

Aus dem Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Prüfung und Etablierung stereologischer Methoden zur  
Quantifizierung histomorphologischer Strukturen in  
experimentellen Tumoren**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Silke Anja Müller  
Tierärztin  
aus Berlin

Berlin 2008  
Journal-Nr.: 3270

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Hr. Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg  
Erster Gutachter: Fr. PD Dr. Anja Sterner-Kock  
Zweiter Gutachter: Hr. Prof. Dr. Matthias Bräutigam  
Dritter Gutachter: Hr. Univ.-Prof. Dr. Karl Dietrich Weyrauch

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

mice, mice, nude (MeSH), blood vessels, angiogenesis, neoplasms, neoplasms,  
experimental (MeSH), microscopy, volume, quantitative analysis, morphometrics,  
diagnostic imaging (MeSH), lasers, contrast media, anisotropy (MeSH),  
immunohistochemistry

Tag der Promotion: 27.02.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-559-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder  
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in  
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,  
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch  
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der  
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von  
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written  
authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

**Probleme kann man niemals mit derselben Denkweise lösen,  
durch die sie entstanden sind.**

Albert Einstein



# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURTEIL</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Die Bedeutung der Maus in der onkologischen Forschung</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2</b>	<b>Angiogenese</b> .....	<b>6</b>
2.2.1	Physiologische Angiogenese .....	6
2.2.2	Pathologische Angiogenese (und deren Relevanz bei Tumoren) .....	7
<b>2.3</b>	<b>Klassische Quantifizierungsmethoden zur Charakterisierung von malignen Tumoren</b> .....	<b>10</b>
2.3.1	Klassische makroskopische Quantifizierungsmethoden der TumorgroÙe.....	11
2.3.2	Klassische histologische Quantifizierungsmethoden tumoraler BlutgefäÙe.....	12
2.3.2.1	MVD (microvessel density) Methode nach Weidner .....	12
2.3.2.2	Chalkley Methode .....	14
2.3.2.3	Automatisierte digitalisierte Bildanalyseverfahren .....	14
2.3.2.4	Problematik der hot spot Methoden.....	16
<b>2.4</b>	<b>Stereologische Methoden zur quantitativen Bestimmung dreidimensionaler Strukturen</b> .....	<b>18</b>
2.4.1	Historischer Hintergrund der Stereologie.....	18
2.4.2	Stereologie in der Histologie .....	19
2.4.2.1	Richtigkeit und Präzision .....	20
2.4.2.2	Systematische Fehler nicht stereologischen Ursprungs .....	21
2.4.2.2.1	Gewebeschrumpfung .....	21
2.4.2.3	Systematische, einheitliche, zufällige Probenziehung .....	23
2.4.2.4	Isotrope, einheitliche, zufällige Probenziehung.....	24
2.4.2.4.1	Orientator .....	24
2.4.2.4.2	Isector .....	25
2.4.3	Stereologische Bestimmung des (Tumor-)Volumens nach dem Cavalieri Prinzip.....	26
2.4.3.1	Coefficient of Error (CE) .....	28
2.4.4	Stereologische Quantifizierungsmethoden tubulärer Strukturen (tumoraler BlutgefäÙe).....	31
2.4.4.1	Zweidimensionale Profildichte .....	31
2.4.4.2	Dreidimensionale BlutgefäÙlänge.....	32
2.4.4.3	Diffusionsradius .....	33
<b>2.5</b>	<b>Diagnostische Bildgebung</b> .....	<b>34</b>

## Inhalt

2.5.1	Klassische bildgebende Verfahren.....	35
2.5.2	Optische Technologien für die bildgebende Diagnostik.....	36
2.5.2.1	Kontrastmittel für die optische bildgebende Diagnostik.....	38
2.5.2.1.1	Unspezifische Kontrastmittel.....	38
2.5.2.1.2	Spezifische Kontrastmittel.....	39
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemische Substanzen und Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2</b>	<b>Bestimmung der Isotropie und Anisotropie von Strukturen innerhalb eines Objektes.....</b>	<b>42</b>
3.2.1	Anisotrope und isotrope Modelle.....	42
3.2.1.1	Anisotropes homogenes Plastikblock Model.....	42
3.2.1.2	Anisotropes und isotropes heterogenes Nudel-Agar Model.....	45
3.2.1.3	Untersuchung der Verlaufsrichtung (Isotropie/Anisotropie) der Tumorgefäße.....	48
3.2.1.3.1	Tumore.....	48
3.2.1.3.2	Anfertigung der Tumorschnitte.....	49
3.2.1.3.3	Immunhistochemische Färbung an Paraffinschnitten (CD31).....	51
3.2.1.3.4	Auswertung mittels stereologischer Werkzeuge.....	52
<b>3.3</b>	<b>Einfluss der histologischen Bearbeitung auf die Schrumpfung von Gefrierschnitten (systematische Fehler nicht stereologischen Ursprungs).....</b>	<b>54</b>
3.3.1	Kalibrierung des Kryostats mittels einer Messuhr.....	54
3.3.2	Bemessung der Fläche des Tumorschnittes vor und nach dem Schneide- und Färbeprozess.....	55
3.3.2.1	Hämalaun Färbung.....	56
3.3.2.2	Stereologische Ausmessung der Schnittfläche mittels Zählgitter.....	56
<b>3.4</b>	<b>Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge und deren Übereinstimmung.....</b>	<b>57</b>
3.4.1	Versuchsvorbereitung.....	58
3.4.1.1	Tumore.....	58
3.4.1.2	Gefrierschnitte.....	59
3.4.1.3	Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten mit Färbeautomat (CD31).....	59
3.4.2	Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner.....	60
3.4.3	Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der Methode mittels stereologischer Werkzeuge.....	63
3.4.4	Übereinstimmung der Ergebnisse der Auswertung nach Weidner und der Auswertung mittels stereologischer Werkzeuge.....	66

<b>3.5</b>	<b>Quantifizierung histomorphologischer Strukturen in experimentellen Tumoren mittels stereologischer Methoden in vitro und deren Korrelation mit der in vivo Tumorsignalintensität nach Gabe von optischen Kontrastmitteln</b>	<b>67</b>
3.5.1	Optische Bildgebung - in vivo Versuch	67
3.5.1.1	Tumorzellinokulation	67
3.5.1.2	Tumortragende Tiere	68
3.5.2	Kontrastmittel	69
3.5.3	Nahinfrarot (NIR)-Fluoreszenz-Bildgebung	69
3.5.3.1	NIR-Fluoreszenz-Laser-Imaging Gerät	69
3.5.3.2	Versuchsdurchführung	71
3.5.3.3	Auswertung	72
3.5.4	Mikroskopische Quantifizierung intratumoraler Strukturen mittels stereologischer Methoden - in vitro Versuch	73
3.5.4.1	Gewebekonservierung	73
3.5.4.2	Gefrierschnitte	73
3.5.4.3	Immunhistochemische Färbung ohne Färbeautomat (CD 31)	74
3.5.4.4	Hämalaun-Eosin Färbung	75
3.5.5	Stereologische Untersuchung	76
3.5.5.1	Stereologische Bestimmung der Blutgefäßlänge und des Diffusionsradius	76
3.5.5.2	Stereologische Bestimmung des gesamten, vitalen und nekrotischen Tumorumfanges	78
3.5.5.3	Auswertung der Volumina	80
3.5.5.3.1	Berechnung des Fehlerkoeffizienten CE der einzelnen Tumorumfänge	80
3.5.5.3.2	Berechnung des Fehlerkoeffizienten CE und des Variationskoeffizienten CV für die gesamte Studie	81
3.5.5.4	Auswertung der Blutgefäßlänge	82
3.5.5.5	Auswertung des Diffusionsradius	83
3.5.5.6	Korrelation der Kontrastwerte und der stereologischen Resultate	83
<b>3.6</b>	<b>Statistik</b>	<b>83</b>
3.6.1	Bland-Altman Diagramm	83
3.6.2	Boxplot	84
3.6.3	t-Test	85
3.6.4	Multiple lineare Regression	85
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>86</b>

## Inhalt

<b>4.1</b>	<b>Bestimmung der Isotropie und Anisotropie von Strukturen innerhalb eines Objektes.....</b>	<b>86</b>
4.1.1	Plastikblock- und Nudel-Agar-Modelle .....	86
4.1.2	TumorgefäÙe .....	86
<b>4.2</b>	<b>Einfluss systematischer Fehler nicht stereologischer Ursprungs: Einfluss der histologischen Bearbeitung auf die Schrumpfung des Schnittes .....</b>	<b>87</b>
4.2.1	Kalibrierung des Kryostats mittels einer Messuhr.....	87
4.2.2	Bemessung der Fläche des Tumorschnittes vor und nach dem Schneide- und Färbeprozess.....	88
4.2.2.1	Stereologische Ausmessung der Schnittfläche mittels Zählgitter.....	88
<b>4.3</b>	<b>Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge und deren Übereinstimmung.....</b>	<b>89</b>
4.3.1	Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge anhand wiederholter Auswertung derselben Tumorschnitte .....	89
4.3.1.1	Ergebnisse der wiederholten Auswertung eines Tumorschnittes nach den Kriterien von Weidner.....	89
4.3.1.2	Ergebnisse der wiederholten Auswertung eines Schnittsets mittels stereologischer Werkzeuge.....	90
4.3.2	Übereinstimmung der Ergebnisse der ersten Auswertung nach Weidner und der ersten Auswertung mittels stereologischer Werkzeuge .....	93
4.3.3	Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge anhand mehrerer Auswertungen verschiedener Tumorschnitte .....	94
4.3.3.1	Ergebnisse der Auswertung drei verschiedener Schnitte eines Tumors nach Weidner .....	94
4.3.3.2	Ergebnisse der Auswertung drei verschiedener Schnittsets eines Tumors mittels stereologischer Werkzeuge.....	94
<b>4.4</b>	<b>Quantifizierung histomorphologischer Strukturen in experimentellen Tumoren mittels stereologischer Methoden und deren Korrelation mit der Tumorsignalintensität nach Gabe von optischen Kontrastmitteln.....</b>	<b>97</b>
4.4.1	Tumorsignalintensität nach intravenöser Gabe von optischen Kontrastmitteln .....	97
4.4.2	Quantifizierung pathomorphologischer Strukturen in experimentellen Pankreastumoren mittels stereologischer Methoden .....	99
4.4.2.1	Volumen der Pankreastumore.....	99
4.4.2.2	Nekrotische und vitale Tumolvolumenanteile.....	100

4.4.2.3 Fehlerkoeffizient CE und Variationskoeffizient CV für das gesamte und vitale Tumorvolumen .....	103
4.4.2.4 Blutgefäßlänge und Diffusionsradius .....	103
4.4.3 Korrelation zwischen den Kontrastwerten und den stereologischen Werten.....	105
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>109</b>
<b>5.1 Die Bestimmung der Isotropie und Anisotropie von Strukturen .....</b>	<b>110</b>
5.1.1 Anisotrope Modelle: Anisotropes homogenes Plastikblock-Modell und anisotropes heterogenes Nudel-Agar-Modell .....	111
5.1.2 Isotropes heterogenes Nudel-Agar-Modell .....	113
5.1.3 Untersuchung der Verlaufsrichtung (Isotropie/Anisotropie) tumoraler Blutgefäße.....	113
<b>5.2 Relevanz systematischer Fehler nicht stereologischen Ursprungs in der histologischen Probenaufbereitung .....</b>	<b>114</b>
5.2.1 Schrumpfung und Deformation der Gewebes .....	114
5.2.1.1 Kalibrierung des Kryostats mittels einer Messuhr.....	115
5.2.1.2 Bemessung der Fläche des Tumorschnitts vor und nach dem Schneide- und Färbeprozess .....	117
5.2.2 Qualität der immunhistochemischen Färbung .....	119
<b>5.3 Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge und deren Übereinstimmung.....</b>	<b>121</b>
5.3.1 Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner .....	121
5.3.2 Reproduzierbarkeit der Methode mittels stereologischer Werkzeuge .....	125
5.3.3 Übereinstimmung der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge.....	126
<b>5.4 Molekulare diagnostische Studie.....</b>	<b>129</b>
5.4.1 Optische Bildgebung .....	130
5.4.1.1 Kontrastschwankungen.....	130
5.4.2 Quantifizierung mikroskopischer Strukturen und deren Korrelation mit den Kontrastwerten der optischen Bildgebung.....	132
5.4.3 Tierschutz .....	134
<b>6 SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>138</b>
<b>7 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>139</b>
<b>8 SUMMARY .....</b>	<b>141</b>
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>143</b>
<b>10 ANHANG .....</b>	<b>151</b>

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ANG, A	Angiopoetin
A2#22	BON-Angiopoetin-2 Klon 22
A2#6	BON-Angiopoetin-2 Klon 6
BON	Bezeichnung der neuroendokrinen Tumorzelllinie
CD	cluster of differentiation
CE	coefficient of error (Fehlerkoeffizient)
CT	Computer Tomographie
CV	coefficient of variation (Variationskoeffizient)
Cw	Continuous wave (kontinuierliche Wellen)
DAB	3,3 Zoll-Diaminobenzidin
E	Expositionszeit
ED-B	extra Domäne B
f	Frequenz
FK	feuchte Kammer
HE	Hämalaun–Eosin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish Peroxidase)
ICG	Indocyaningrün
IUR	isotropic uniform random (isotrop, einheitlich, zufällig)
KG	Körpergewicht
<i>L</i>	Leistungsdichte
lg	logarithmiert, Logarithmus zur Basis 10, dekadischer Logarithmus
LSAB	labelled Streptavidin Biotin (markiertes/gekoppeltes Streptavidin Biotin)
M	Mock
M#23	BON-Mock Klon 23
M#22	BON-Mock Klon 22
min	Minute
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
MVD	microvessel density
NET	neuroendokrine Tumorzelllinie
NIR	Nah-Infrarot

OCV	observed coefficient of variation („beobachteter“ Variationskoeffizient der gesamten Studie)
PBS	phosphate buffered saline (gepuffertes Phosphatsalz)
PET	Positron Emmissions Tomographie
Pkt.	Punkt
PpIX	Protoporphyrin IX
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RT	Raumtemperatur
(S)ABC	(Strept)Avidin-Biotin-Complex ((Strept)Avidin-Biotin-Komplex)
sek	Sekunde
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomographie
SUR	systematic uniform random (systematisch, einheitlich, zufällig)
syn	Synonym
Tab.	Tabelle
TBS	tris buffered saline
TSC	tetrasulfonated carbocyanine-maleimide
US	Ultraschall
VE	vollständig entsalzt, destilliert
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
vWF	von Willebrand Faktor (Faktor VIII verwandtes Antigen)
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
$\lambda$	Wellenlänge
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional



# 1 EINLEITUNG

Die Krebserkrankung stellt in den hochindustrialisierten Ländern nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Allein in Deutschland sterben jährlich ca. 209.500 Menschen an Krebs und bei ca. 426.050 Menschen treten Neuerkrankungen auf [1]. Die häufigsten Tumore sind in der Brustdrüse der Frau und der Prostata des Mannes zu finden. Bei Kindern tritt die Leukämie als häufigste Krebserkrankung in den Vordergrund [1]. Tumorerkrankungen kommen außer beim Menschen auch bei allen Haus- und Wildtieren vor. Die statistische Auswertung der Daten für diese Lebewesen ist schwieriger, da diese hauptsächlich auf Operations- und Sektionsbefunden beruhen. Die häufigsten Krebserkrankungen treten beim Hund auf, gefolgt von Pferd, Katze und Rind [2].

Derzeitige Therapiemöglichkeiten basieren vorwiegend auf operativen Eingriffen, aber auch auf der Chemo-, Strahlen- und Immuntherapie, die jedoch oft mit unerwünschten Nebenwirkungen und Symptomen wie Schmerz, Übelkeit, Erbrechen und dem „Fatigue“-Symptom (lähmende Müdigkeit und völlige Erschöpfung) verbunden sind [3]. Der Therapieerfolg hängt überwiegend davon ab, in welchem Stadium der Krebs erkannt wird. Je früher diese Erkrankung diagnostiziert wird, desto höher sind die Heilungschancen.

Für die Krebsfrüherkennung gibt es in der Humanmedizin spezielle Vorsorgeuntersuchungen, die aber nur für wenige Krebsarten existieren, wie beispielsweise das Mammographie-Screening bei der Brustkrebsvorsorge. Die Diagnostik wird jedoch durch die Empfindlichkeit der Geräte limitiert, so dass beispielsweise Tumore erst ab einer bestimmten Größe und kleine Metastasen gar nicht detektiert werden können. Zudem ist die Röntgenmammographie auch mit einer Strahlenexposition für die Patientinnen verbunden. Für die meisten Krebsarten wie beispielsweise dem Pankreaskarzinom, das zwar nur 3% aller Krebserkrankungen ausmacht, aber für 6,1% aller Krebstodesfälle verantwortlich ist, gibt es derzeit keine diagnostischen Werkzeuge zur Früherkennung [1].

