

4 MATERIAL UND METHODEN

Die Versuche wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt (Genehmigungsnummer des Tierversuchsvorhabens: TVV G0011/01).

4.1 Untersuchte Tiere

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 21 männliche Ratten des Inzuchtstammes WAG (Wistar Albino Glaxo) mit einem Ausgangsgewicht von $203 \pm 7,55$ g verwendet. Diese wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

4.1.1 Haltung der Tiere

Die Ratten wurden in Makrolonkäfigen in Gruppen zu vier Tieren gehalten und erhielten das Standard-Rattenzuchtfutter der Firma Altromin (Lage, Lippe) und frisches Wasser ad libitum. Als Einstreu in den Käfigen wurde Tierstreugranulat derselben Firma verwendet. Die Klimatisierung der Räume der Tierstallung erfolgte mit gefilterter Frischluft. Die Raumtemperatur betrug 22°C und die Luftfeuchtigkeit 30 – 40 %. Die Beleuchtung war in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus geschaltet.

4.1.2 Implantation der Tumorzellen

Zur Implantation der Tumorzellen wurden die Ratten durch kurze Isofluran-Inhalationsnarkose immobilisiert. Die Implantationsstelle zwischen Rippenbogen und Hüfthöcker an der rechten Flanke wurde mit Einmalrasierern enthaart (Wilkinson Sword GmbH, Solingen, Germany) und unter aseptischen Kautelen wurde die Zellsuspension (1×10^6 Zellen auf 0,05 ml Kulturmedium) subkutan injiziert, wobei nach dem Herausziehen der Kanüle der Stichkanal für zwei Minuten mit Hilfe eines sterilen Wattetupfers komprimiert wurde.

4.1.3 Wachstumskontrolle der Tumore

Das Wachstum der Tumore wurde einmal wöchentlich durch Palpation kontrolliert und bei Erreichen der entsprechenden Größe von mindestens 1 cm Durchmesser wurden die Ratten in den Versuch übernommen.

4.2 Tumorzellen

Die etablierte Tumorzelllinie CC531 wird im Institut für Radiologie der Charité Berlin Campus Mitte fortlaufend bei 37°C und 5,2 % CO₂ in einem Kultivierungsmedium, bestehend aus RPMI 1640-Medium (1x) mit 20 mM Hepes (Biochrom AG Berlin, Deutschland) unter Zusatz von 10 % neonatalem Kälberserum (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 1 % L-Glutamin 200 mM (Gibco BRL, Schottland) und 1 % Antibiotic-Antimycotic (Gibco BRL, Schottland), kultiviert (Vahrmeijer et al., 1999). Es erfolgt eine wöchentliche Subkultivierung; drei Tage später wird das Kulturmedium gewechselt. Zur Subkultivierung werden die Zellen dreimal in raumtemperierter Dulbecco's phosphatgepufferter Kochsalzlösung (1x) ohne Calcium und Magnesium gewaschen (PAA Laboratories GmbH, Österreich) und anschließend 10 Minuten in 1x Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom AG Berlin, Deutschland) im Brutschrank abgelöst. Das Trypsin wird durch die Zugabe von Kultivierungsmedium abgelöscht. Folgend wird fünf Minuten bei 1300 Umdrehungen pro Minute und 37°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in frischem Kultivierungsmedium suspendiert. Es erfolgt eine Auszählung der Zellen und Bestimmung der Vitalität in Trypanblau-Lösung (Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz) im Verhältnis 1:6 in der Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal unter 100-facher Vergrößerung. Die Bestückung der 75 cm² Kulturflaschen erfolgt mit 1x10⁵ Zellen und 25 ml Kulturmedium. Zur Implantation wurde eine Suspension von 1x10⁶ frisch trypsinisierten Zellen auf 0,05 ml Kulturmedium erstellt. Die Vitalität der implantierten Zellen lag median bei 96,38 ± 1,12 %.

4.3 Verwendete Kontrastmittel

4.3.1 Gadolinium-DTPA

Gadolinium-DTPA wurde in der Formulierung von Magnevist® (Schering AG, Deutschland) verwendet. Das Kontrastmittel wurde in einer Dosierung von 200 µmol Gd-DTPA/kg Körpergewicht eingesetzt. Die Relaxivitäten der Substanz liegen bei 0,47 T und 39°C für T1 bei 3,84 ± 0,04 l/mmol*sec und für T2 bei 4,34 ± 0,06 l/mmol*sec (Speck, 1998).

4.3.2 VSOP-C184

Verwendet wurden die mit Citrat stabilisierten superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (VSOP) mit dem Namen VSOP-C184 (Ferropharm GmbH). Die Herstellung erfolgte nach einer Methode von Pilgrim (Pilgrim, 1997). Die Partikel haben einen Kerndurchmesser von 4 nm und einen Gesamtdurchmesser von 8,6 nm. Die Relaxivitäten in Wasser bei 0,94 T betragen für $T_1 = 20,1$ und für $T_2 = 37,1$ l/[mmol*sec] (Wagner et al., 2002). Das Kontrastmittel wurde in einer Dosierung von 30 $\mu\text{mol Fe/kg}$ Körpergewicht eingesetzt.

