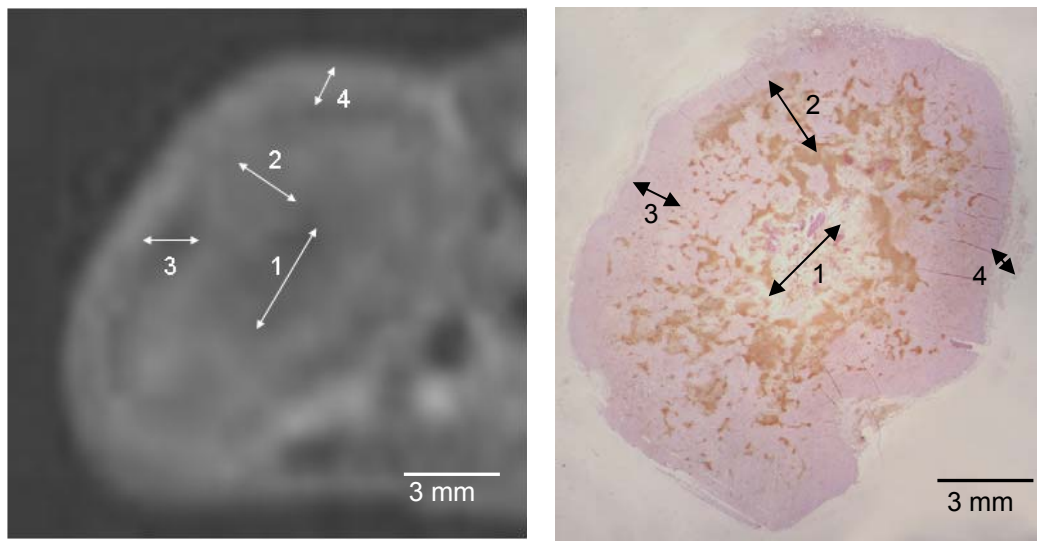


Abbildung 49: Gegenüberstellung der Darstellung des Colonicarcinoms CC531 in der Ratte nach subcutaner Implantation in (A) MRT (Gd-DTPA, 42 min nach Bolusgabe, T1 FLASH 3D, axiale Schichtorientierung) und (B) Histologie (Lektin-Färbung).

	1	2	3	4
MRT	<i>zentral</i>	<i>intermediär</i>	<i>peripher</i>	<i>marginal</i>
Histologie	<i>Nekrosezone</i>	<i>seminekrotische Zone</i>	<i>Vitalzone</i>	<i>Kapsel</i>