Aufgrund der derzeit begrenzten diagnostischen und auch therapeutischen Möglichkeiten im Bereich der Krebserkrankung und der dadurch bedingten, alarmierend hohen Todes- und Erkrankungsrate, besteht dringender Bedarf den Fortschritt der onkologischen Forschung weiter voran zu treiben. Die Aufklärung und das Verständnis der Biologie des Tumors trägt hierfür maßgeblich zum Erfolg bei. Die Forschung konzentriert sich dabei aktuell auf die Aufklärung der biologischen Mechanismen des Tumors wie beispielsweise

## Einleitung

Tumorgefäßbildung, Apoptose, Zellproliferation, Metastasierung und Hormon- und Geneinfluss. Die meisten dieser biologischen Verhaltensweisen sind in fast allen der über 200 verschiedenen Tumortypen zu finden [4]. Deutliche Fortschritte wurden in den letzten Jahren in der Aufklärung der Tumorangiogenese gemacht. So beschrieb Folkman 1971, dass das Tumorwachstum von der tumoralen Blutgefäßbildung (Angiogenese) abhängig sei und eine Blockierung der Angiogenese eine Therapiemöglichkeit zur Eindämmung des Tumorwachstums sein könnte [5]. Seit diesem Zeitpunkt wurde der Bereich der Krebsforschung, der sich mit der intratumoralen Vaskularisation beschäftigt, stark stimuliert und die Suche nach pro- und anti-angiogenen Molekülen vorangetrieben [6]. Die Tatsache, dass bis heute bereits 27 endogene Angiogeneseinhibitoren identifiziert worden sind und in 29 Staaten Angiogeneseinhibitoren für den Menschen zugelassen sind, demonstriert den erfolgreichen Entwicklungsprozess [4]. Die fortschreitende Aufklärung der komplexen Vorgänge der Tumorangiogenese hat sich ebenfalls auf die onkologische Diagnostik ausgewirkt. Nicht-invasive Bildgebungsverfahren sind sowohl in der klinischen als auch präklinischen Onkologie zur Tumordetektion oder Therapieverlaufskontrolle fest etabliert, so dass technologische Verfahren wie MRT (Magnet Resonanz Tomographie), CT (Computer Tomographie), PET (Positron Emmissions Tomographie) und Ultraschall auch schon in der Routine diagnostisch zur tumoralen Blutgefäßbestimmung eingesetzt werden, um den Blutfluss, das Blutvolumen und die Gefäßpermeabilität, oft unter dem Einsatz von Kontrastmitteln, zu definieren [7]. Neben den klassischen Ansätzen in der bildgebenden Diagnostik, die zur Darstellung morphologischer und funktioneller Veränderungen dienen, bietet das neuere Gebiet der molekularen Diagnostik die Möglichkeit Veränderungen bereits auf zellulärer und molekularer Basis zu visualisieren. Dies ermöglicht, neben einer sensitiveren und spezifischeren Diagnostik, auch eine sehr frühe Kontrolle des Therapieeffektes und somit auch einen frühen und schnellen Wechsel der Therapie bei so genannten Nonrespondern (nicht auf die Therapie ansprechende Patienten). Neben der bereits klinisch etablierten PET besitzt die optische Bildgebung ein hohes Potential in naher Zukunft als weitere molekulare Bildgebungstechnologie dem Menschen zur Verfügung zu stehen. Die optische Bildgebung stellt eine der neuen hoffnungsvollen Technologien dar und hat in den letzten Jahren deutlich an Bedeutung gewonnen, nicht zuletzt durch die Möglichkeit der Kopplung von tumorspezifischen Antikörpern an Fluoreszenzfarbstoffe [8].

Neben den modernen, diagnostischen Verfahren, tragen insbesondere histologische Analysen zur Aufklärung der komplexen Vorgänge der tumoralen Entwicklung bzw. Angiogenese bei. Die pharmakologische Testung neuer Substanzen für die Tumordiagnostik und -therapie erfordert unter anderem eine histo-morphologische Untersuchung der in der Studie verwendeten Tumore, so dass die Effizienz der verwendeten

Substanz verifiziert und mit den histologischen Resultaten korreliert werden kann. Die histologische Auswertung von Tumorgewebe nimmt in der Klinik ebenfalls einen hohen Stellenwert ein. Deshalb sind verlässliche Resultate aus den histo-morphologischen Untersuchungen sowohl für den präklinischen als auch klinischen Bereich von großer Bedeutung. Die Auswertungen basieren jedoch gewöhnlich auf qualitativen und semi-quantitativen Verfahren. Methoden, die aussagekräftige, quantitative Daten intratumoraler Strukturen liefern, würden daher den Wert der Studie erheblich erhöhen. Dafür bieten sich stereologische Methoden an, die auf robusten mathematischen, statistischen Daten beruhen und quantitative Daten mikroskopischer dreidimensionaler Strukturen eines Objekts liefern, die hauptsächlich auf der Analyse zweidimensionaler Schnitte beruhen. Diese Verfahren bieten sich daher für die Quantifizierung histomorphologischer Strukturen in Tumoren an.

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Testung und Etablierung von stereologischen Methoden zur mikroskopischen Quantifizierung dreidimensionaler Strukturen von Tumoren. Hierfür wird zunächst an Modellen die Isotropie und Anisotropie von Strukturen simuliert und deren Bedeutung herausgearbeitet. Darauf aufbauend wird die Isotropie tumoraler Blutgefäße bezüglich stereologischer Methoden untersucht. Zusätzlich wird der Einfluss der histologischen Aufarbeitung der Tumore auf deren Schrumpfung bzw. Deformation, die die quantitative mikroskopische Analyse beeinflussen könnte, untersucht. Daraufhin wird anhand der tumoralen Blutgefäßquantifizierung die Reproduzierbarkeit der stereologischen Methode und der klassischen MVD (microvessel density) Methode nach Weidner ermittelt und beide Methoden miteinander verglichen. Abschließend werden histomorphologische Strukturen in experimentellen Pankreaskarzinomen mittels stereologischer Methoden *in vitro* ausgewertet. Diese Resultate werden mit davor erhobenen *in vivo* Daten, der Tumorsignalintensität nach Gabe von optischen Kontrastmittel, korreliert. Hierfür wurden tumortragende Mäuse in zwei Gruppen eingeteilt, wobei die erste Gruppe mit dem unspezifischen Kontrastmittel TSC und die zweite Gruppe mit dem gefäßspezifischen Kontrastmittel AP39-TSC behandelt wurde. Die Tumorsignalintensitäten werden mittels NIR (Nah-Infrarot) Laser ermittelt. Anschließend werden die gesamte Tumorgefäßlänge und die Volumina der nekrotischen und intakten Tumorbereiche jedes Tumors mikroskopisch mittels stereologischer Methoden *in vitro* quantifiziert. Die histologischen Resultate werden dann mit den *in vivo* Daten korreliert.

## 2 LITERATURTEIL

### 2.1 Die Bedeutung der Maus in der onkologischen Forschung

Nach Ausführungen von Kim [9] werden Mäuse seit 1894 in der onkologischen Forschung verwendet. Bei diesen ersten Tumormodellen wurden Tumore der einen Maus auf ein anderes Tier der selben Spezies transplantiert und anschließend Therapiestudien durchgeführt. In den folgenden Jahren begann der Aufbau so genannter Inzucht-Stämme. Es wurden Mäuse für die Zucht verwendet, die prädisponiert waren, spontan Tumore zu entwickeln. Dadurch entstanden zahlreiche durch Inzucht erzeugte Stämme, so dass eine große Anzahl unterschiedlicher Tumortypen zur Verfügung stand, an denen das Wachstum und die Eigenschaften des jeweiligen Tumors untersucht werden konnten [9].

Seit 1905 wurde bereits versucht, fremdes Gewebematerial auf Mäuse zu transplantieren. Diese so genannten Xenotransplantate waren jedoch aufgrund der immunologischen Abstoßungsreaktion der Maus nicht erfolgreich. Um eine Fremdtransplantation humaner Tumore auf die Tiere zu ermöglichen, mussten zusätzliche Maßnahmen durchgeführt werden. Diese bestanden meist darin, das Immunsystem des Empfängertieres wie beispielsweise durch Kortisongabe oder Thymektomie so stark zu schwächen, dass das Xenotransplantat nicht abgestoßen werden konnte. Eine weitere Möglichkeit war, das fremde Tumormaterial in neu geborene Mäuse zu transplantieren, die noch nicht über ein vollständig ausgebildetes Immunsystem verfügen. Trotz der Entwicklung neuer Techniken, die das Immunsystem der Mäuse regulierten, war es nicht möglich die immune Abstoßungsreaktion vollständig zu unterdrücken [10].

Im Jahre 1962 folgte dann eine der bedeutsamsten Entdeckungen der onkologischen Mausmodelle. Die immundefiziente, haarlose Nacktmaus wurde entdeckt, die die Eigenschaft besitzt, Tumortransplantate einer anderen Spezies nicht abzustoßen. Dies beruht auf dem fehlenden Thymus, den dadurch fehlenden T-Zellen und somit ausbleibenden körpereigenen Abstoßungsreaktion in diesen Mäusen, verursacht durch das so genannte „nu“ Gen. Das rezessive „nu“ Gen wurde seit diesem Zeitpunkt in vielen anderen Inzucht-Stämmen von Mäusen eingesetzt [9].

In den 80er Jahren (1983) wurden Mäuse mit so genannter *severe combined immune deficiency* (SCID) entdeckt, die eine stärkere Immundefizienz aufwiesen als die Nacktmäuse. Diesen so genannten SCID Mäusen fehlen neben den T-Zellen auch noch die B-Zellen. Auf diese SCID Mäuse können Tumore einer anderen Spezies noch erfolgreicher ohne

Abstoßungsreaktion transplantiert werden. Zusätzlich ist es sogar möglich, so genannte Hybridoma Zellen in SCID Mäusen wachsen zu lassen. Hybridoma Zellen sind Zellen, die durch die Fusion Antikörper-produzierender Zellen mit Tumorzellen entstanden sind und eine kontinuierliche Antikörperproduktion ermöglichen. Diese „scid“ Mutation wurde seitdem in zahlreiche andere Mausstämme übertragen bzw. integriert und mit anderen genetischen Defekten in einem Tier kombiniert [9-11].

Am Ende der 80er Jahre kam es durch die Entwicklung transgener Mäuse zu einem weiteren Durchbruch in der onkologischen Tiermodellentwicklung. Transgene Mäuse entstehen durch genetisch veränderte Embryonen. Hierfür wird ein Gen (z. B. ein Onkogen) oder eine Kombination unterschiedlicher Gene in die sich entwickelnde Oozyste microinjiziert. Die genetische Manipulation führt dann zu der jeweiligen biologischen Veränderung in der Maus. Beispielsweise führt ein Onkogen oder das Ausschalten eines Tumorsuppressorgens zu der Entwicklung eines Tumors, so dass in einem bestimmten Organ ein Tumor induziert werden konnte und das initiale Tumorstadium untersucht werden kann [9]. Der Vorteil des definierten Genhaushalts birgt jedoch den Nachteil, dass sich die induzierten Tumore sehr asynchron entwickeln. Daher werden diese Mausmodelle vorwiegend als Quelle für Tumorzellen verwendet, die dann in Wildtyp-Mäuse transplantiert werden können, in denen sich die Tumore synchroner ausbilden [12].

Es existieren inzwischen unterschiedlichste Transplantationstechniken, durch die tumorales Fremdgewebe auf die immundefiziente Maus übertragen werden kann. Neben der häufig eingesetzten subkutanen Transplantation bzw. Inokulation von Tumorzellen insbesondere in die seitliche Brustwand, auf den Rücken oder in die Inguinalgegend, existieren zahlreiche orthotope Transplantationstechniken. Hier seien genannt die intramuskuläre, intraperitoneale, intravenöse, intrazerebrale, intrahepatische Methodik oder die Inokulation von Tumorzellen unter die Nieren- oder Milzkapsel. Es soll nochmal erwähnt werden, dass zu den heutigen Standardtechniken der Onkologie auch die bereits oben erwähnten transgenen Tiermodelle gehören, die durch molekularbiologische Methoden Tumore entwickeln [10, 13].

*Subkutanes/Orthotopes Modell:* Eine subkutane (unter die Haut) Inokulation von Tumorzellen in ein Mausmodell birgt den Vorteil, dass das Tumorstadium beobachtet und die Größe per Schieblehre bestimmt werden kann. Dafür wird gewöhnlich die Breite und Länge ausgemessen und die Tumoorfläche berechnet. Die antitumorale Effizienz eines Medikaments kann somit anhand der Tumorstadium zu bestimmten Zeitpunkten definiert werden. Beim orthotopen Modell werden die Tumorzellen in das Organ der Maus inokuliert, von dem die

## Literaturteil

Tumorzellen ursprünglich abstammen. Somit gewährt das orthotope im Gegensatz zum subkutanen Modell nicht nur in höherem Maße die natürliche biologische Tumorumgebung, sondern auch ein höheres Metastasierungspotential [12]. Es konnte beispielsweise in einer Studie gezeigt werden, dass eine orthotope Inokulation von humanen pankreatischen Tumorzellen in die Bauchspeicheldrüse von immundefizienten Mäusen, im Gegensatz zur subkutanen Transplantation, zu einem extensiven lokalen Tumorstadium führt, das sich invasiv in die benachbarten Organe ausbreiten kann [14]. Zusätzlich besitzt dieser orthotope experimentelle Tumor ein Metastasierungspotential, das bei den subkutanen Pankreastumoren nicht zu beobachten war [14]. In einer anderen Studie wurde beschrieben, dass bestimmte Prostata-Zelllinien im Gegensatz zur subkutanen Inokulation nur orthotop implantiert zu einem Tumor herangewachsen sind [12]. Die Lokalisation der Xenografts kann daher deren Sensibilität auf ein Therapeutikum ebenfalls beeinflussen. Die orthotope Tumorzellinokulation beinhaltet jedoch den Nachteil, dass den Tieren in der Regel ein chirurgischer Eingriff, der mit einer Narkose vorgenommen werden muss, zugemutet wird. Bei der subkutanen Inokulation wird das Versuchstier lediglich durch den Einstich der Nadel in seinem Wohlbefinden kurzzeitig beeinträchtigt. Ein weiterer Nachteil des orthotopen Modells ist, dass das Tumorstadium nicht beobachtet und manuell ausgemessen werden kann. Es wird daher eine größere Tierzahl benötigt, wenn die Tumorstadiume zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt werden soll, da die Entnahme der Tumore für eine manuelle Ausmessung unumgänglich ist. Um der ex vivo Messung zu entgehen und um die Tieranzahl zu reduzieren, sollten daher jüngst eingeführte Kleintierbildgebungstechnologien wie beispielsweise Ultraschall, Magnetresonanztomographie, Computertomographie, Biolumineszenztechnologien zur Bestimmung der Tumorstadiume orthotoper Tumore eingesetzt werden.

## 2.2 Angiogenese

### 2.2.1 Physiologische Angiogenese

In der embryonalen Entwicklung werden in der so genannten Phase der Vaskulogenese Blutgefäße *de novo* aus endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten) gebildet. Durch die Proliferation der Angioblasten wird ein primitives Netz aus Gefäßen gebildet, so dass ein so genannter primärer Kapillarplexus entsteht. Nach diesem Entwicklungsschritt wird die weitere Blutgefäßentwicklung von der Angiogenese (grch. Blutgefäßentstehung) übernommen, bei der dieser Plexus durch Sprossungs- und Verästelungsprozesse remodelliert wird, damit aus dem bereits existierenden Netz neue Blutgefäße entstehen.

In der adulten Phase sind Angiogeneseprozesse u. a. noch bei der physiologischen Wundheilung und innerhalb des Ovarialzyklus zu finden. Die Angiogenese ist ein strikt geordneter, regulierter Prozess, der auf den Bedarf des bestimmten Organs und Gewebes genau abgestimmt ist [15]. Dieser umfasst nicht nur das Wachstum, sondern auch die Regression von Blutgefäßen und wird auf molekularer und genetischer Ebene durch komplexe Interaktionen reguliert [16], an denen viele verschiedene Wachstumsfaktoren und Membran gebundene Moleküle beteiligt sind. An der physiologischen Angiogenese sind beispielsweise vaskuläre endothelspezifische Wachstumsfaktoren beteiligt, zu denen die Mitglieder der VEGF- (vascular endothelial growth factor), der Angiopoietin- und der Ephrin-Familie gehören [17]. Der erste charakterisierte und zu den wichtigsten gefäßspezifischen Wachstumsfaktoren gehörende ist der VEGF, der die Formation der unreifen Blutgefäße während der Vaskulogenese oder der Angiogenese initiiert [17]. Dieser Faktor kann u. a. die Endothelzellpermeabilität erhöhen und die Endothelzellproliferation stimulieren [15]. Das ausbalancierte Zusammenspiel mehrerer Komponenten pro- und antiangiogener Substanzen führt zu einer kontrollierten, geordneten Blutgefäßneubildung, die aus einem bereits vorhandenen Blutgefäß durch Verästelungs- und Sprossungsprozesse hervorgeht. Bei der Angiogenese wird beispielsweise zunächst die Entfernung der muralen Zellen (Perizyten) an der zukünftigen Verästelungsstelle des Gefäßes induziert, um eine Sprossung eines neuen Gefäßes zu ermöglichen. Anschließend werden die endotheliale Basalmembran und die extrazelluläre Matrix durch spezielle Proteasen ab- und umgebaut. Nach diesem Regressionsprozess sorgen Stromazellen für die Synthese neuer Matrixbestandteile, die wiederum mit Hilfe von Wachstumsfaktoren die Migration und Proliferation der Endothelzellen fördern. Dabei ordnen sich die Endothelzellen einschichtig aneinander, um einen Tubulus zu formen, um den sich erneut Perizyten legen. Die Angiogenese schließt mit dem Einfluss des Blutes in das entstandene Blutgefäß ab [15].