4.4 Versuchsablauf

4.4.1 Dynamische magnetresonanztomographische kontrastmittelgestützte Messungen an Ratten

Nachdem die Tumore eine Größe von über 1 cm erreicht hatten, wurden die Tiere in den Versuchsablauf übernommen. Am Versuchstag 1 wurde die MRT-Messung mit Gd-DTPA durchgeführt. 48 Stunden später erfolgte die MRT-Messung mit VSOP. Am Folgetag fand die Druckmessung statt. Direkt anschließend wurden die Tiere getötet und die Tumore zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

Versuchstag 1	MRT-Messung mit Gd-DTPA
Versuchstag 2	Ruhetag
Versuchstag 3	MRT-Messung mit VSOP
Versuchstag 4	Druckmessung und Tötung

Tabelle 1: Zeitplan im Versuch

4.4.1.1 Vorbereitung der Tiere

In kurzer Isofluran-Inhalationsnarkose zur Immobilisation wurden für die MR-Untersuchungen jeweils zwei intravenöse Zugänge mittels Venenverweilkanülen (24G Neoflon, Bechton Dickinson Helsingborg, Schweden) in die seitlichen Schwanzvenen der Ratten gelegt, mit isotoner 0,9% Natriumchlorid-Lösung (B Braun Melsungen AG, Deutschland) gespült und anschließend verschlossen.

4.4.1.2 Narkose

Es wurde eine Dauerinfusionsnarkose gewählt, um eine gleichmäßige Narkosetiefe für die Dauer der Untersuchung zu gewährleisten. Dazu wurde ein Gemisch von 4 ml Ketaminhydrochlorid (Ketamin 500 mg, Cruramed Pharma GmbH, Deutschland) und 1 ml Xylazin (Rompun[®], BayerVital AG, Deutschland) verwendet und mit Thomæjonin HG5 (Delta Pharma GmbH, Deutschland) auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt. Die Anästhesie des jeweiligen Tieres wurde unmittelbar vor Beginn der MR-Untersuchungen mit einer Bolusinjektion von 0,15 ml dieses Gemisches über eine Venenverweilkanüle eingeleitet und im folgenden mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 0,7 ml/h aufrecht erhalten.

4.4.1.3 Untersuchungstechnik

Die Untersuchungen wurden bei 1,5 T mit einem Magnetom Vision (Siemens AG, Erlangen) im Institut für Radiologie an der Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, Campus Mitte, durchgeführt. Zusätzlich wurde bei den Untersuchungen eine herkömmliche Extremitätenspule (commercially available extremity coil) eingesetzt.

- ***Positionierung der Ratten***

Jeweils eine Ratte wurde in Rückenlage auf einer waagerechten Styroporunterlage zentral in einer Extremitätenspule gelagert. Der Schnittpunkt der Achsen zur Positionierung wurde bei der ersten Messung auf der Haut der Tiere gekennzeichnet, um eine möglichst genaue Orientierung für die zweite MRT-Messung zu schaffen. Die Tiere wurden mit Baumwolltüchern zugedeckt, um eine Auskühlung während der Untersuchung zu vermeiden.

- ***Wahl der Messsequenz***

Zur Darstellung der Kontrastmitteldynamik wurde eine T1-gewichtete 3D-fast low angle shot (FLASH) Sequenz mit folgenden Parametern gewählt: Repetitionszeit (TR) = 6,8 ms, Echozeit (TE) = 2,3 ms, Anregungswinkel (α) = 15°, field of view (FOV) = 125 mm, Matrix = 52 % 100 x 256, Pixelgröße 0,94 x 0,49 mm, Anzahl der Akquisitionen = 1, Blockdicke = 48 mm, effektive Schichtdicke = 6 mm und gemessene Partitionen = 8. Die Messzeit betrug 4 Sekunden. Die Messungen wurden in axialer Orientierung durchgeführt. Unter der Notwendigkeit einer möglichst kurzen Messzeit und gleichzeitig möglichst hoher Bildauflösung stellten diese Parameter den günstigsten Kompromiss dar. Mit dieser Sequenz wurde zunächst 30 Mal direkt hintereinander gemessen. Die nächsten fünf Messungen wurden je im Abstand von zwei Minuten durchgeführt. Die folgenden Messungen wurden je

im Abstand von fünf Minuten durchgeführt. Die Kontrastmitteldynamik wurde insgesamt über einen Zeitraum von 42 Minuten aufgezeichnet. Die Tiere wurden mit dieser Messfolge am Versuchstag 1 mit Gd-DTPA und am Versuchstag 3 mit VSOP untersucht.