Der hoch organisierte Angiogeneseprozess garantiert eine hierarchische Anordnung der Gefäße, so dass der Blutfluss stets von der Arteriole über die Kapillare zur Venole verläuft (siehe Abbildung 1a). Alle Blutgefäße der Mikrozirkulation zeichnen sich somit durch ein gleiches Aufbauprinzip aus. Die Unterschiede liegen lediglich in der Spezialisierung des jeweiligen Mikroblutgefäßes, die von der Funktion des Organs abhängig ist [18]. Die Kapillaren der Leber sind beispielsweise fenestriert (Lebersinusoid). Dadurch kann insbesondere der Austausch von Giftstoffen gewährleistet werden.

### **2.2.2 Pathologische Angiogenese (und deren Relevanz bei Tumoren)**

Die pathologische Angiogenese kann insbesondere in Tumoren, aber auch in den verschiedensten ischämischen und entzündlichen Krankheitsprozessen (z.B. Atherosklerose,

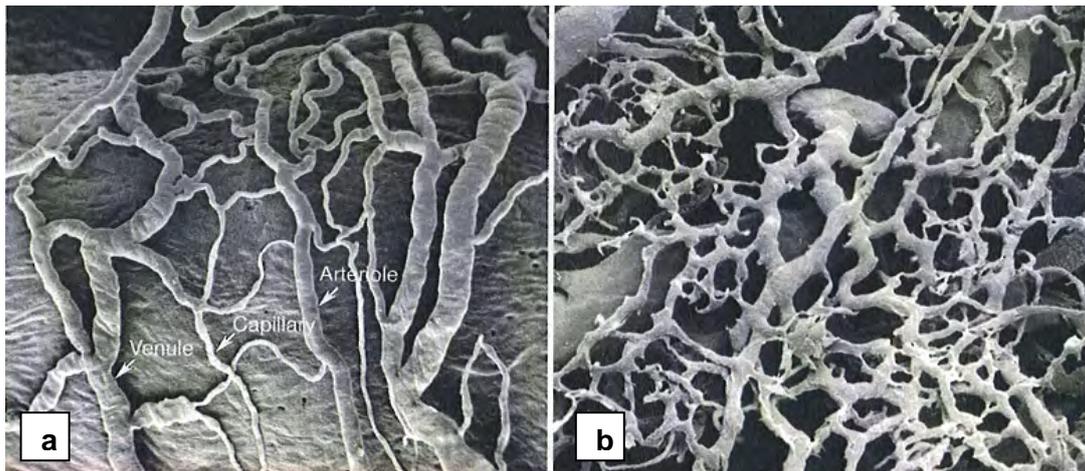
## Literaturteil

Diabetes) beobachtet werden [6]. Die tumorale Blutgefäßbildung gewann an Bedeutung als Folckman 1971 feststellte, dass das Tumorwachstum angiogeneseabhängig sei [5]. Die Tumorgenese beginnt zunächst mit einem Verlust der normalen Kontrolle der Zellproliferation. Dabei werden die Tumorzellen durch Onkogene zur Proliferation angeregt und Apoptoseprozesse gleichzeitig reduziert [4]. Die meist kugelförmig wachsenden Tumore können aber ohne eigene Blutversorgung nur einen Durchmesser von wenigen Millimetern (ca. 1-2 mm) erreichen, da eine adäquate Nährstoff- und Sauerstoffversorgung durch Diffusion über diese Größe hinaus insbesondere für die zentralen Bereiche nicht mehr gewährleistet ist. In der prävasculären Phase stellt der Primärtumor kaum eine Gefahr für den Patienten dar, da dieser nur sehr langsam wächst und aufgrund des fehlenden Blutgefäßsystems kaum Metastasierungsrisiko besteht, das die Metastasen leicht in andere Körperregionen abschwemmen könnte [19]. Stellt sich aber nach der prävasculären Phase die vasculäre Phase durch die Induktion der Angiogenese ein, dann weitet der Tumor seine Zellpopulation rapide aus und besitzt ein hohes Metastasierungspotential [4, 19]. Diese Tumorexpanansion wird nicht nur durch die hinreichende Nährstoff- und Sauerstoffversorgung gefördert, sondern auch durch Wachstumsfaktoren, die von proliferierenden Endothelzellen abgegeben und stimuliert werden. Bei der pathologischen Angiogenese treten viele Faktoren, die bei der physiologischen Angiogenese eine Rolle spielen, wieder auf. Der Blutgefäßbildungsablauf verläuft jedoch unkontrolliert und die einzelnen Faktoren sind nicht mehr aufeinander abgestimmt, so dass sich die Funktionsmechanismen dadurch verändern. So ist beispielsweise der VEGF in den meisten humanen Tumoren überreguliert und wird auch von vielen Tumorzellen sezerniert [15]. Hauptursache für den Wechsel von der prävasculären in die vasculäre Phase ist eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen angiogenen Stimulatoren und Inhibitoren [19]. Diese pro- und antiangiogenen Moleküle können von Tumor- oder physiologischem Gewebe stammen. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den antiangiogenen und angiogenen Faktoren kann von den verschiedensten Umständen ausgelöst werden wie metabolischem Stress (z. B. geringer pH-Wert), mechanischem Stress (z. B. Druckentstehung durch proliferierende Zellen), Immun- und Entzündungsreaktionen (z. B. in das Gewebe infiltrierende Entzündungszellen) und genetischen Mutationen (z. B. Ausschaltung von Tumor unterdrückenden Genen, die die Produktion der Angiogeneseregulatoren kontrollieren). Die umgebungsbedingten und genetischen Mechanismen, die die Angiogenese und somit das Tumorwachstum beeinflussen, sind sehr komplex und bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt [6]. In einigen Fällen ist das Wachstum und Proliferieren von Tumorzellen auch ohne Blutgefäßbildung möglich wie beispielsweise bei der Tumoraszites [19].

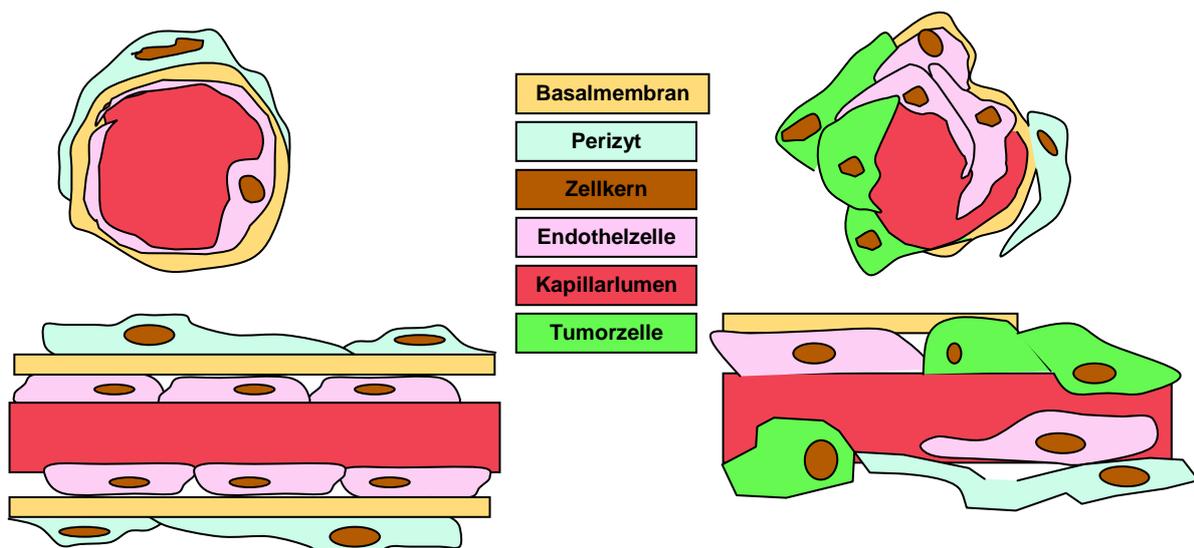
Die Strukturen der Blutgefäße eines Tumors unterscheiden sich durch ihre Abnormalität stark von normalen Gefäßen. Sie sind unorganisiert, gewunden und teilweise dilatiert, wobei sie ungleichmäßige Durchmesser, übermäßige Verästelungen und Shunts aufweisen [6]. Auch existiert keine hierarchische Anordnung von Arteriole, Kapillare, Venole wie es bei der normalen Angiogenese zu beobachten ist (Abbildung 1a, b) [18]. Es ist nicht voraussehbar in welche Richtung die sich windenden Gefäße wachsen, denn es „kann sich von Tag zu Tag ändern“ [20].

Die tumorale Gefäßwand ist im Gegensatz zur Wand normaler Gefäße sehr heterogen aufgebaut (Abbildung 2). Die Gefäßinnenwände bestehen nicht aus homogenen Endothelzellreihen sondern entweder nur aus Tumorzellen oder aus einem Mosaik von Endothel- und Tumorzellen. Zusätzlich besitzen die Endothelzellen eine abnormale Form und wachsen übereinander oder in das Gefäßlumen hinein. Es fehlen teilweise die Basalzellen und an den Gefäßaußenwänden die kontraktilen Zellen (alpha-Aktin positive Muskelzellen, Perizyten). Die Perizyten sind, wenn sie vorhanden sind, nur locker an die Endothelzellen gelagert und in ihrer Funktion eingeschränkt. All diese Eigenschaften tragen zu der hohen Permeabilität der Tumorblutgefäße bei, die auf den zahlreichen Fenstern, Vesikeln und transzellulären Löchern in der Gefäßwand, den erweiterten interendothelialen Verbindungen und der teilweise fehlenden Basalmembran beruht [6]. Die chaotische Architektur führt zu einem heterogenen Blutfluss, durch den wiederum Hypoxie- und Azidosezustände ausgelöst werden [21].

Die tumorale Blutgefäßbildung kann durch unterschiedliche Prozesse erfolgen. Ein Weg ist die Entstehung durch die Sprossung neuer Blutgefäße aus dem existierenden Gefäßbett heraus. Zusätzlich nehmen zirkulierende Endothelvorläuferzellen (Angioblasten), die aus der Gefäßwand oder dem mobilisierten Knochenmark stammen, eine unterstützende Funktion ein. Ein weiterer Weg ist die direkte Anlagerung von Tumorzellen an ein existierendes Blutgefäß, so dass sie eine perivaskuläre Manschette bilden [6].



**Abbildung 1:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gefäßen a) normale Mikrovaskularisation, die hierarchisch organisiert erscheint und Arteriolen, Kapillare (Capillary) und Venolen (Venule) erkennen lässt (Vasa vasorum des carotiden Sinus der Ratte) und b) tumorale Blutgefäße, die unorganisiert sind und keine Gefäßzuordnung ermöglichen (Xenograft eines humanen Tumors in der Nacktmaus). Quelle: D. M Mc Donald und P. L Choyke, 2003 [22]



**Abbildung 2:** Skizze eines Quer- und Längsschnittes durch eine physiologische Kapillare (links) und ein tumorales Blutgefäß (rechts).

### 2.3 Klassische Quantifizierungsmethoden zur Charakterisierung von malignen Tumoren

Auf der Suche nach Verfahren zur Bestimmung des Malignitätsgrades von Tumoren, um die prognostische Aussagekraft für Patienten zu erhöhen, werden vielfältige Verfahren sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* angewendet. Häufig eingesetzte Untersuchungen bei der Diagnostik von Tumoren *in vivo* sind beispielsweise die Palpation des Gewebes, der Einsatz von bildgebende Verfahren (z.B. Computertomografie) und die Entnahme einer Biopsie des erkrankten Gewebes. Die *in vitro* Untersuchungen werden anhand der Biopsie oder des

operativ entfernten Gewebematerials (z.B. Primärtumor, Metastasen, Lymphknoten) durchgeführt und basieren hauptsächlich auf histologischen Analysen. Dabei wird u.a. der Tumortyp, der Malignitätsgrad des Primärtumors, der mitotische Index oder spezifische Proliferationsmarker bestimmt [23]. Eine dominante Rolle nimmt sowohl in den *in vivo* als auch in den *in vitro* Untersuchungen die Quantifizierung der Tumorgröße und der tumoralen Blutgefäße ein.

### **2.3.1 Klassische makroskopische Quantifizierungsmethoden der Tumorgröße**

Die Bestimmung des Tumolvolumens ist ein aussagekräftiges Charakteristikum für die Erfolgskontrolle einer onkologischen Behandlung und liefert für die Prognose eines Patienten wertvolle Informationen. Das „College of American Pathologists“ hat in seiner Stellungnahme 1999 die Tumorgröße aufgrund der publizierten, literarischen Beweiskraft als einen der wichtigsten, klinisch wertvollsten Prognosefaktoren bei der Brustkrebserkrankung eingeordnet [23].

Die Bestimmung der Tumorgröße *in vivo* spielt in der Klinik insbesondere bei der Primärtumordiagnostik und beim Therapiemonitoring eine große Rolle. Die Tumorgröße kann auf verschiedene Weise ermittelt werden, wobei die Methoden meist von der Lage der Tumore abhängig sind. Hauttumore können beispielsweise an der Körperoberfläche mittels Lineal bemessen werden. Brustkarzinome hingegen werden überwiegend durch bildgebenden Technologien dargestellt wie beispielsweise die Röntgen-, MRI-, und Ultraschalluntersuchung und anhand der Bilder bemessen. Die Tumorgößen werden klinisch aber auch *in vitro* definiert. Dabei basiert die Größenbestimmung des chirurgisch entnommenen Tumors überwiegend auf einfachen, manuellen Bemessungen. Jensen beschreibt beispielsweise, dass eine gängige klinische Methode darin besteht, den Tumor auf der Schnittoberfläche zweidimensional zu bemessen [24]. Eine weitere Methode für Brustkrebspatientinnen wird von Ladekarl et. al beschrieben, bei der der größte Durchmesser eines frisch entnommenen Tumors als prognostischer Faktor angegeben wird. Sie weisen in ihrer Arbeit darauf hin, dass der eindimensionale Parameter zwar leicht zu bestimmen ist, aber abhängig von der Form des Tumors und nur schwer in Relation zur dreidimensionalen tatsächlichen Tumorgröße zu setzen ist [25].

Die Bestimmung der Tumorgröße zur Überwachung des Tumorwachstums ist im präklinischen Bereich ebenfalls von hoher Bedeutung. In der Vorklinik wird die Größe eines experimentellen, subkutanen Tumors *in vivo* bestimmt, indem mittels Messschieber die Länge und Breite bemessen wird [12]. Für orthotope experimentelle Tumore hingegen bieten

## Literaturteil

sich bildgebende Verfahren wie beispielsweise Ultraschall- oder CT-Technologien an, um anhand des Bildes mittels computerunterstützten Messwerkzeugen das Tumolvolumen oder die –fläche zu bestimmen [12]. Zur Größenbestimmung *in vitro* wird das Gewicht des frisch entnommenen Tumors per Waage ermittelt und manuell per Messschieber ausgemessen. Dabei sollten stets drei Seiten zur Volumenbestimmung bemessen werden. Da sich ein Tumor auch über sein Metastasierungspotential definiert, ist es notwendig, wenn Metastasen vorliegen, diese auszuwerten. Eine Volumenbestimmung der sehr kleinen Gewebe wird aber meist nicht durchgeführt, sondern eher auf Zählungen der vorgefundenen Metastasen beschränkt [26].

Die individuelle dreidimensionale Form des Tumorgewebes wird sowohl in der Klinik als auch in der Präklinik abhängig von den eingesetzten *in vivo* und *in vitro* Verfahren unterschiedlich stark berücksichtigt. Die meisten erhobenen Tumorgößenparameter basieren auf technischen Modellen und setzen eine konstante Tumorform voraus [25]. Dadurch kann das ermittelte Tumolvolumen unterschiedlich stark vom tatsächlichen Wert abweichen.

### **2.3.2 Klassische histologische Quantifizierungsmethoden tumoraler Blutgefäße**

Folkman beschrieb 1971, dass das Tumorwachstum von der tumoralen Angiogenese abhängig sei und eine Blockierung der Angiogenese zur Eindämmung des Tumorwachstums führen würde [5]. Seit diesem Zeitpunkt ist der Grad der Durchblutung eines Tumors ein wichtiges Kriterium für den Erfolg einer onkologischen Behandlung und die Prognose eines Patienten geworden. Daher hat sich die mikroskopische Bestimmung der Blutgefäßdichte eines Tumors *in vitro* sowohl im klinischen als auch präklinischen Bereich durchgesetzt. Die am häufigsten eingesetzten Methoden beruhen jedoch auf qualitativen bzw. semi-quantitativen Verfahren und werden im folgenden näher beschrieben.