Messung Nummer	1	2	3	4	5	30	31	32	33	34	35	36	37	40	41
Zeitpunkt	-12s	-8s	-4s	0s	4s	104s	4min	6min	8min	10min	12min	17min	22min	37min	42min



Kontrastmittelapplikation

Tabelle 2: Zeitliche Gliederung der Messung im MRT

4.4.1.4 Applikation der Kontrastmittel

Das jeweilige Kontrastmittel wurde in einer Orginal Perfusor[®]-Leitung PE (B. Braun Melsungen AG, Deutschland) vorgelegt, die bereits bei Positionierung der Ratten in der Extremitätenspule mit dem venösen Zugang verbunden wurde. Die Applikation der Kontrastmittel erfolgte jeweils nach der vierten Messung durch die Injektion von 0,5 ml isotoner Natrium-Chloridlösung (B. Braun Melsungen AG, Deutschland) über den Polyethylenschlauch.

4.4.1.5 Auswertung der MRT-Untersuchungen

Mit Hilfe des automatischen Auswertungsprogramms NIH Image wurden die Analysen der MRT-Bilder durchgeführt. Hierbei werden den unterschiedlichen Graustufen der Signalintensitäten (SI) Zahlen zugeordnet. Die Auswertung erfolgte in der Schicht, die den größten Durchmesser des Tumors getroffen hatte. Es wurden anhand der späten Aufnahmen aus der ersten MRT-Messung (Gd-DTPA), die eine optimale Darstellung des peripheren Washout zeigten, auf allen Bildern einer Studie vier Zonen definiert: marginal, peripher, intermediär und zentral. Dabei bezeichnet „peripher“ die Zone der Auswaschung, „marginal“ ist der zum Tumorrand, „intermediär“ ist der zur Tumormitte angrenzende Bereich. „zentral“ bezeichnet das Zentrum des Tumors. Diese Einteilung wurde ebenfalls an Hand der genannten Aufnahmen auf die Bilder der zweiten MRT-Untersuchung (VSOP) übertragen. In diese Regionen wurden jeweils mehrere regions of interest (ROI) eingezeichnet (s. Abb. 6) und die Signalintensitäten gemessen. Aus den gemessenen ROIs einer Zone wurde jeweils der Mittelwert gebildet und für die weitere Auswertung verwendet. In der V. cava caudalis wurde ebenfalls ein ROI platziert und die Signalintensität gemessen.

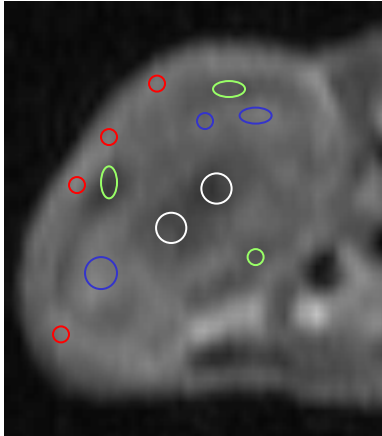


Abbildung 6:
 Definition der Auswertungszonen durch
 Platzierung der ROI's auf einer MRT-
 Aufnahme des Colocarcinoms CC531
 subkutan in der WAG-Ratte in axialer
 Orientierung, späte Untersuchungs-
 phase (Gd-DTPA, T1 FLASH 3D).
 marginal: rote Ellipsen
 peripher: grüne Ellipsen
 intermediär: blaue Ellipsen
 zentral: weiße Ellipsen

- **Kurvenanpassung**

Zur Analyse des Anflutungsverhaltens des Kontrastmittels in den einzelnen Tumorzonen wurde am Verlauf des ansteigenden Teils der jeweiligen Kurve eine Kurvenanpassung nach monoexponentiellem Funktionsmodell durchgeführt. Dieses Modell basiert auf der Annahme eines offenen 1-Kompartimentsystems in der Anflutungsphase und legt eine Kinetik erster Ordnung zugrunde (Forth, 1996). Die Anwendung der Funktion

$$y = a * (1 - \text{Exp}(-b * x)) + c$$

ermöglicht die Ermittlung der Anstiegskonstante b, welche die jeweilige Kurve definiert. (a = Konzentration bzw. SI nach Einstellen des Verteilungsgleichgewichtes, b = Anstiegskonstante/Invasionskonstante, c = Ausgangskonzentration bzw. SI vor Applikation, x = Zeit, y = Konzentration).

4.4.2 Druckmessungen mit der Wick-in-needle (WIN) Technik

4.4.3 Vorbereitung der Tiere

Den Tieren wurde unter kurzer Isofluran-Inhalationsnarkose ein venöser Verweilkatheter (24G Neoflon, Bechton Dickinson Helsingborg, Schweden) in die seitliche Schwanzvene gelegt.

4.4.3.1 Narkose

Die Druckmessung im Gewebe kann nur bei völliger Ruhe und Schmerzunempfindlichkeit der Tiere erfolgen. Daher wurde eine Anästhesie der Tiere entsprechend der des Narkoseprotokolls zur MRT-Messung durchgeführt.