#### **2.3.2.1 MVD (microvessel density) Methode nach Weidner**

Weidner et. al. entwickelten zur Bestimmung der Blutgefäßdichte die sogenannte MVD Methode, die auf der Auswertung sogenannter hot spots beruht. Die technische Durchführung wurde von Weidner 1995 detailliert beschrieben [27]. Zunächst wird ein technisch gut angefertigter und für den ganzen Tumor repräsentativ erscheinender, histologischer Schnitt ausgewählt. Dieser wird mit einem Endothelzellmarker immunhistochemisch gefärbt, so dass sich die Blutgefäße farblich vom übrigen Gewebe absetzen. Bei geringer Vergrößerung (40-100fach) wird der Schnitt mikroskopisch abgefahren und die am stärksten vaskularisiert erscheinende Stelle heraus gesucht. Solche Regionen liegen meist im Randbereich des Tumors [27-32] und stellen den so genannten hot

spot dar. Dieser wird bei einer 200fachen Vergrößerung innerhalb eines Gesichtsfelds von 0,74 mm<sup>2</sup> analysiert. Laut Weidners Definition wird jede gefärbte Endothelzelle oder jeder Endothelzellhaufen als ein Ereignis gezählt, wenn diese von umliegenden Mikrogefäßen, Tumorzellen und anderen verbindenden Gewebeelementen klar abgegrenzt werden können. Es werden auch dann alle Blutgefässereignisse einzeln gezählt, wenn die Anschnitte von scheinbar einem einzigen sich schlängelnden Gefäß stammen, das an mehreren Stellen angeschnitten worden ist. Das Lumen der Blutgefässe und die Erythrozyten hingegen definieren kein Gefäß. Das Resultat ist die microvessel density (MVD), die als höchste Blutgefässanzahl pro Fläche innerhalb eines 0,74 mm<sup>2</sup> Gesichtsfeldes bei 200facher Vergrößerung ausgedrückt wird.

In den ersten Untersuchungen haben Weidner et al. 1991 für invasive Brustkarzinome eine positive Korrelation zwischen der Blutgefässdichte, der so genannten microvessel density (MVD), und dem Metastasierungsrisiko festgestellt [28]. Diese Erkenntnis basierte auf der vorherigen Annahme, dass eine zunehmende Neoangiogenese die Möglichkeit erhöht, dass Metastasen in die Zirkulation gelangen. Zusätzlich zeigte er in einer weiteren Studie über Brustkarzinome, dass sich mit diesem Verfahren die menschliche Überlebens- und Rezidivfreiheits-Rate prognostizieren läßt [33]. Seither ist die MVD Methode (und deren modifizierte Formen) zur Blutgefässdichtenbestimmung zu einer Standardmethode geworden. Die Analyse des hot spots begründet Weidner damit, dass die vaskuläre Aktivität heterogen im Tumor vorzufinden ist und daher die microvessel density in der Region bestimmt werden muss, die die höchste Blutgefässrate aufweist, da die Tumorzellen mit dem höchsten angiogenen Potential die Quellen für Metastasierungen darstellen [33]. Weiterhin führt Weidner aus [34], dass das Tumorwachstum stimuliert wird, wenn eine erhöhte Anzahl von Mikrogefäßen vorliegt. Zusätzlich stellte er die MVD als ein direktes Maß des vaskulären Fensters vor, dass die Tumorzellen passieren müssen, um in andere Körperregionen abschwimmen zu können. Je größer das Fenster ist, desto höher ist auch die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen.

Die Weidnerschen MVD Resultate werden in vielen Studien oft in modifizierter Form als Mittelwert oder als Maximalwert von mehreren ausgezählten hot spots angegeben [30, 35-41]. Zudem entwickelten sich Methoden, die sich auf die Auswertung des hot spots konzentrierten und an der MVD Methode orientierten wie beispielsweise die sogenannte Chalkley Methode.

### 2.3.2.2 Chalkley Methode

Die Chalkley Methode erfolgt inklusive der Auswahl des hotspots nach den Kriterien nach Weidner (siehe Abschnitt 2.3.2.1). Die Blutgefäßszählung unterscheidet sich jedoch dadurch, dass diese bei einer 250fachen Vergrößerung und mit einem 25 Punktegitter (das sogenannte Chalkley grid) mit einer Fläche von 0,156 mm<sup>2</sup> durchgeführt wird. Das Gitter wird dergestalt auf den hot spot platziert, dass die höchste Anzahl an Schnittpunkten zwischen Gitterpunkten und Blutgefäßen erreicht wird. Das Ergebnis stellt somit die höchste Schnittpunktzahl dar. Die Chalkley Methode erlangte ihren Bekanntheitsgrad als Fox et al. 1994 eine positive Korrelation zwischen der Prognose für Patienten mit invasiven Brustkarzinomen und der Blutgefäßsdichte ermittelten [42]. Fox et al. analysierten drei hot spots und gaben deren Mittelwert [42-44] als Endergebnis an, wobei in anderen Studien, in denen man die Chalkley Methode benutzte, die Ergebnisangabe abwich, indem die Summe anstelle des Mittelwertes oder eine andere Anzahl der hotspots herangezogen wurde [45, 46]. Die Chalkley Auswertung wurde in einigen methodischen Vergleichsstudien der MVD nach Weidner gegenüber gestellt und erzielte aufgrund schnellerer und simplerer Durchführung bessere Bewertungen [43, 46, 47].

Vermeulen et al. [47] haben in ihrer Vergleichsstudie (2002), die die Methodik und die Kriterien zur Evaluierung der Angiogenese-Quantifizierung in soliden humanen Tumoren beschreibt, weitere, positive Kriterien für die Chalkley Methode gegenüber der MVD Methode angeführt. Dabei wurde die Chalkley Auswertung für die Voraussage der Überlebensrate bei Brustkrebs im Gegensatz zur MVD nach Weidner als eine geringer vom Betrachter abhängige Methode beschrieben, da sich bei dieser die Entscheidung erübrigt, ob zwei immunhistochemisch gefärbte, sich unklar voneinander abgrenzende, benachbarte Strukturen als ein oder zwei Blutgefäße bewertet werden sollen. Die Auswahl individueller Blutgefäße innerhalb eines Zellhaufens entfällt bei der Chalkley Methode. Zusätzlich wiesen Offersen et al 2003 darauf hin, dass die MVD eine Dichte und die Chalkley Methode eher eine Flächenschätzung darstellt [48].

### 2.3.2.3 Automatisierte digitalisierte Bildanalyseverfahren

Die digitalisierten Bildanalyseverfahren beruhen auf einer automatisierten bzw. semi-automatisierten Erkennung gefärbter, sich farblich von den umliegenden Tumorgewebe absetzenden, immunhistochemisch gefärbten Tumorblutgefäßen. Hierfür wird der Tumorschnitt zunächst eingescannt [49-51]. Anhand des eingescannten Bildes müssen dann bestimmte Einstellungen an den Bildanalyse-Systemen vorgenommen werden, wie beispielsweise die Korrektur des Hintergrunds oder die Optimierung der Schwellenwerte für

die unterschiedlichen Farbtöne [49-52]. Anschließend werden hot spot Regionen [50, 52] oder der komplette Tumorschnitt [49, 51] (überwiegend manuell) definiert, die dann automatisch/semi-automatisch vom Bildanalyse-System ausgewertet werden. Als Ergebnis wird beispielsweise die endotheliale Fläche angegeben, die sich aus dem Verhältnis Blutgefäß gefärbte zu nicht gefärbten Pixeln errechnet [49], der prozentuale Anteil an Blutgefäßprofilen im Verhältnis zur Tumorschnittgesamtläche [50], die Anzahl von Profilen pro Fläche [50], die totale Fläche der Gefäße pro Bild [51] oder die totale gefärbte Fläche, die auf einer Pixelanalyse aller gefärbten Strukturen beruht [43].

Fox et al. (1995) untersuchten ein automatisches Bildanalyseverfahren im Vergleich zur MVD und der Chalkley Methode [43]. Dieses fand seine Einschränkung jedoch darin, dass eine unterstützende manuelle Markierung der Gefäße notwendig war und das Programm die immunhistochemisch gefärbten Endothelzellen nicht hinreichend erkennen konnte. Eine ähnliche Studie führten Erovic et al. (2005) durch, die die manuelle Auszählung der hot spots nach Weidner mit einer Computer-unterstützten Bildanalyse verglichen haben, wobei zwei voneinander unabhängige Untersucher die MVD bestimmt haben und die Bildanalyse zweimal durchgeführt worden ist. Der hot spot wurde für die bildgebende Analyse subjektiv ausgewählt und dem System vorgegeben. Sie stellten fest, dass die automatische Zählung objektiver, zeitsparender und reproduzierbarer war, jedoch auch den Nachteil im Gegensatz zum manuellen Auszählen hatte, dass das System nicht zwischen richtig positiv gefärbten Endothelzellen und falsch positiv gefärbten anderen Zellarten oder Artefakten unterscheiden konnte [52]. Chantrain et al. (2003) führten ebenfalls einen Methodenvergleich durch. Sie werteten zunächst einen histologischen Tumorschnitt mittels MVD Methode aus und untersuchten anschließend den kompletten Schnitt mit einem automatischen Bildanalyseverfahren. Sie kamen zum Ergebnis, dass die automatische Bildanalyse eine geringere Inter-Untersucher-Variabilität aufwies und dem heterogenen Gewebeschnitt am ehesten entsprach [49]. Die Schwäche der automatischen Abgrenzung zwischen Endothelzellen und Artefakten wurde jedoch auch hier wieder kritisiert. Kim et al. (2003) stießen ebenfalls auf diese Problematik und stellten zusätzlich fest, dass eine weitere Ungenauigkeit darin liegt, dass das System Mikrogefäße, die dicht beieinander liegen, nicht hinreichend auseinander halten kann und als eine Einheit zusammen fasst [50]. Srivastava et al. [53] benutzten bereits 1988 in ihrer Studie ein Bildanalyse-System zur Auswertung der Vaskularität von Melanomen. Sie favorisierten wie auch Chantrain et. al [49] und Kim et al. [50] nicht die Zählung einzelner Profile sondern die Flächenauswertung angefärbter endothelialer Bereiche. Dieses Resultat liefert laut deren Untersuchungen für die automatische Bildanalyse aussagekräftigere Werte und stellt daher die Vaskularisation besser dar. Dass die Auswertungsqualität von der Auflösung des Gerätes abhängt,

## Literaturteil

unterstrichen Ronan et al. (2005) in einer Studie, bei der sie einen 2700dpi und einen 4000dpi Schnittscanner miteinander verglichen, wobei das Gerät mit der höheren Auflösung im Gegensatz zum 2700dpi Scanner auch kleinere Gefäße detektieren konnte [51]. Den Nachteil des Zeitaufwandes und der hohen Kosten führten Hasan et al. (2002) an. Zusätzlich bemängelten sie, dass die automatische Zähltechnik noch mit zu vielen Interaktionen zwischen Untersucher und Einstellungen am Gerät einhergeht, so dass der hot spot dem Gerät noch manuell vorgegeben werden muss und die heterogene Gefäßmorphologie und Färbeintensität die Auswertung beeinträchtigen können. Positiv ist jedoch die größere Objektivität, die diese Methode mit sich bringt. Darüber hinaus bietet sie gegenüber der MVD nach Weidner zusätzliche morphometrische Parameter wie beispielsweise die Durchmesser der Gefäße und die Blutgefäßlumenfläche [54].

### 2.3.2.4 Problematik der hot spot Methoden

Es existieren zahlreiche Tumorstudien, die die MVD Methode nach Weidner, die Chalkley Methode oder modifizierte Methoden dieser beiden Verfahren benutzt haben und eine positive Korrelation zwischen der Prognose bzw. prognostischer Faktoren und der Blutgefäßdichte ermitteln konnten [35, 36, 41, 44, 55-58]. Aber es gibt im Gegensatz dazu viele andere Studien, die dies nicht bestätigen [29-31, 37-40, 45, 46, 59, 60]. Diese Diskrepanz wurde für die MVD nach Weidner bereits 1999 im College of American Pathologists Consensus Statement aufgegriffen, in dem verschiedene prognostische Faktoren bezüglich des Brustkrebs aufgrund ihrer publizierten Beweiskraft kategorisiert worden sind [23]. Kategorie eins beinhaltet alle Faktoren, die auf ihre prognostische Bedeutung hin geprüft worden sind und dem klinischen Patientenmanagement nützlich sein werden. Kategorie zwei weist Faktoren auf, die zwar biologisch und klinisch ausreichend studiert worden sind, über die jedoch noch keine hinreichenden statistischen Studien vorliegen. In Kategorie drei sind letztendlich alle anderen Faktoren zu finden, die nicht ausreichend studiert worden sind, um einen prognostischen Wert darzustellen. Die MVD wurde in die letzte Kategorie eingestuft [23], die Tumorgröße und der histologische Tumorgrad hingegen in die erste Kategorie, obwohl Weidner selbst die microvessel density als einen besseren prognostischen Wert als Tumorgröße und Tumorgrad beschreibt [27]. In dem Consensus Statement werden unter anderem als Variationsgründe der MVD die immunhistochemische Färbung, die Zählmethode, die Angabe der Endergebnisse, die Variation und Erfahrung zwischen verschiedenen Betrachtern, die biologische Variation und die Definition eines positiven Resultats angeführt. Die Kategorieeinteilung verschiedener prognostischer Faktoren erfolgte ebenfalls durch das College of American Pathologists für Kolorektale- und Prostatakarzinome [61], jedoch taucht die MVD auch hier weder in der ersten noch in der zweiten Kategorie auf.

Offersen et al. [48] haben 2003 Tumorstudien, in denen sowohl die Chalkley als auch die Weidnersche Methode verwendet worden sind, auf deren gemeinsame Korrelation hin untersucht. Obwohl die Methoden überwiegend miteinander korrelierten, variierte die prognostische Bedeutung mit den verschiedenen Tumortypen (Prostata-, Lungen-, Brust-, Blasenkarzinom) erheblich. Sie beschreiben, dass die Gründe hierfür in methodischen Problematiken zu finden seien und daher beide Methoden für prognostische Aussagen zu unzuverlässig sind. Das bedeutet, dass beispielsweise ein mit diesen Methoden ermittelter hoher Vaskularisationsgrad eines Tumors nicht unbedingt mit einer schlechten Prognose korrelierte. Zusätzlich wiesen sie darauf hin, dass die MVD eine Dichte und die Chalkley Methode eher eine Flächenschätzung darstellt.

Vermeulen et al. [62] hatten 1997 bereits die microvessel density anhand von Brustkarzinomen ausgewertet und den Einfluss der Erfahrung des Untersuchers und der mikroskopischen Feldgröße betrachtet. Sie kamen damals zu der Schlussfolgerung, dass die Auswahl des vaskulären hot spots der variable Faktor ist, der durch verschiedene Untersucher und deren Grad der Ausbildung beeinflusst wird. Die Auszählung eines vordefinierten hot spots hingegen wies weniger Unstimmigkeiten auf. Die Auswertung in einem durch die Vergrößerung bedingtem kleineren mikroskopischen Feld führte nicht zu einer Beeinflussung der prognostischen Aussage.

Hlatky et al. [63] setzten 2002 die MVD-Anwendung in Bezug zur antiangiogenen Therapie. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass, obwohl die MVD ein prognostischer Marker hinsichtlich der Krankheitsstufe, des Metastasierungsrisikos und der Überlebens- und Rezidivrate in unbehandelten Tumoren sei, sie kein Indikator für die therapeutische Effizienz antiangiogener Substanzen und keine Richtlinie für therapeutische Wege darstellt. Laut Hlatky et al. variiert die MVD zwischen den verschiedensten Tumortypen und reflektiert nicht die angiogene Aktivität eines Tumors, sondern eher die interkapilläre Distanz. Diese interkapilläre Distanz stellt aber nicht die metabolischen Ansprüche des Tumorgewebes dar, wie es in normalen Geweben der Fall wäre. Hlatky et al. begründen diese Aussage damit, dass zum einen die angiogenen Faktoren im Tumor unausgeglichen vorliegen und die Blutgefäße unkontrolliert wachsen. Zum anderen hängt die MVD nicht mit der tumoralen Wachstumsrate zusammen. Das bedeutet, dass sich die MVD nicht erhöhen muss, wenn die Gesamtvaskularisation während des Tumorwachstums zunimmt. Vartanian und Weidner (1994) unterstreichen diese Aussage in ihrer Studie, bei der sie herausgefunden haben, dass die MVD weder mit der Endothelzell- noch mit der Tumorzellproliferation zusammen hängt [64]. Hlatky et al. beschreiben weiter, dass der geringere Sauerstoffverbrauch der Tumorzellen und ihre Toleranz gegenüber hypoxischen Zuständen zu einer höheren

## Literaturteil

interkapillären Distanz im Tumorgewebe im Gegensatz zu ihren normalen Pendant-Geweben führen. Die Autoren unterstreichen, dass die MVD den antiangiogenen Therapieeffekt nicht widerspiegeln kann, da sich die MVD während des Prozesses zu stark ändert. Zu Beginn der Inhibition der Blutgefäße nimmt die MVD ab, aber wenn im weiteren Tumorzellen eliminiert werden, erhöht sich die MVD wieder [63].