4.4.3.2 Untersuchungstechnik

Die Untersuchungen wurden in den Räumen der experimentellen Radiologie an der Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, Campus Mitte, durchgeführt. Die Messung erfolgten 24 Stunden nach der zweiten MRT-Messung (s. Abb. 8, 9).

- **Die Messapparatur**

Die präparierte Kanüle wurde auf einer Manipulationsvorrichtung befestigt, die einen Vorschub in Millimeterabständen erlaubte. Über einen Polyethylenschlauch wurde diese mit einem Druckaufnehmer verbunden, dessen optimaler Messbereich bei ± 75 mmHg liegt (Pressure Transducer P75, Hugo Sachs Elektronik, Deutschland). Die gemessenen Werte wurden über einen Druckverstärker (Transducer amplifier Module Type 705/1, Hugo Sachs Elektronik, Deutschland) des Plugsys[®] Einschubsystems (Hugo Sachs Elektronik, Deutschland) geleitet und anschließend mit der Datenerfassungssoftware Hämodyn[®] (Hugo Sachs Elektronik, Deutschland) auf einem Pentium II-PC aufgezeichnet. Zur Kalibrierung der Messapparatur stand das Kalibriergerät Kal 84 (Hugo Sachs Elektronik, Deutschland) zur Verfügung.

- **Präparation der WIN**

In die 23G Kanülen (Terumo Europe N.V., Belgien) wurde, 4 - 5 mm von der Spitze der Kanüle entfernt, ein ca. 2 - 3 mm großes Seitenloch eingeschliffen. In die Kanüle wurden anschließend 4 - 5 Fäden multifilamentösen chirurgischen Nahtmaterials (Vicryl[®] 0,7 metric, Johnson & Johnson, Belgien) eingebracht.

Die Spitze der Kanüle wurde mit Sekundenkleber versiegelt. Die Kanüle wurde vor der Messung zur Überprüfung der Durchlässigkeit mit heparinisierter (7 IU/ml) isotoner Kochsalzlösung (Fresenius Kerbi, Deutschland) gespült. Die Kanüle wurde auf der Manipulationsvorrichtung befestigt und an eine Original Perfusor[®]-Leitung PE (B. Braun Melsungen AG, Deutschland) angeschlossen, die wiederum mit dem Druckabnehmer verbunden wurde. An diesem Schlauch befand sich die Klemme zum Ausführen des Druckabgleichs. Das gesamte System wurde mit heparinisierter Kochsalzlösung gefüllt.



Abbildung 7: Spitze der Wick-in-needle (WIN) – Kanüle mit Seitenloch (Pfeil) und eingezogenen multifilamentösen Fäden.

- ***Positionierung der Ratte***

Vor der Messung wurde die Haut über dem Tumor enthaart. Die narkotisierte Ratte wurde in Rückenlage auf eine Styroporunterlage verbracht und soweit wie möglich mit einer wärmereflektierenden Decke vor dem Auskühlen geschützt. Der Tumor wurde locker durch zwei zwischen Tumor und muskulärer Bauchwand eingebrachte 23G Kanülen fixiert.

- ***Praktische Durchführung der WIN-Technik***

Zunächst wurde am Druckabnehmer-System ein Nullabgleich durchgeführt. Folgend wurde die Kanüle waagrecht mit Hilfe der Manipulationsvorrichtung an der Stelle des größten Durchmessers in den Tumor eingeführt, bis das eingeschliffene Seitenloch sicher die Haut durchdrungen hatte. Dies war der Startpunkt der Messung. Es wurde gewartet, bis sich der initiale Druckanstieg für zwei Minuten auf einem Niveau festigte. Dieser Zeitwert konnte in Vorversuchen als ausreichend zur Nivellierung ermittelt werden. Nun folgte der Druckabgleich zur Überprüfung der Flüssigkeitskommunikation des Gewebewassers mit der Systemflüssigkeit. Ein leichtes Anziehen einer Klemme am Verbindungsschlauch führte vorübergehend zu einem Anstieg des gemessenen Druckwertes, der sich in zwei Minuten wieder auf den Ausgangswert zurückbewegte. Dann wurde die Klemme wieder gelöst, der Prozess fand in umgekehrter Weise statt, der gemessene Wert sank und stellte sich folgend auf den Ausgangswert ein. Ein Druckunterschied < 1 mmHg zum Ausgangswert erlaubte den Beginn der Messung.

Die Kanüle wurde nun mit Hilfe der Manipulationsvorrichtung jeweils 1 mm in den Tumor vorgeschoben. Sobald der Wert sich für zwei Minuten auf einem Niveau bewegte, wurde die Kanüle wieder einen Millimeter weiterbewegt. Dies erfolgte solange, bis die seitliche Öffnung der Kanüle sich etwa durch 2/3 des Tumordurchmessers bewegt hatte. Dann wurde ein weiterer Druckabgleich durchgeführt. Verhielt sich auch dieser nach den oben genannten Kriterien, konnte die Messung als gültig bezeichnet werden. Pro Tumor wurden zwei gültige Messungen durchgeführt. Die Aufzeichnung der Druckwerte erfolgte im Abstand von 10 s mit dem Programm Hämodyn[®] (Hugo Sachs Elektronik, Deutschland).



Abbildung 8: Arbeitsplatz für die interstitielle Druckmessung an der Ratte

1 PC, 2 Kalibriergerät, 3 Druckverstärker, 4 Druckaufnehmer, 5 Kanüle auf der Manipulationsvorrichtung, 6 Infusionsnarkosegerät, 7 Ratte mit Tumor in der rechten Flanke.

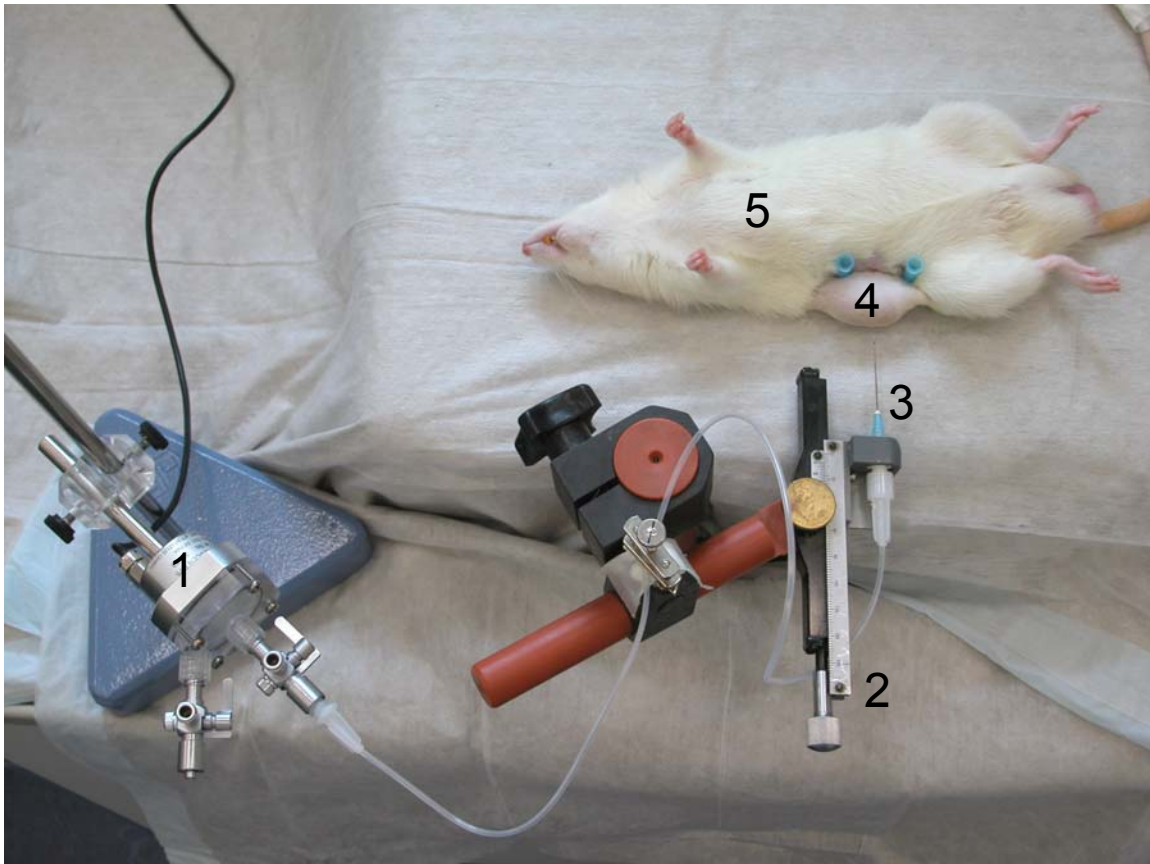


Abbildung 9: Nahaufnahme der WIN-Messapparatur am Tier

1 Druckaufnehmer, 2 Manipulationsvorrichtung, 3 WIN-Kanüle, 4 Tumor, 5 Ratte

4.4.4 Tötung der Tiere und Tumorentnahme

Nach Abschluss der Druckmessung wurde die Tötung der Tiere durch Blutentzug über die Aorta abdominalis unter fortlaufender Infusionsnarkose vorgenommen. Direkt anschließend wurden die Tumore vorsichtig aus dem subkutanen Gewebe freipräpariert und entnommen.