Die hotspot Methoden sind zwar aufgrund ihrer unzuverlässigen, subjektiven Resultate bis heute sehr umstritten und eignen sich nicht, den angiogenen Status der Tumervaskularisation zu erklären, aber trotzdem werden die hot spot Methoden auch heutzutage noch überwiegend zur Bestimmung der Blutgefäßdichte eingesetzt. Dies liegt zum einen daran, dass sich die Methoden durch ihre einfache und schnelle Durchführung auszeichnen und zum anderen fest in den Laboren etabliert sind. Zusätzlich wird die hot spot Methodik bis heute publiziert und daher in Fachkreisen anerkannt.

## **2.4 Stereologische Methoden zur quantitativen Bestimmung dreidimensionaler Strukturen**

### **2.4.1 Historischer Hintergrund der Stereologie**

Stereologie ist eine interdisziplinäre Wissenschaft, die in den verschiedensten Bereichen wie der Medizin, Biologie, Statistik, Mathematik, Materialwissenschaft, Mineralogie, Geologie, Forst- und Landwirtschaft anzutreffen ist. Die mathematischen Wurzeln der Stereologie reichen bis ins 17. Jahrhundert zurück wie beispielsweise auf die mathematischen Prinzipien von Delesse und Cavalieri [65]. Mouton (2005) berichtet, dass das Wort Stereologie (grch.: Studium der Objekte in 3-D) 1961 durch den Biologen Prof. Hans Elias auf dem so genannten Feldberg-Treffen in Deutschland entstand, bei dem Biologen, Geologen, Ingenieure und Materialwissenschaftler zusammen kamen [66]. Bereits ein Jahr später fand daraufhin der erste offizielle Kongress der „International society for stereology“ statt. Mouton beschreibt weiter, dass seit diesem Zeitpunkt die Stereologie rasante theoretische und praktische Entwicklungsprozesse erfuhr [66]. Heutzutage wird von „design-based“ Stereologie gesprochen, da die Methoden nicht mehr auf Modell-basierenden Annahmen beruhen, sondern auf statistisch und mathematisch robusten Daten, die von speziellen Probenziehungsverfahren geprägt sind [67].

### 2.4.2 Stereologie in der Histologie

In der Histologie stellt die Stereologie ein wertvolles Instrument zur Quantifizierung unterschiedlicher Gewebe dar. Die Stereologie ist ein Set einfacher und effizienter Methoden zur Quantifizierung drei-dimensionaler mikroskopischer Strukturen, die hauptsächlich auf der Auswertung zweidimensionaler Schnitte basieren [68]. Alle zweidimensionalen Bilder beinhalten den Fakt, dass qualitative Informationen der dreidimensionalen Struktur verloren gehen, quantitative Informationen bleiben dagegen erhalten, auch in veränderter Form. Die folgenden Beispiele sollen a) den Verlust qualitativer Informationen und b) die Veränderung quantitativer Informationen verdeutlichen. a) Ein histologischer Schnitt durch einen Podozyten (Ausläuferzelle) beispielsweise, der sich durch zahlreiche Fortsätze auszeichnet, resultiert in vielen nicht miteinander verbundenen Profilen. Die dreidimensionale Form der Zelle ist nicht mehr erkennbar und es kommt daher zu einem qualitativen Informationsverlust. Quantitative Informationen liegen in Form der angeschnittenen Zelle bzw. Zellfortsätze jedoch vor und erscheinen als zweidimensionale Profile auf dem Schnitt. b) Ein weiteres Beispiel ist ein Schnitt durch eine Membran. Je nach dem in welchem Winkel die Membran angeschnitten worden ist, stellt diese sich in einem histologischen Schnitt unterschiedlich dar. Die Membran kann sich beispielsweise dicker darstellen als sie tatsächlich ist, wenn sie schräg angeschnitten worden ist. Daher liegt die quantitative Information, also die Membrandicke, im Schnitt verändert vor [69].

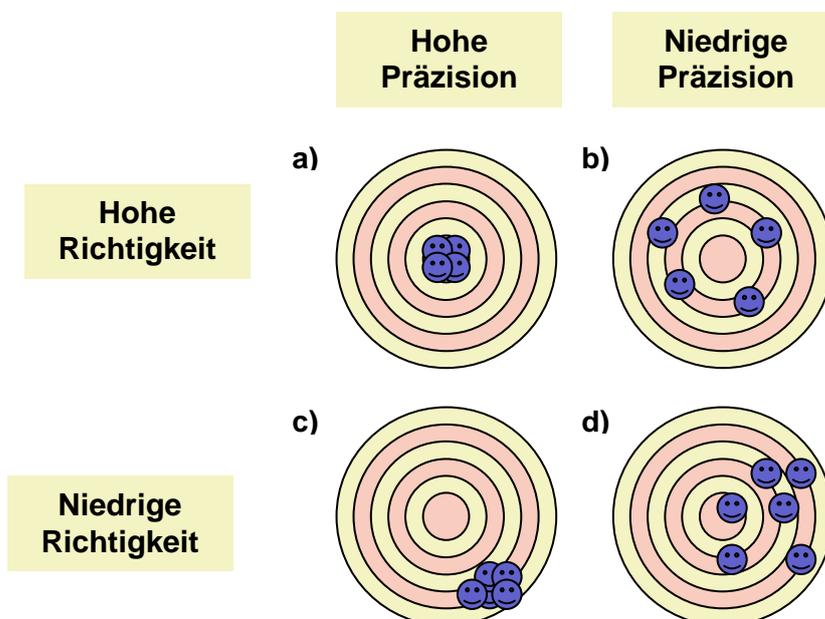
Die stereologischen Methoden nutzen also quantitative Informationen zur Auswertung, die auf statistischen, mathematischen Prinzipien beruhen und für die bestimmte Anforderungen erfüllt werden müssen, um als „unbiased“ (frei von systematischen Fehlern) und „efficient“ (effizient) deklariert werden zu können. Das bedeutet, dass die erhobenen Werte nicht vom wahren Wert systematisch abweichen sollten und die Variabilität des Wertes bei einem angebrachten Zeitaufwand gering sein sollte. Jede stereologische Methode ist mit speziellen Erfordernissen verknüpft, die bereits bei der Auswahl der Proben und der Anfertigung der Schnitte unterschiedlich sein kann [68]. Die stereologischen Ergebnisse stellen Schätzwerte wie beispielsweise des Volumens, der Anzahl, der Länge oder der Oberfläche dar, die aufgrund der Methodendurchführung durch ein hohes Maß an Objektivität ermittelt werden.

Obwohl die quantitative Auswertung mittels stereologischer Methoden exponentiell seit den 60er Jahren in der Literatur zugenommen hat, konnte sie sich in vielen Bereichen noch nicht hinreichend durchsetzen. Als mögliche Begründung bietet Mouton [66] an, dass die zurückhaltende Akzeptanz der Stereologie auf dem schnellen Entwicklungsprozess dieser Methoden basiert. Er führt aus, dass die Vorteile wie Genauigkeit bzw. Fehlerfreiheit der

neueren Methoden gegenüber älteren Methoden zu wenig beachtet und als zu radikal angesehen werden. Als weiteren Grund nennt Mouton, dass viele wissenschaftliche Veröffentlichungen existieren, die ein hohes Ansehen genießen, jedoch auf älteren morphometrischen Analysen beruhen. Weiterhin führt der Autor an, dass alleine schon das Wort „bias“ für Verwirrung sorgt, das oft als Befangenheit, Voreingenommenheit oder Prädisposition verstanden wird. In der Stereologie bedeutet es jedoch, dass ein systematischer Fehler in der Methode vorliegt, der überwiegend auf fehlerhaften Annahmen, Modellen und inkorrekten „Korrektur“- Faktoren basiert. Folglich zielen die stereologischen Methoden darauf ab, „unbiased“ Resultate zu ermitteln [66].

### 2.4.2.1 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit (frei von systematischen Fehlern) spiegelt den systematischen Unterschied zwischen einem durchschnittlichen Schätzwert und dem wahren Wert wieder. Wenn der Mittelwert mehrerer Werte einer Probe nahezu mit dem wahren Wert übereinstimmt, so ist die Richtigkeit hoch (Abbildung 3 a + b). Dies sagt jedoch nichts über die Streuung der einzelnen Werte einer Probe aus. Die Präzision (Genauigkeit) reflektiert die Unterschiede zwischen den einzelnen Werten der Probe und gibt die Varianz zwischen den einzelnen Werten an (Abbildung 3). Bei quantitativen Bildanalysen wird eine hohe Richtigkeit angestrebt, die durch stereologische „design-based“ Techniken erreicht werden kann. Die Präzision der Schätzwerte hängt von der Technik und dem Untersuchungsmaterial ab [70].



**Abbildung 3:** Die Abbildung verdeutlicht die Bewertung von Richtigkeit und Präzision. Die obere Reihe (a, b) weist im Gegensatz zur unteren Reihe (c, d) eine hohe Richtigkeit auf, da der Mittelwert der Punkte (Probenwerte) das Zentrum der Zielscheibe (den wahren Wert) treffen würden. Die linke Reihe (a, c) weist im Gegensatz zur rechten Reihe (b, d) eine hohe Präzision auf, da die Punkte (Probenwerte) (a, c) enger zusammen liegen. Quelle: modifiziert nach C. V. Howard und M. G. Reed, 1998 [67]

### 2.4.2.2 Systematische Fehler nicht stereologischen Ursprungs

Systematische Fehler („bias“) in morphometrischen Daten können von nicht stereologischen Quellen stammen. Gewebedeformationen oder Artefakte, die während der histologischen Gewebearbeitung oder des Färbeprozesses entstanden sind, können zu Fehlerquellen in den erhobenen Daten beitragen. In der Stereologie gilt es, die nicht-stereologischen Fehlerquellen zu identifizieren, zu eliminieren und zu minimieren. Beispielsweise können die vorliegenden Originalproben die quantitativen Resultate beeinflussen, wenn das zu untersuchende Probenmaterial von zwei verschiedenen Populationen abstammt [66]. Es können zum Beispiel aber auch fehlerhafte Resultate vorliegen, wenn das Gewebe während des histologischen Bearbeitungsprozess geschrumpft ist. Die Problematik der Gewebeschrumpfung bzw. -deformation in der quantitativen Mikroskopie soll im folgenden näher erläutert werden.

#### 2.4.2.2.1 Gewebeschrumpfung

Je höher und heterogener die Schrumpfungen des Gewebematerials sind, desto eher wirkt sich dies später auf die histologischen, quantitativen Auswertungen aus wie beispielsweise in einer zu hohen Dichtebestimmung bei starker Schrumpfung. Die Einflussfaktoren der Gewebeschrumpfung sind zum einen in der morphologischen Beschaffenheit des Gewebes und zum anderen in der histologischen Bearbeitung des Materials (z.B. Fixierung, Dehydrierung, Einbettmethode) zu finden. Zusätzlich kann sich die technische Anfertigung des Schnittes, die zu Gewebedeformationen führen kann, auf die quantitative Auswertung auswirken.

Die Fixierung des Gewebes kann sich auf dessen Schrumpfung auswirken. Dabei hängt die Schrumpfung des Gewebes insbesondere von der Art und dem pH- Wert der Fixierlösung, jedoch weniger von der Zeitdauer ab. In einer Studie konnte beispielsweise anhand von Lebergewebe des Meerschweinchens gezeigt werden, dass eine Formalinlösung mit einem pH-Wert  $\leq 3$  zu einer Gewebeschrumpfung führt, so dass die mittlere nukleäre Fläche der Zelle einen um 25% kleineren Wert vorweisen konnte als eine Formalinlösung mit dem pH-Wert sieben [71].

Die Dehydrierungsschritte, die bei der Lufttrocknung und in Alkohollösungen vorkommen, sind als weitere Schrumpfungsfaktoren zu nennen. Die alkoholischen Dehydrierungsmittel unterscheiden sich aufgrund ihrer Art und Konzentration voneinander, wobei insbesondere die Art für die Gewebeschrumpfung eine ausschlaggebende Rolle spielt. Baak et al. [71] zeigten beispielsweise, dass Azeton gegenüber Ethanol eine höhere Dehydrierung des Gewebes bewirkt, die insbesondere auf einer höheren Schrumpfung des Zytoplasmas

## Literaturteil

beruht. Die unterschiedlichen Konzentrationen von Ethanol und Azeton, die in dieser Studie anhand der mittleren nukleären Fläche der Leberzelle ebenfalls überprüft worden sind, haben aber bei dem Schrumpfungseffekt keine Rolle gespielt [71].

Die Art der Einbettung trägt auch zur Gewebeschrumpfung bei. Die in der Routine am häufigsten eingesetzten Einbettmethoden sind die Paraffin- und Gefriertechnik. Die Einbettung in Paraffin führt zu einer sehr hohen Gewebeschrumpfung (bis zu ca. 50% des Volumens) und unvorhersehbarer Gewebedeformation [72, 73]. Ladekarl [74] zeigte in seiner Studie beispielsweise, dass in Paraffin eingebettetes humanes Gehirngewebe mit einer 51%igen Schrumpfung der Gehirnrinde und 42%igen Schrumpfung der weißen Substanz einhergeht. Iwadare et al. [75] zeigten, dass die initiale Phase der Herstellung von Paraffinschnitten hauptsächlich für die Schrumpfung verantwortlich ist und zwar insbesondere durch die Hitzeeinwirkung bei dem Schritt der Paraffinfiltration. Gefrierschnitte (syn. Kryostatschnitt) besitzen im Gegensatz zu Paraffinschnitten den Vorteil frei von Schrumpfungartefakten durch Hitzedenaturierungen zu sein [72]. Dehydrierungsprozesse wirken aber auch auf den Kryostatschnitt ein, jedoch erst nach dem Aufziehen des Gewebeschnitts auf den Objektträger (Lufttrocknung, Alkoholreihe). Daher wirkt sich die Gewebeschrumpfung, wenn überhaupt, nur sehr gering auf die Schnittfläche (x-, y-Achse) aus, jedoch erheblich auf die Höhe des Schnittes (z-Achse) [73]. Die Gewebedeformation (x-, y-Achse) des Kryostatschnitts hängt also eher von den Kompressionen während des Schneideprozesses ab, wobei die Stärke der Deformation durch das technische Geschick beeinflusst werden kann [73].

Die Wichtigkeit systematische Fehler nicht stereologischen Ursprungs zu eliminieren, um „unbiased“ Resultate zu erhalten, soll anhand eines Beispiels verdeutlicht werden. Bis in die 90er Jahre wurde allgemein die These vertreten, dass ab dem 50. Lebensjahr eines Menschen ein Gehirnnervenzellrückgang bis ins hohe Alter zu verzeichnen ist, der für die verminderten motorischen und wahrnehmenden Fähigkeiten verantwortlich gemacht worden ist. Seit dieser Erkenntnis ist hoher Forschungsaufwand betrieben worden, um die Fragen zu klären, warum und wie die Zellen zu Grunde gehen. Die Erkenntnis des Gehirnnervenzellrückgangs basierte hauptsächlich auf Dichtenschätzungen inkompletter Proben, die weder die Inhomogenität des Gehirngewebes und die Veränderungen der Neurone (Nervenzellen) selbst, noch deren umliegendes Gewebe hinreichend beachteten. Schließlich wurde die Fragestellung des Gehirnzellrückgangs mittels stereologischer „design-based“ Methoden untersucht, die die Auswertung der Bezugsregion (reference space), also das umliegende Gewebe der Neurone, mit eingeschlossen hatte. Es konnte festgestellt werden, dass keine altersabhängigen Neuronenverluste vorlagen, sondern vielmehr eine

Beziehung zwischen dem Alter und einer Gewebeschrumpfung während des histologischen Bearbeitungsprozess zu verzeichnen war, wobei älteres Gehirngewebe geringerer Schrumpfung während der Paraffineinbettung unterlag als jüngeres [66, 76]. Die Ergebnisse der älteren These konnten damit widerlegt werden und unterlagen der so genannten ‚reference trap‘ (Bezugsregion-Falle) [76].