4.5 Histologische Aufarbeitung der Tumore

4.5.1 Fixation und Aufbereitung des Tumorgewebes

Die Tumore wurden in Orientierung zur MRT- und Druckmessung mit einem Skalpell in ca. 1,5 mm dicke Scheiben zertrennt und für 24 Stunden in 4 % gepufferter Formalinlösung (Herbata-Arzneimittel, Deutschland) fixiert. Die Fixationsdauer ist durch die Ansprüche der Immunhistochemie auf diesen Zeitraum limitiert und verlangt daher eine Partitionierung des

Gewebes. Danach wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert und anschließend in Paraffinblöckchen (Sigma-Aldrich, Deutschland) eingebettet. Es wurden für die verschiedenen histologischen Aufarbeitungen Schnitte mit einer Dicke von 4-5 µm angefertigt.

4.5.2 Färbung und Auswertung der histologischen Präparate

Die gesamte histologische Auswertung erfolgte an einem Mikroskop der Firma Nikon (Optiphot2). Mit Hilfe einer Videokamera (3 CCD DXC, Sony) wurde das mikroskopische Bild auf einen 88MB Pentium-Rechner mit einem 17" Monitor übertragen und stand so zur Auswertung durch das Analyseprogramm LUCIA M (Nikon) bereit. Des Weiteren stand ein graphisches Tablett zur Verfügung. Ausgehend von den Befunden aus der HE-Färbung wurden in den jeweiligen histologischen Präparaten des Tumorgewebes mehrere Zonen in Analogie zur MRT-Messung definiert. In diesen Zonen wurden je 20 Gesichtsfelder in die Auswertung einbezogen. Die Gesamtfläche der ausgewerteten 20 Gesichtsfelder beträgt bei 200facher Vergrößerung ca. 1,4 mm² und bei 400facher Vergrößerung ca. 0,37 mm². Die gemessenen Werte wurden zunächst in eine Excel-Tabelle übertragen.

4.5.2.1 Hämatoxylin-Eosin (HE) - Färbung

In den HE-Präparaten wurde eine qualitative Beurteilung der Gewebearten in den einzelnen Tumorzonen durchgeführt. Folgend wurde die Mitoseaktivität der Zellen bei 400-facher Vergrößerung (40er Objektiv, 10er Okular) beurteilt. Aus den Ergebnissen der 20 Gesichtsfelder wurde jeweils das arithmetische Mittel gebildet.

4.5.2.2 Turnbull-Blau (TB) - Färbung

Die TB-Färbung als Eisenfärbung dient der Darstellung des Eisens im Gewebe. Hierbei wird zweiwertiges Eisen blau angefärbt, eine Gegenfärbung erfolgt mit Kernechtrot. Deutlich stellt sich in dieser Färbung vor allem phagozytiertes Eisen dar. Da in diesem Tumor kein Eisen zu erwarten ist, sind alle blau gefärbten Partikel als Rückstände des injizierten Kontrastmittels zu werten.

Die Bestimmung des Eisengehaltes im Tumorgewebe wurde mit Hilfe des automatischen Bildanalyseverfahrens (LUCIA M, Nikon) durchgeführt. Die Untersuchung fand bei 400-facher Vergrößerung (20er Objektiv, 10er Okular) statt. Dabei erfolgte die Erfassung der Menge des blaugefärbten Eisens in den folgenden Tumorzonen: (1) Kapsel, (2) vitales

Tumorgewebe und (3) Nekrose. Es wurden 20 Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung (20x Objektiv und 10x Okular) in jeder der drei Zonen bewertet.

4.5.2.3 Glykohistochemische Färbung: Griffonia (*Bandeiraea*) simplicifolia Lektin I (BSL I)

Die glykohistochemische Färbetechnik wurde zum einen zur Vermessung des Tumors und der Tumorzonen herangezogen, zum anderen erfolgte an diesen Präparaten die Determinierung der vaskulären Parameter. Bei der Vermessung der Präparate ist die Schrumpfung von ca. 20 % zu berücksichtigen (Romeis, 1998).

Die Präparate wurden in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurde die Aktivität der endogenen Peroxidase für 15 Minuten in einer Lösung 0,3 %igen H₂O₂ in Methanol geblockt. Folgend wurde 15 Minuten in einer Lösung 1 % bovinen Serumalbumins (Sigma-Aldrich, Deutschland) in PBS-Puffer bei pH 7,2 (PAA Laboratories GmbH, Österreich) zur Reduktion der unspezifischen Hintergrundfärbung inkubiert. Dies wurde dreimal in PBS für insgesamt 15 Minuten gespült. Das Lektin (BSL I, Vector laboratories inc., USA) wurde in einer Verdünnung von 1:200 in PBS angewendet. Die Negativkontrolle wurde mit folgender Lösung beschichtet: 200 mM Galactose und 200 mM N-Acetylgalactosamine (Sigma-Aldrich, Deutschland), jeweils in PBS gelöst, im Verhältnis 1:1 mit der Lektinlösung gemischt. Die Inkubation erfolgte in der feuchten Kammer für 18 h bei 6-8°C. Danach wurde wiederum dreimal für insgesamt 15 Minuten in PBS gespült. Dann erfolgte bei Raumtemperatur für 45 Minuten die Inkubation mit dem StreptABC Komplex/HRP (Vector laboratories inc., USA). Dazu wurden 9 µl der Lösung A und 9 µl der Lösung B in 982 µl PBS vermischt. Es folgt wieder ein dreimaliger Spülvorgang von insgesamt 15 Minuten in PBS. Dann erfolgte der Peroxidase-Nachweis. Hier ergab sich für das vorliegende Material eine optimale Zeitdauer von 3 Minuten. Es wurden dazu 20 mg DAB (Sigma-Aldrich, Deutschland) in 100 ml TBS gelöst und 40 µl 30 %iger H₂O₂ (pH 7,6) hinzu gegeben (pH 7,6). Anschließend wurde in Aqua dest. gespült. Dann wird für ca. 30 Sekunden eine Gegenfärbung in Mayers Hämatoxylin (Merck, Deutschland) vorgenommen. Diese wurde wiederum in Leitungswasser gespült und anschließend für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Dann wurde eine Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe bis hin zu Xylol vorgenommen und das Präparat anschließend mit Kanadabalsam eingedeckt.

4.5.2.4 Morphometrie

- ***Vermessung des Tumors und Bestimmung des Nekroseanteils im Tumorgewebe***

Zunächst wurde mit Hilfe des Analyseprogramms LUCIA M die Tumurlänge an der längsten Stelle und die Tumorbreite an der schmalsten Stelle vermessen. Anschließend wurde die Breite der Vitalzone an 20 Stellen gemessen. Dazu wurde jeweils mit Hilfe des Cursors die zu messende Strecke definiert und mit Hilfe der Software ermittelt. Zur Bestimmung des Nekroseanteils im Tumorgewebe wurden die histologischen Präparate der Lektinfärbung mit Hilfe einer Lupenfunktion photographiert (3 CCD DXC, Sony) und auf Datenträgern gespeichert. In der Übersicht stellt sich das Vitalgewebe des Tumors violett dar und lässt sich gut von den nekrotischen Anteilen differenzieren, die bräunlich angefärbt sind. Mit Hilfe des Analyseprogramms LUCIA M konnten unter individuell definierter Einstellung eines Schwellenwertes die braungefärbten Areale erfasst und berechnet werden. Die zu messende Fläche wurde hierzu mit einem Binärbild überlagert und der Meßalgorithmus gestartet. Durch die Markierung des äußeren Randes des soliden Tumorgewebes und anschließende Erfassung und Berechnung des Innenraumes konnte die Gesamtfläche des Tumors ermittelt werden. Über einen Dreisatz konnte so der prozentuale Nekroseanteil im Tumorgewebe berechnet werden. Bei der Bearbeitung des Gewebes ist eine Schrumpfung von ca. 20 % zu erwarten (Romeis, 1998). Diese wurde zu den gemessenen Werten addiert, um auf die Originalverhältnisse rückschließen zu können.

- ***Bestimmung der vaskulären Parameter (Mikrovaskuläre Dichte MVD, Lumenfläche)***

Die Bestimmung der mikrovaskulären Dichte erfolgte bei 200facher Vergrößerung (20x Objektiv und 10x Okular) an den histologischen Präparaten, die mittels der Lektin-Färbung aufgearbeitet wurden. Es wurden vier Zonen im Tumor ausgewertet: (1) die Kapsel, (2) vitales Tumorgewebe minderer Gefäßdichte (Vitalgewebe), (3) vitales Tumorgewebe hoher Gefäßdichte (Hotspot) und (4) die zentrale Nekrosezone. Pro Zone wurden wiederum 20 Gesichtsfelder ausgewertet. Jede braungefärbte Endothelzelle oder Endothelzellverband, die deutlich von angrenzenden Gefäßstrukturen, Tumorzellen oder anderen Gewebeanteilen differenzierbar war, wurde als einzelnes zählbares Gefäß gewertet. Auch solche Endothelzellcluster, die möglicherweise von einem Gefäß stammen, das sich durch das Gesichtsfeld „schlängelt“, wurden als einzelne Gefäße gezählt. Es wurden alle in einem Gesichtsfeld erkennbaren lumenhaltigen Gefäßstrukturen an der endothelialen Innenauskleidung mit dem Stift umfahren. Rote Blutzellen wurden nicht zur Definition von Lumina herangezogen. Gefäße, deren Lumen nicht in der Schnittebene lag, wurden markiert, so dass sie als Objekt mit in der Statistik erfasst werden konnten. Durch das automatische

Auswertungsprogramm LUCIA wurden aus den Markierungen folgende Parameter berechnet: a) Objekte pro Fläche, dies entspricht der mikrovaskulären Dichte (MVD). Der pro Tier bzw. Tumor und Zone angegebene Wert stellt den Mittelwert aus den jeweils 20 untersuchten Sichtfeldern dar. b) Area, die Fläche der markierten Bereiche, gibt die durchschnittliche Fläche der Gefäßlumina in mm² an. c) Flächenanteil beschreibt den prozentualen Anteil der markierten Gefäßlumina an der ausgewerteten Fläche.