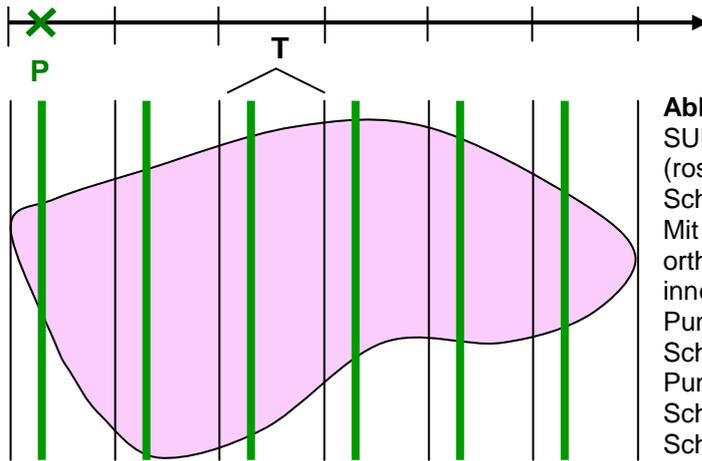
#### **2.4.2.3 Systematische, einheitliche, zufällige Probenziehung**

Es ist bei mikroskopischen Auswertungen aufgrund des enormen Zeitaufwands oftmals nicht sinnvoll, Strukturen in einem kompletten Organ zu analysieren (wie beispielsweise im gesamten Gehirn Billionen Nervenzellen auszuzählen), so dass repräsentative Proben bzw. Schnitte des Gewebes herangezogen werden müssen. Dabei sollte die Verteilung der Strukturen beachtet werden. In biologischen Geweben ist eine heterogene Anordnung keine Seltenheit und es könnte Stellen geben, wo die zu untersuchende bzw. zu zählende Struktur besonders dicht zusammen liegt bzw. zahlreicher als in anderen Regionen vorkommt. Wird nur eine solche Stelle ausgewertet, kommt es zur Überschätzung des Wertes. Die auszuwertenden mikroskopischen Gesichtsfelder müssen also Stichproben darstellen, die letztendlich „unbiased“ Schätzwerte liefern, die für die Struktur im Gesamtgewebe repräsentativ sind. Dafür sollte die Auswahl der zu untersuchenden Proben zunächst einheitlich zufällig (uniform random) sein, so dass erfüllt ist, dass jede Probe die gleiche Chance hat, ausgewählt zu werden. Dieses Zufallsprinzip ist für alle Stufen der Probenziehung bei einem biologischen Experiment zu beachten, angefangen bei der Wahl der Versuchstiere für eine Studie bis hin zum mikroskopischen Gesichtsfeld. Zusätzlich sollte die Gewebeprobe nicht nur einheitlich, zufällig ausgewählt werden, sondern auch systematisch (systematic), um den morphologischen Charakter des heterogenen Gewebes hinreichend reflektieren zu können. Wählt man von einem Gewebe nämlich nicht systematisch mehrere zufällige Proben, besteht die Gefahr dass einige dieser ausgewählten Proben eng beieinander liegen bzw. von der selben Region stammen und somit kaum den Informationsgehalt erhöhen [77].

Um dem systematischen, einheitlichen, zufälligen Probenziehungsprinzip (systematic uniformly random (SUR) sampling) gerecht zu werden, kann ein Organ, wie beispielsweise ein Tumor, zunächst in gleich dicke, parallele Scheiben (Intervalle) mit der Dicke  $T$  eingeteilt werden. Um die Schnittebenen jedoch zufällig auf dem Tumor zu platzieren, muss der erste Schnittpunkt zufällig innerhalb des ersten Intervalls  $T$  gewählt werden. Von diesem Schnitt ausgehend, wird der Tumor in  $T$ -gleichgroße Intervalle eingeteilt. Anschließend wird ein systematisches Set von Scheiben mit gleich großem Abstand zueinander gewählt [78] (Abbildung 4). Die Methode soll anhand eines histologischen Beispiels verdeutlicht werden:

## Literaturteil

Bei einer Niere der Maus besteht die Möglichkeit, das ganze Gewebe einzubetten und es vollständig aufzuschneiden. Beträgt die Länge des Organs beispielsweise 1 cm und es sollen 10 Schnitte angefertigt werden, so wird das Intervall T auf 1000  $\mu\text{m}$  festgelegt. Bei einer Schnittdicke von 5  $\mu\text{m}$ , müsste man folglich jeden 200sten Schnitt auswählen. Um eine einheitliche zufällige Position des ersten Schnittes zu gewährleisten wird zufällig eine Zahl zwischen 0-99 gewählt, die beispielsweise mittels Zufallszahlentabelle ermittelt werden kann [77]. Von diesem Schnitt ausgehend wird dann jeder 200ste Schnitt aufgenommen.



**Abbildung 4:** Die Skizze verdeutlicht das SUR Probenziehungsprinzip. Ein Tumor (rosa) ist systematisch in sechs, parallele Scheiben mit der Dicke T eingeteilt worden. Mit Hilfe einer zu den Schnittebenen orthogonal verlaufenden Achse kann innerhalb der ersten Scheibe zufällig ein Punkt (P) bestimmt werden, der die erste Schnittebene festlegt (grün). Von diesem Punkt wird der Intervallabstand (T) bzw. die Scheibendicke bemessen, um die zweite Schnittebene (grün) zu ermitteln usw.

### 2.4.2.4 Isotrope, einheitliche, zufällige Probenziehung

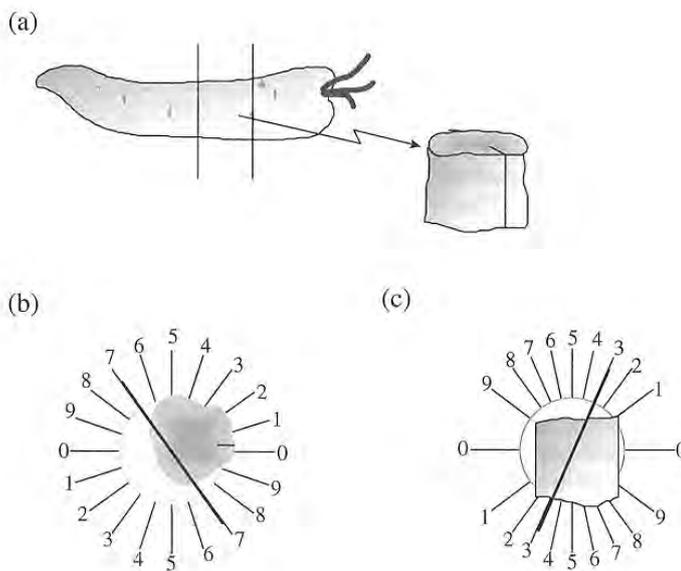
Einige stereologische Methoden treffen auf die Isotropie und Anisotropie von Strukturen. Isotropie bedeutet, dass alle Richtungen gleichermaßen möglich sind wie beispielsweise auf der Oberfläche einer Kugel. Anisotropie dagegen bedeutet, dass alle Strukturen in eine Hauptrichtung ausgerichtet sind wie bei Parallelen z. B. Muskelfasern. Voraussetzung für die stereologische Längen- und Oberflächenbestimmung beispielsweise ist die Anfertigung isotroper einheitlicher zufälliger (IUR, isotropic uniform random) Schnitte, wenn die zu untersuchende Struktur selbst nicht isotrop ist. Der so genannte „Orientator“ [79], der für große Objekte, und der „Isector“ [80], der für kleinere Objekte eingesetzt werden kann, sind Methoden, um IUR Schnitte herzustellen. Sie sind weder zeit- noch kostenintensiv und einfach durchführbar.

#### 2.4.2.4.1 Orientator

Der Orientator kann in drei Schritte unterteilt werden [79, 81].

- 1.) Es wird einheitlich, zufällig (uniform random) eine Scheibe des Untersuchungsobjekts gewählt und für diese eine vertikale Richtung bestimmt, die stets identifizierbar sein muss (Abbildung 5a).

- 2.) Die Scheibe wird „uniform random“ und mit willkürlicher Rotation auf eine einheitlich unterteilte  $\Phi$  Uhr platziert, so dass jedoch die vertikale Achse senkrecht zur Uhrebene gerichtet ist. Mittels Zufallstabelle wird eine Zahl zwischen 0 und 9 bestimmt. Die Scheibe wird dann senkrecht zur Ebene entlang der zufällig festgelegten Richtung in zwei Teile geschnitten (Abbildung 5b).
- 3.) Eines der zwei Teile wird zufällig gewählt und mit der neu produzierten glatten Fläche „uniform random“ auf eine neue Ebene gelegt, die eine cosinus gewichtete  $\theta$  Uhr darstellt. Die vertikale Achse des Stücks verläuft dabei durch die 0-0 Linie der Uhr. Anschließend wird erneut eine Nummer zwischen 0 und 9 mittels Zufallstabelle gewählt. Das Objektstück wird dann senkrecht zur Ebene entlang der zufällig bestimmten Richtung geschnitten. Die entstandene Schnittfläche stellt eine isotrope einheitliche zufällige Schnittebene durch das Ursprungsobjekt dar (Abbildung 5c).



**Abbildung 5** Der Orientator wird anhand einer Mohrrübe als Objekt bildlich dargestellt. Quelle: C. W. Howard und M. G. Reed, 1998 [81]

#### 2.4.2.4.2 Isector

Der Isector beruht auf der praktischen Herstellung einer sphärischen und somit isotropen Form. Dafür wird das Untersuchungsobjekt in eine kugelförmige Form in Kunstharz eingebettet. Nach dem Härteprozess des Einbettmediums wird die entstandene Kugel aus der Form gelöst und auf einer Ebene beispielsweise auf dem Labortisch hin und her gerollt bis die Lage des Objekts in der Kugel nicht mehr erkennbar bzw. nachvollziehbar ist. Anschließend wird diese runde Probe erneut, jedoch diesmal in eine rechteckförmige Form,

## Literaturteil

eingebettet. Das Objekt befindet sich nun in einer isotropen Orientierung und einheitliche, zufällige Schnitte durch den produzierten Block stellen IUR Schnitte durch das Objekt dar [80, 81]

### **2.4.3 Stereologische Bestimmung des (Tumor-)Volumens nach dem Cavalieri**

#### **Prinzip**

Die Bestimmung des Volumens nimmt innerhalb der Stereologie einen hohen Stellenwert ein. Zum einen muss das Volumen bei bestimmten quantitativen Auswertungen mit einbezogen werden, zum anderen ermöglicht die stereologische Methode das Volumen von sehr komplexen Strukturen leicht zu ermitteln.

Die Rolle, die das Volumen bei quantitativen Auswertungen einnimmt, besteht darin, dass bei bestimmten stereologischen Methoden Dichten von Strukturen bestimmt werden, um daraus beispielsweise deren Länge (z.B. Blutgefäßlänge), Anzahl (z.B. Neuronenanzahl) oder Oberfläche (z.B. Nierenoberfläche) zu ermitteln. Diese Dichten stellen jedoch nur ein Verhältnis dar und lassen keine Aussagen über die totale Anzahl, totale Länge oder totale Oberfläche zu. Um dies zu erreichen, müssen die Dichten mit der Bezugsgröße, dem totalen Volumen, dem so genannten Referenzvolumen, multipliziert werden [82].

Der große Vorteil der stereologischen Volumenbestimmung liegt darin, dass das Volumen unabhängig von der Größe oder Komplexität des Objektes leicht ermittelt werden kann. So können beispielsweise sowohl Strukturen innerhalb eines Gewebes, wie z. B. mikroskopisch sichtbare Lungenmetastasen [26], als auch die einzelnen Kompartimente eines Objektes, wie z. B. die weiße und graue Substanz des Gehirns [68], effizient und unkompliziert ausgewertet werden.

Obwohl die Volumenbestimmung nach dem Cavalieri Prinzip „unbiased“ ist und effektive Ergebnisse liefert, existieren nur wenige Studien über deren Anwendung zur Bestimmung des Tumolvolumens [24, 25]. Bei größeren Tumoren ist es sogar möglich diese bereits nach der Entnahme stereologisch auszuwerten [25]. Die makroskopische Auswertung des Tumors besitzt den Vorteil, dass keine Schrumpfungseffekte durch die histologische Behandlung auftreten. Bei der mikroskopischen Bewertung müssen die systematischen Fehler nicht stereologischen Ursprungs berücksichtigt werden (siehe Pkt. 2.4.2.2).

Die praktischen und theoretischen Aspekte der stereologischen Cavalieri Methode, die auf einem älteren Prinzip nach Bonaventura Francesco Cavalieri (Abbildung 6) beruht, der seine These in den Werken *Geometria indivisibilibus* (1635) und *Exercitationes Geometricae* (1647) verewigte [83], sollen im folgenden für die Histologie näher erläutert werden. Voraussetzung ist für die Benutzung und die hohe Richtigkeit der Cavalieri Methode, dass die Anforderungen der SUR Probenziehung erfüllt wird [69] (siehe Abschnitt 2.4.2.3). Im Gegensatz zu bestimmten stereologischen Methoden erfordert die Cavalieri Methode also keine IUR Schnitte (siehe Abschnitt 2.4.2.4), das heißt, dass die Schneiderichtung frei bestimmt werden kann [25]. Die ausgewählten SUR-Schnitte werden nacheinander ausgewertet, wobei die Oberflächen herangezogen werden, die ursprünglich in die selbe Richtung gewiesen haben. Das Volumen ( $V$ ) wird geschätzt indem alle Flächen ( $A$ ) summiert und mit dem Intervallabstand zwischen den Schnitten  $T$  multipliziert werden [78, 84].



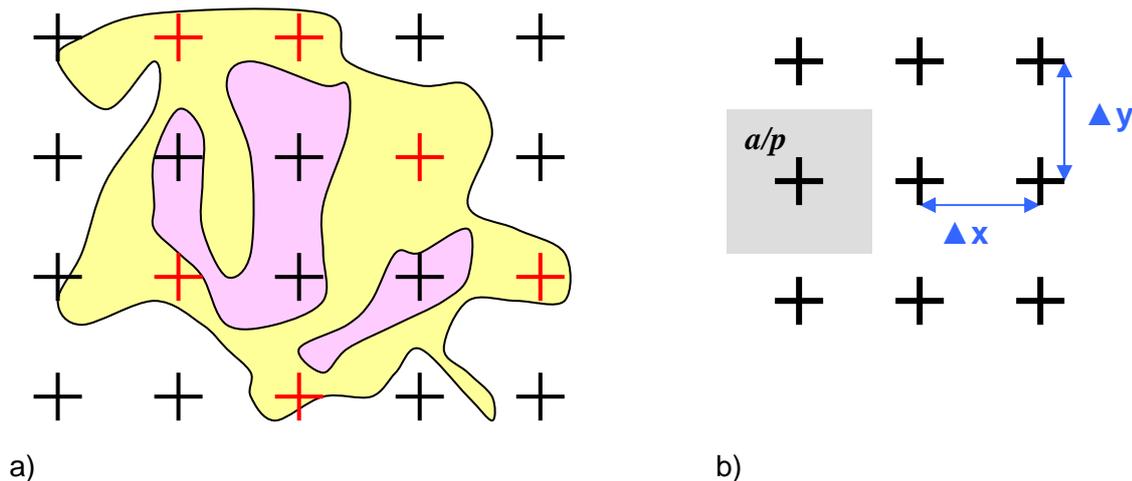
**Abbildung 6:** Bonaventura Francesco Cavalieri (1598-1647) Quelle: *wikipedia* [1]

$$V = T \cdot \sum_{i=1}^m A_i$$

Durch ein zufällig auf die Gewebeschnitte platziertes Punktegitter, das hinreichende Präzision liefert, können diese ausgewertet werden. Die Kombination eines zufällig positionierten Punktegitters, das auf einen zufällig gewählten Schnitt platziert wird, ist mit einem zufällig platziertem 3D Punktegitter gleichzusetzen. Dies bedeutet, dass sich jeder Punkt des Gitters einheitlich zufällig in x-, y- und z-Richtung innerhalb des 3D Raums befindet [84]. Die Gitterpunkte sind kleine Kreuze, die alle die gleichen Abstände zueinander aufweisen, wobei die konstante Fläche ( $a$ ), die durch einen Punkt ( $p$ ) repräsentiert wird, bekannt sein muss (Abbildung 7 b). Es wird eine Ecke des kleinen Kreuzes bestimmt, beispielsweise die rechte obere Ecke, die stets als Zählort dienen soll. Liegt in dieser Ecke das Gewebe, von dem das Volumen bestimmt werden soll, wird der Gitterpunkt gezählt. Liegt in der definierten Ecke nicht das zu untersuchende Gewebe, wird der Punkt nicht gezählt (Abbildung 7 a). Die gesamte Anzahl der Punkte ( $P$ ) aller ausgezählten Schnitte des Objekts fließen dann in die Berechnung mit ein. Die Formel stellt sich dadurch wie folgt dar [69]:

$$V = T \cdot \frac{a}{p} \cdot \sum P$$

## Literaturteil



**Abbildung 7:** Prinzip der Cavalieri Methode a) Um die Fläche des gelben Gewebeanteils zu bestimmen, werden alle Gitterpunkte gezählt (rot), die in der rechten oberen Ecke gelbes Gewebe vorweisen können b) Der Abstand zwischen den Punkten des Zählgitters ( $\Delta x$ ,  $\Delta y$ ) ist konstant, jeder Punkt repräsentiert eine konstante Fläche  $a$  ( $a/p$ , grau). Quelle: modifiziert nach C. V. Howard und M. G. Reed, 1998 [77]

### 2.4.3.1 Coefficient of Error (CE)

Die Variabilität einer stereologischen Methode kann durch den totalen Koeffizienten der Varianz ( $CV_{\text{tot}}$ ) angegeben werden, der sich aus der biologischen Varianz ( $CV_{\text{bio}}$ ) und dem Fehlerkoeffizienten der stereologischen Methode ( $CE_{\text{st}}$ ) zusammensetzt. Allgemein gilt die Analyse als hinreichend effizient, wenn der  $CE_{\text{st}}$  Wert die Hälfte des  $CV_{\text{bio}}$  Werts beträgt [82]. Der CE Wert ist der relative Standardfehler des Mittelwertes (SEM, standard error of the mean) geteilt durch den Mittelwert und stellt die Präzision der Schätzungsmethode dar ( $CE = SEM / \text{Mittelwert}$ ). Wenn  $n$  unabhängige Schätzungen derselben Verteilung angefertigt worden sind, dann gilt:  $SEM = SD / \sqrt{n}$  ( $SD =$  Standardabweichung). Für nicht unabhängige Schätzungen wie z. B. für individuelle Flächen einer Volumenschätzung nach Cavalieri stellt sich die Situation jedoch komplexer dar [70]. Die Schätzmethode des Volumens nach Cavalieri ist eine effiziente Kombination von zwei Schätzungen, der Fläche  $A$  und des Volumens  $V$ .

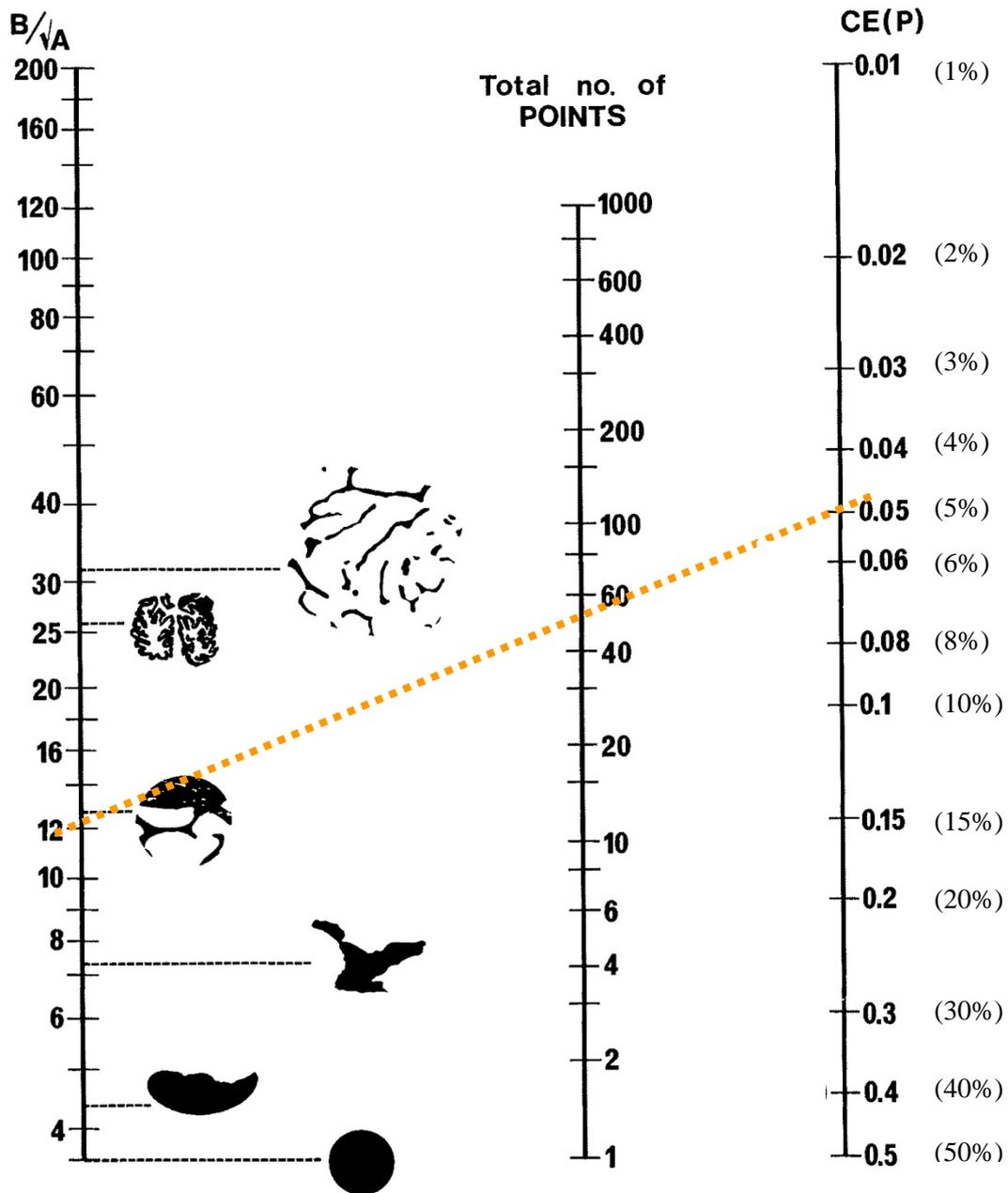
$$A_i = (a/p) \cdot P_i \quad \text{und} \quad V = t \cdot \sum_{i=1}^n \cdot A_i$$

Für die Erhebung beider Schätzwerte ist ein systematisches, einheitliches, zufälliges Probenziehungsverfahren zu beachten, um die Formeln für beide Werte zur Berechnung der Schätzungsvarianz verwenden zu können. Die Effizienz der systematischen Probenziehung hängt nicht davon ab um *wie viel* die Beobachtungen variieren, sondern *wie* sie variieren [78]. Die erste Varianz ist die der Punktezzählung, wird Noise Effekt genannt und gibt an, um wie viel die Schätzung sich verändert hätte, wenn das Zählgitter unterschiedlich auf dem Objekt platziert worden wäre. In die Formel des Noise Effekts fließt die durchschnittliche

Profilform der zu untersuchenden Struktur  $(b/\sqrt{a})$  mit ein, die anhand eines Diagramms (Abbildung 8) abgelesen werden kann. Die zweite Varianz ist die der Summe der Flächen und ist eine Funktion der Anzahl der Schnitte. Die totale Varianz beider miteinander kombinierten Schätzmethode ist somit die Summe beider Varianzen. Die Berechnung erweist sich als kompliziert, da die Varianz der zweiten Schätzmethode nicht ohne die der ersten berechnet werden kann. Für die Berechnung des „coefficient of error“ (CE) wird die totale Varianz und die Anzahl der gezählten Punkte herangezogen [85].

Der CE der Volumenschätzung nach dem Cavalieri Prinzip kann vorausgesagt werden, indem die Gesamtanzahl der gezählten Punkte des Objekts bekannt ist. Zusätzlich muss die Komplexität der Form des Objekts eingeordnet werden, so dass das Nomogramm nach Gundersen und Jensen [78] verwendet werden kann.

Sowohl theoretische Betrachtungen als auch praktische Erfahrungen haben gezeigt, dass laut Howard und Reed [84] auch für ein Objekt mit sehr komplexer Form maximal 200 Punkte (nicht pro Schnitt, sondern für das Objekt insgesamt) anhand von 10-15 Schnitten gezählt werden müssen, um einen CE zwischen 5-10% oder laut Gundersen [68] sogar unter 5% zu erhalten. Howard und Reed [84] führen weiter aus, dass für Objekte, die eine ellipsoidähnliche Form aufweisen, die Anzahl der auszuwertenden Schnitte und die Anzahl der Punkte, die gezählt werden müssen, reduziert werden kann.



**Abbildung 8:** Leicht modifiziertes Nomogramm nach Gundersen und Jensen (1987). Dieses kann angewendet werden, wenn ein systematisches, isotrop orientiertes, zufällig positioniertes Zählgitter für zwei dimensionale Profile verwendet wird. Das Nomogramm gibt an, wie viele Punkte gezählt werden müßten (mittlere Skala), um einen bestimmten CE (coefficient of error) zu erreichen (rechte Säule). Dafür wird zunächst vom Untersucher die Form bzw. Komplexität der Profile bestimmt, die als  $(B/\sqrt{A})$  ausgedrückt wird (linke Säule) ( $B$ =totale Grenzlinienlänge,  $A$ =totale Profilfläche). Alle sechs dargestellten Formen (linke Säule) weisen die gleiche totale Fläche auf. Dann wird der angestrebte CE Wert  $CE(P)$  bestimmt.  $CE(P)$  und  $(B/\sqrt{A})$  werden mit Hilfe einer geraden Linie verbunden und durchqueren dabei die mittlere Anzeigelinie, die die Anzahl der zu zählenden Punkte angibt. Die orange, gestrichelte Linie gibt ein Beispiel an. Wenn die Komplexität des zu untersuchenden Organs bei 12 eingeordnet worden ist, und ein CE Wert von 5% angestrebt wird, so müssen ca. 55 Ereignisse (z. B. Profile) der zu untersuchende Struktur ausgezählt werden. Quelle: *H. J. Gundersen und E. B. Jensen, 1987 [78]*

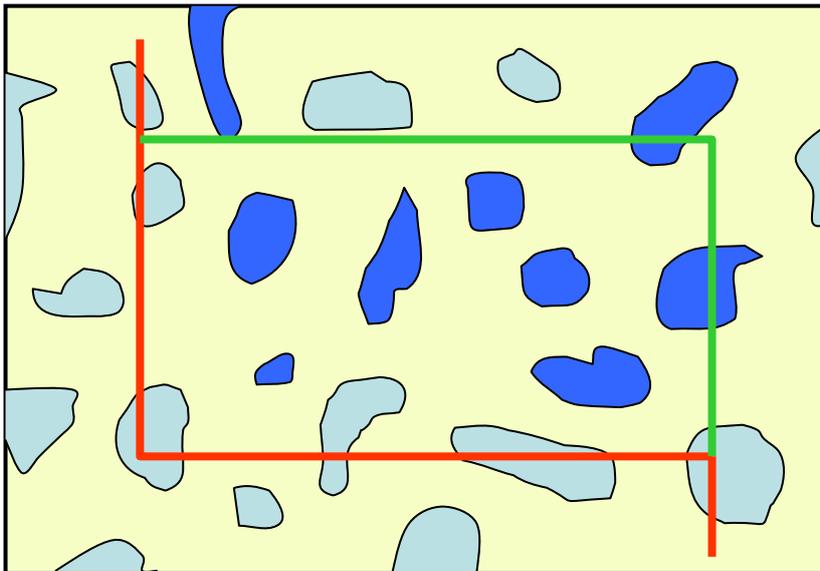
## 2.4.4 Stereologische Quantifizierungsmethoden tubulärer Strukturen (tumoraler Blutgefäße)

### 2.4.4.1 Zweidimensionale Profildichte

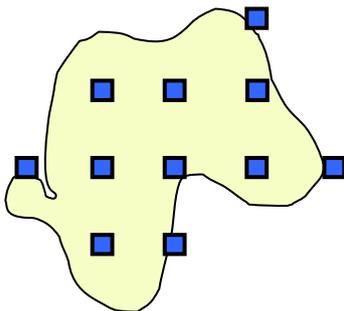
Die Stereologie stellt ein Set von Methoden zur Quantifizierung dreidimensionaler mikroskopischer Strukturen dar. Dennoch gibt es viele Situationen für die einfache, schnelle und verlässliche Methoden zur Quantifizierung zweidimensionaler Strukturen benötigt werden. Auch für diese Fälle bietet die Stereologie Auswertungsmöglichkeiten [68]. Gundersen et al. [68] beschreiben hierfür u. a. die Ermittlung der Anzahl von Profilen pro Fläche. Das zu analysierende mikroskopische Feld wird mit einem so genannten „unbiased counting frame“, einem Zählrahmen, der frei von systematischen Fehlern ist [86], überlagert, so dass an allen Rändern eine „guard zone“ (Sicherheitszone) bleibt (Abbildung 9). Diese Zone ist insbesondere bei irregulären Strukturen nötig, um ein korrektes Zählen gewährleisten zu können. Die Auszählung erfolgt nach einer festen Zählregel, die vorgibt, dass alle Profile, die innerhalb des Zählrahmens liegen oder die Einbezugslinie (grün in Abbildung 9) berühren oder überqueren, gezählt werden; jedes Profil hingegen, das die Ausschlusslinie (rot in Abbildung 9) berührt oder überquert, wird nicht gezählt. Wenn ein Gewebe bzw. Organ vollständig ausgewertet werden soll, sollte die Anzahl der zu zählenden Ereignisse laut Gundersen [68] insgesamt zwischen 100 und 200 betragen unter der Beachtung, dass genug mikroskopische Gesichtsfelder zur Auswertung vorliegen. Diese zu analysierenden mikroskopischen Gesichtsfelder innerhalb eines Schnittes werden nicht subjektiv vom Betrachter festgelegt, sondern werden durch ein systematisches Zufallsprinzip vorgegeben [78]. Dabei liegen die Felder im gleichen Abstand systematisch voneinander entfernt, deren Lage ist jedoch zufällig (Abbildung 10). Auch bei den zweidimensionalen stereologischen Auswertungen ist wieder zu beachten, dass repräsentative Proben bzw. Schnitte eines Objekts auszuwerten (siehe SUR, IUR Schnitte; Abschnitt 2.4.2.3 und 2.4.2.4) sind [78]. Die Formel, die zur Bestimmung der Anzahl der Profile pro Fläche  $Q_A$  verwendet werden kann, lautet nach Gundersen et al. [68]:

$$Q_A = \frac{\sum Q(\text{prof})}{\sum A(\text{sect})}$$

Dabei steht  $\sum Q(\text{prof})$  für die Summe der Anzahl der Profile und  $\sum A(\text{sect})$  für die Summe der Flächen der Zählrahmen aller ausgewerteten Schnitte.



**Abbildung 9:** Die Abbildung zeigt eine Skizze eines Gesichtsfeldes mit Profilen und einem Zählrahmen. Jedes Profil innerhalb des Zählrahmens und jedes, das die Einbezugslinie (grün) berührt oder überschreitet, wird gezählt (dunkelblau). Profile, die nicht innerhalb des Zählrahmens liegen, die Ausschlusslinie (rot) berühren oder überschreiten werden nicht gezählt (hellblau). Quelle: modifiziert nach H. J. G. Gundersen et al., 1988 [68]



**Abbildung 10:** Systematisch und zufällig verteilte Gesichtsfelder (blau) innerhalb eines Schnittes (gelb) werden zur Auswertung herangezogen

#### 2.4.4.2 Dreidimensionale Blutgefäßlänge

Die Ermittlung der Blutgefäßlänge führt zu wertvollen Informationen der Organversorgung und zur Charakterisierung des Blutgefäßbetts. Die Ermittlung der tumoralen Blutversorgung beispielsweise kann die antiangiogene Wirksamkeit eines neuen, potentiellen Therapeutikums charakterisieren oder die angiogene Aktivität bestimmter Tumortypen differenzieren. Bei mikroskopischer Betrachtung dieser Blutgefäßstrukturen im histologischen Schnitt sind jedoch nicht die dreidimensionalen Formen sichtbar, sondern die zweidimensionalen Profile der angeschnittenen Blutgefäße. Daher muss zur Ermittlung der Blutgefäßlänge zunächst die Blutgefäßprofildichte ( $Q_A$ ), wie unter Abschnitt 2.4.4.1 beschrieben, ausgewertet werden, um dann die so genannte Längendichte ( $L_V$ ) errechnen zu können. Die Längendichte ( $L_V$ ) kann nach der Formel von Nyengaard et al. [82] ermittelt werden:  $L_V = 2 \cdot Q_A$ . Die ermittelte Längendichte  $L_V$  der Blutgefäße wird dann mit dem

Bezugsvolumen  $V$  (siehe Abschnitt 2.4.3) verrechnet, um die totale Länge  $L$  der Blutgefäße zu erhalten. Die Länge  $L$  kann laut Gundersen et al. [68] mit folgender Formel ermittelt werden:  $L = 2 \cdot Q_A \cdot V$ .

Die Konstante 2 in den Formeln steht für die Wahrscheinlichkeit mit der ein Blutgefäß von einer Ebene angeschnitten wird. Dies soll im folgenden näher erläutert werden. Zum einen hängt das Anschneiden einer tubulären Struktur von dessen Verlaufsrichtung ab. Es wird also eine tubuläre Struktur, die gewunden verläuft, mit höherer Wahrscheinlichkeit von einer Ebene angeschnitten als eine gerade (Abbildung 11) [81]. Zum anderen hängt die dargestellte Profildichte auf dem Schnitt jedoch auch von der Orientierung der Schnittrichtung ab (Abbildung 12), so dass ein Schnitt, der parallel zur Struktur verläuft keine Profile aufweisen wird, ein schräg zur Struktur verlaufender Schnitt hingegen schon (Abbildung 12). In diesem Zusammenhang wird klar, dass insbesondere die Profildichte anisotrop ausgerichteter Strukturen im Gegensatz zu isotrop verlaufenden von der Orientierung der Schnittebene abhängt. Daher müssen für die Längenbestimmung IUR Schnitte verwendet werden (siehe Abschnitt 2.4.2.4), wenn die Struktur selbst nicht isotrop ist [81, 82].