- **Bestimmung der interkapillären Distanz (IKD)**

Die Hälfte der interkapillären Distanz entspricht der Diffusionsstrecke, die für die Kontrastmittelverteilung im Gewebe bedeutend ist. Zur Bestimmung der interkapillären Distanz wurden die Präparate der Lektin-Färbung herangezogen. Entsprechend zur Bestimmung der mikrovaskulären Dichte wurde die Auswertung bei 200facher Vergrößerung in jeweils 20 Gesichtsfeldern der vier Zonen (1) Kapsel, (2) vitales Tumorgewebe minderer Gefäßdichte, (3) vitales Tumorgewebe hoher Gefäßdichte und (4) zentraler Nekrosezone durchgeführt. Dazu wurde pro Gesichtsfeld an benachbarten Gefäßen die kürzeste Verbindungsstrecke von luminaler Endothelseite zu luminaler Endothelseite mit Hilfe einer linearen Messfunktion markiert und anschließend das arithmetische Mittel errechnet.

4.6 Statistische Methoden, Darstellung und Berechnungen

Die Ergebnisse sind in Text und Abbildungen als Median wiedergegeben, sofern keine andere Angabe vermerkt ist. Die statistische Auswertung erfolgte bis auf die angegebenen Ausnahmen mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 10.0 (SPSS Inc., 1999). Als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner 0,05 festgelegt. Zur graphischen Darstellung wurden mit Hilfe von SPSS 10.0 Boxplots angefertigt. Außerdem wurden Übersichtsgraphiken mit Hilfe von Microsoft Excel erstellt.

4.6.1 MRT-Daten

Die ermittelten Signalintensitäten wurden zunächst in eine Excel-Tabelle übertragen. Für die weitere Auswertung wurden die gemessenen absoluten Werte verwendet, die aufgrund der immer gleichen Receiverabstimmung des MR-Tomographen vergleichbar sind. Ausgehend von diesen absoluten Werten wurden die relativen Signalintensitäten, also die prozentuale Abweichung des jeweiligen Wertes vom Nullwert (präkontrast), geprüft. Die prozentualen Werte wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{relative Signalintensität } SI_{\text{rel}} (\%) = a * 100/n - 100$$

wobei a den entsprechenden Originalwert darstellt und n den Nullwert.

Diese Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 10.0 durchgeführt. Der Nullwert wurde durch die Bildung des Mittelwertes aus den ersten vier Messungen definiert, welche ohne Kontrastmittel durchgeführt wurden. Der relativierte Präkontrastwert beträgt also immer 0 %, während Signalintensitätsanstiege SI_{rel} -Werte von > 0 % und Signalintensitätsverluste SI_{rel} - Werte von < 0 % aufweisen. Der Vergleich zwischen den gemessenen Zonen und Kontrastmitteln erfolgte mittels Wilcoxon-Test.

Die Zeitpunkte der Messung „präkontrast“ 0 s und „Endwert“ 42 min sind absolute Zeitwerte. Die Zeitpunkte für „Minimum“ und „Maximum“ sind als Median angegeben. Dieser wurde aus den Zeitwerten des „Minimums“ und „Maximums“, die in den jeweiligen Messungen pro Tier ermittelten wurden, berechnet.

4.6.2 Statistische Auswertung der Druckmessungen

Die gemessenen Druckwerte der gültigen Messungen wurden zunächst aus dem Programm Hämodyn[®] in eine Excel-Tabelle übertragen. Zur weiteren Verwendung gelangten jeweils die 20 Werte, welche an einer mm-Marke zur Zeit des eingependelten Niveaus gemessen wurden. Da hier minimale Schwankungen vorhanden sind, wurde aus diesen Werten der Mittelwert berechnet. So ergibt sich pro Millimeter jeweils ein Druckwert. Im Weiteren wurde das Verhalten dieser Werte zum Ausgangswert geprüft. Die Ergebnisse der Messungen an Millimeter 1 bis 8 wurden mit Hilfe einer nicht parametrischen Varianzanalyse auf Trend getestet (Brunner, 1999). Unter Verwendung von SAS Release 8.02 wurden die relativen Effekte berechnet und graphisch mit Hilfe von Excel-Diagrammen dargestellt. Der relative Effekt P_i gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass eine Messung in der Tiefe i größer ist als der Durchschnitt aller Messungen bei allen Tiefen. Relative Effekte $< 0,5$ sagen aus, dass der entsprechende Wert unter der ermittelten Durchschnittskurve liegt, relative Effekte $> 0,5$ sagen aus, dass der entsprechende Wert über der ermittelten Durchschnittskurve liegt.