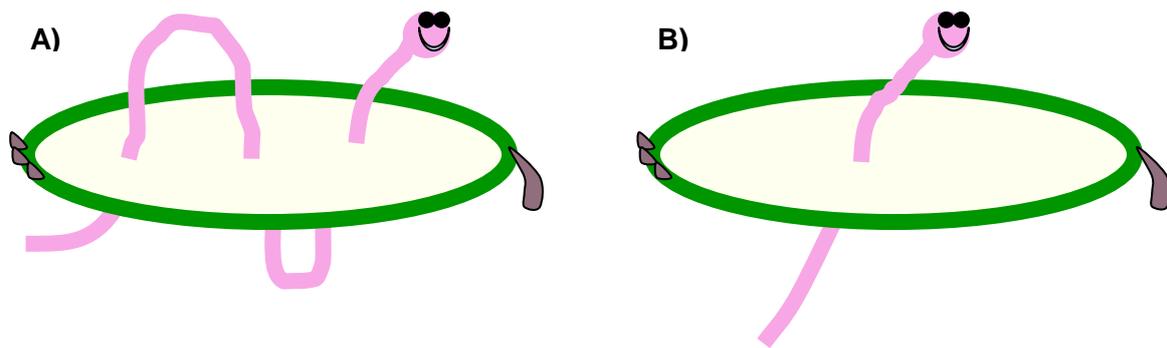
#### 2.4.4.3 Diffusionsradius

Säugetierzellen benötigen zum Überleben Sauerstoff und Nährstoffe. Da das Diffusionslimit für Sauerstoff im Gewebe laut Carmeliet et Jain [6] 100-200  $\mu\text{m}$  beträgt, sind die Zellen innerhalb dieses Radius um ein Blutgefäß angeordnet.

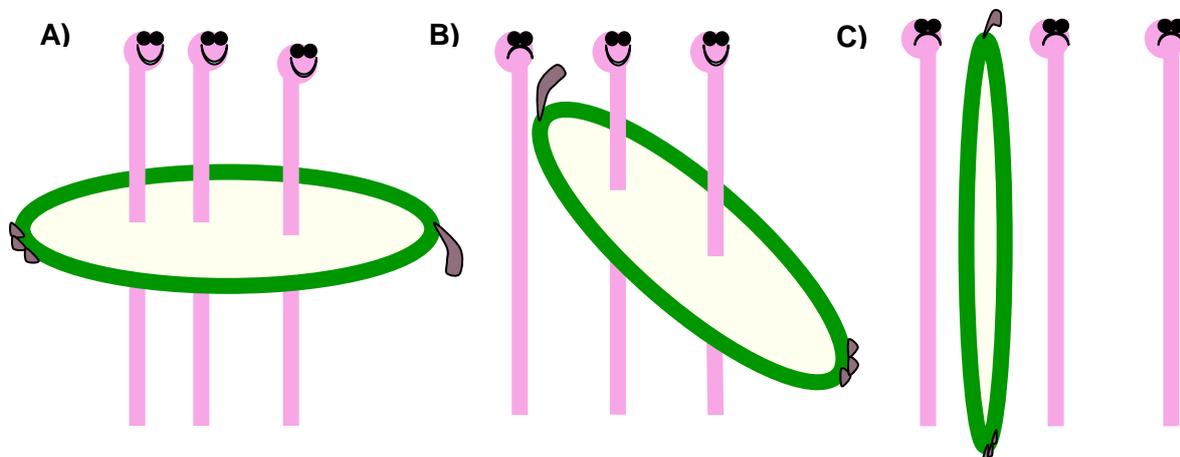
Zur Zeit gibt es keine „design-based“ stereologischen Methoden, durch die der Diffusionsweg zwischen Blutkapillaren und dem Gewebe ermittelt werden kann. Es ist anhand von zweidimensionalen Schnitten nicht möglich, die kürzeste Strecke zwischen dem im Fokus stehenden Gewebe und dem am nächsten gelegenen kapillären Lumen zu erkennen. Zusätzlich ist die Strecke abhängig von der dreidimensionalen Anordnung der Kapillaren, die zudem oft heterogen im Gewebe verteilt liegen. Wenn jedoch angenommen wird, dass sich eine zylindrische Diffusionszone um die Kapillaren befindet und der durchschnittliche Radius des Zylinders diese widerspiegelt, kann sie leicht errechnet werden, ohne dass die Heterogenität der Kapillarverteilung dabei berücksichtigt werden muss. Die Formel hierfür lautet:

$r(\text{diff}) = \frac{1}{\sqrt{\pi \cdot L_v}}$  [82]. Da in dieser Formel die Längendichte ( $L_v$ ) verwendet wird,

muss das Kriterium der Isotropie bzw. IUR Schnitte wieder beachtet werden.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der möglichen Verlaufsrichtung einer tubulären Struktur zur Ebene. Der gewundene Wurm (a) schneidet die Apfelscheibe mehrere Male im Gegensatz zum gerade verlaufenden Wurm (b), der die Scheibe nur einmal schneidet. Die Dichte der Löcher (Profile) pro Apfelscheibe (Fläche der Ebene), die der Wurm (a) verursacht hat, ist somit höher und hängt wiederum mit der Länge des Wurms innerhalb eines dreidimensionalen Raumes zusammen. Quelle: modifiziert nach C. W. Howard und M. G. Reed, 1998 [81]



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Schnittrichtung zu anisotropen, tubulären Strukturen. Die Würmer sind anisotrop ausgerichtet und schneiden die Ebene der Apfelscheibe, die a) normal, b) schräg und c) parallel zu der anisotropen Achse der Würmer ausgerichtet ist. Die Abbildungen verdeutlichen, dass die Dichte der entstehenden Löcher durch die Apfelscheibenebene stark von der Orientierung der Apfelscheibe abhängt. Quelle: modifiziert nach C. W. Howard und M. G. Reed, 1998 [81]

## 2.5 Diagnostische Bildgebung

Der Grundstein der diagnostischen Bildgebung wurde 1895 mit der Erfindung der Röntgenstrahlung gelegt. Seit diesem Zeitpunkt ist dieses Gebiet von starker technologischer Weiterentwicklung geprägt. Neben den klassischen bildgebenden Verfahren (z. B. Computertomographie, Ultraschall), die in der Klinik fest etabliert sind, stehen neuere Verfahren wie z. B. die optische Bildgebung im präklinischen Bereich zur Verfügung. Die kontinuierliche Weiterentwicklung der diagnostischen Bildgebung hat dazu beigetragen, dass heutzutage sogar für kleine Lebewesen (z.B. Ratte, Maus) alle diagnostischen Bildgebungsverfahren zur Verfügung stehen. Zusätzlich ist die Entwicklung von Kontrastmitteln stark stimuliert worden, um pathologisches Gewebe, insbesondere neoplastische Veränderungen, besser abgrenzen zu können. Der Anspruch der heutzutage

an die nichtinvasive Bildgebung gestellt wird, ist die frühe und spezifische Erkennung pathologischer Prozesse beispielsweise eines Tumor bevor dieser anhand seiner Größe detektiert werden kann.

### **2.5.1 Klassische bildgebende Verfahren**

Zu den klassischen bildgebenden Verfahren zählen zum einen das konventionelle Röntgen, die Computer Tomographie (CT), die Magnet Resonanz Tomographie (MRT) und der Ultraschall (US). Pathologische Prozesse werden hauptsächlich durch diese Schnittbildgebungen anhand ihres morphologischen Erscheinungsbildes lokalisiert und charakterisiert. Zum anderen gibt es die Positron Emissions Tomographie (PET) und Szintigraphie (Single Photon Emission Computed Tomographie, SPECT), durch die Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene bildlich dargestellt werden können. Um die Abgrenzung des pathologischen Gewebes (z. B. Tumor) zu verbessern, stehen für all diese bildgebenden Verfahren Kontrastmittel zur Verfügung. Die klassischen diagnostischen Technologien sollen im folgenden nur kurz erläutert werden, da sie nicht Bestandteil dieser Arbeit sind.

Die Röntgentechnologien zeichnen sich durch ihre hohe bildliche Auflösung aus, besitzen jedoch den Nachteil der Strahlenbelastung für den Patienten. Das konventionelle Röntgen ermöglicht die Darstellung im zweidimensionalen (2D), die Computertomographie dagegen im zwei- und dreidimensionalen (3D) Bild. Die Verfahren eignen sich besonders gut zur anatomischen Darstellung von Knochen- und anderen Hartgeweben.

Die Magnet Resonanz Tomographie zeichnet sich durch hohe temporale und räumliche Auflösung aus und kann sowohl 2D als auch 3D Bilder liefern. Die Stärke der MRT liegt in der Visualisierung anatomischer Details und der ausgezeichneten Gewebedifferenzierung insbesondere der Weichteilbereiche.

Die Ultraschalldiagnostik ist die am weitesten verbreitete bildgebende Technologie, da sie preiswert, sicher und transportierbar ist. Sie liefert neben anatomischen, statischen Bildern hoch aufgelöste Aufnahmen in Echtzeit. Derzeitige Doppler-Techniken liefern daher nicht nur Informationen über die Morphologie beispielsweise peri- und intratumoraler Gefäße, sondern auch über die Geschwindigkeit und Richtung des Blutflusses. Der US liefert sowohl 2D, als auch 3D Aufnahmen.

Die PET und SPECT Verfahren zeichnen sich durch ihre hohe Empfindlichkeit aus, so dass metabolische und molekulare Prozesse dargestellt werden können. Sie weisen jedoch eine

## Literaturteil

geringe räumliche Auflösung auf, so dass die Anatomie nur begrenzt dargestellt werden kann. Eine der neuesten Entwicklungen auf diesem Gebiet kombiniert daher PET bzw. SPECT mit der CT [7].

Die molekulare Bildgebung nimmt in der heutigen Kontrastmittelforschung einen hohen Stellenwert ein. Die Tumorangio-genese beispielsweise ist in der Literatur mit all ihren molekularen Interaktionen gut beschrieben und eignet sich nicht nur aus diesem Grunde als spezifischer Angriffspunkt der Kontrastmittel für die Tumordetektion mittels bildgebender Technologien. Da die vaskulären Zielstrukturen sehr früh im Krankheitsprozess erscheinen und leicht über den Blutstrom zu erreichen sind, konzentriert sich die Entwicklung insbesondere auf diese frühzeitig erkennbaren Strukturen [7]. Die Entwicklung solcher Kontrastmittel stellt für die klassischen bildgebenden Verfahren eine große Herausforderung dar und kann nur schwer für diese Technologien realisiert werden. Daher konzentriert sich die Wissenschaft auf die modernere Forschungsebene der bildgebenden molekularen Diagnostik wozu neben PET und SPECT u. a. auch die optische Bildgebung zählt.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der molekularen Darstellung von Blutgefäßen experimenteller Tumore mittels optischer Bildgebung unter Verwendung neuer Kontrastmittel und der Nah-Infrarot-Laser (NIR) Bildgebungstechnologie. Die optische Bildgebung wird daher im folgenden näher erläutert.

### **2.5.2 Optische Technologien für die bildgebende Diagnostik**

In den letzten Jahren haben optische Technologien an Bedeutung innerhalb der diagnostischen Bildgebung aufgrund der Fähigkeit zelluläre und molekulare Prozesse nichtinvasiv darstellen zu können, gewonnen. Dabei werden spezifische oder unspezifische Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die durch Laserlicht verschiedenster Wellenlängen angeregt werden. Die Farbstoffe emittieren daraufhin Licht einer anderen Wellenlänge, das von einer Kamera aufgenommen und digital in ein Bild umgerechnet werden kann.

Das Gewebenvolumen, in dem die Strahlung absorbiert wird, hängt stark von der Eindringtiefe ab, die wiederum von der Wellenlänge des Lasers und der Gewebebeschaffenheit abhängig ist. Wellenlängen im Bereich des so genannten optischen Fensters (800 – 1100 nm) sind ein bis zwei Größenordnungen stärker von der Streuung als von der Absorption betroffen, so dass innerhalb dieser Wellenlängen lebendes Gewebe relativ wenig Licht absorbiert. Dadurch kann Licht innerhalb dieses Wellenlängenbereichs einige Zentimeter tief in das Gewebe eindringen, bevor es durch Absorptionsprozesse ausgelöscht wird [87]. Daher bietet

sich an, dass das Anregungs- und Emissionslicht des Fluorochroms innerhalb des nah-infraroten (NIR) Bereichs (700-900 nm) liegen sollte [8].

Ein Nachteil der optischen Bildgebung ist in der schlechten bildlichen Auflösung zu finden, so dass anatomisch-morphologische Strukturen nicht hinreichend differenziert werden können. Da Fluoreszenzsignale nur aus einigen Zentimetern Gewebetiefe detektiert werden können, eignet sich die optische Bildgebung auch eher für den klinischen Einsatz bei Krankheiten, die sich nahe der Oberfläche abspielen wie beispielsweise Hauttumoren oder Gelenkentzündungen [88]. Es ist jedoch auch möglich, Prozesse der inneren Organoberflächen darzustellen z. B. bei der endoskopischen Untersuchung gastrointestinaler Tumore [88]. Dennoch hat sich die optische Bildgebung in den letzten Jahren insbesondere in der biomedizinischen Forschung als wesentlicher Bestandteil entwickelt, da das moderne Verfahren vielfältige Möglichkeiten zur nicht-invasiven Visualisierung und Quantifizierung von biologischen Prozessen auf zellulärer und molekularer Ebene in lebenden Organismen bietet [88]. Diese Technologie kann dadurch erheblich dazu beitragen, Krankheitsprozesse in einem sehr frühen Stadium zu erkennen. Insbesondere bei Krebserkrankungen hängt der Therapieerfolg überwiegend davon ab, in welchem Stadium der Krebs erkannt worden ist. Ein weiterer Vorteil der optischen Bildgebung liegt darin, dass die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe auch bei geringer Konzentration noch hinreichend detektiert werden können und keine ionisierende Strahlung verwendet wird, die den lebenden Organismus belasten könnte, so dass das Verfahren mehrfach zur Anwendung kommen kann [89]. Zusätzlich handelt es sich bei der optischen Bildgebung um ein preiswertes und schnelles Verfahren, dessen Handhabung unkompliziert ist [89].

In einigen klinischen Bereichen hat sich die optische Bildgebung bereits fest etabliert. Fluoreszenzoptische Verfahren wie die retinale Angiographie mit dem Kontrastmittel Indocyaningrün werden schon seit langem klinisch eingesetzt. Auch die Diagnose des Harnblasenkarzinoms unter Verwendung eines Esters der 5-Aminolävulinsäure (Hervix<sup>®</sup>) hat sich in der Klinik als Standard-Methode durchgesetzt.

Durch die fortlaufende Entwicklung neuartiger optischer Kontrastmittel in den letzten Jahren, konnten einige Substanzen bereits erfolgreich im Tiermodell eingesetzt werden. Derzeit existieren zwei nicht-invasive Technologien der optischen Bildgebung, die experimentell bei Mäusen eingesetzt werden, für den klinischen Gebrauch jedoch noch nicht zur Verfügung stehen. Zum einen ist es die diffuse optische Tomographie (3D), zum anderen die Fluoreszenz-Bildgebung (2D). Die letztere Methode erreicht Penetrationstiefen des Lichts bis zu 5 cm und somit um die Hälfte weniger als die diffuse Tomographie [90]. Für die optische

## Literaturteil

Mammographie konnten erstaunliche Erfolge in der Präklinik zur Detektion tumoraler angiogenetischer Strukturen mittels NIR-Laserlicht verbucht werden [91]. Aber auch in klinischen Studien ist die optische Mammographie bereits vorgedrungen, die zur Zeit in Kombination mit bestimmten Kontrastmitteln zur Tumordetektion näher untersucht wird [88]. Hierbei ist zu erwähnen, dass die geringe Sensitivität der Detektion von Tumorerkrankungen noch Schwierigkeiten bereitet, so dass sich diese Technologie für den klinischen Einsatz noch nicht eignet. Die fortlaufende Entwicklung von Kontrastmitteln treibt die Optimierung dieser Technologie jedoch rapide voran.

### 2.5.2.1 Kontrastmittel für die optische bildgebende Diagnostik

#### 2.5.2.1.1 Unspezifische Kontrastmittel

Unspezifische Kontrastmittel haben keine Spezifität für bestimmte Zellen oder Moleküle, erlauben jedoch die nicht-invasive Darstellung von Permeabilitäts- oder Perfusionsunterschieden verschiedener Gewebe [88]. Zu den bekanntesten, unspezifischen Kontrastmitteln, die bereits in der Klinik standardmäßig angewendet werden, zählt zum einen die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) und das Indocyaningrün (ICG).

Die 5-ALA stellt eine Vorläufersubstanz der Häm-synthese dar, die in fast allen Zellen des humanen Organismus abläuft und mit der Inkorporation von Eisen in die Substanz Protoporphyrin IX (PpIX) abgeschlossen wird. Die exogene Applikation von 5-ALA führt zu einer Stimulation der intrazellulären PpIX Synthese, wobei in besonders hohem Maße Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Zellen zur Produktion angeregt werden [89]. PpIX besitzt die Eigenschaft Fluoreszenzsignale zu emittieren und kann daher zur Darstellung von Tumoren eingesetzt werden [89]. Bei der Blasentumor-Diagnose hat sich die Fluoreszenz-Zystoskopie unter Verwendung eines Hexyl-Esters der 5-ALA (Hexaminolevulinate 5-ALA, Hexvix<sup>®</sup>) zu einem klinischen Standard-Verfahren entwickelt [92].

Das Indocyaningrün (ICG) gehört ebenfalls zu den unspezifischen fluoreszenzoptischen Kontrastmitteln und wird seit langem klinisch in der Augenheilkunde für die retinale Angiographie eingesetzt. Chorioretinale Erkrankungen wie vaskuläre Funktionsstörungen, Retinopathien und Neovaskularisationsprozesse (altersabhängige Macular Degeneration) können somit dargestellt und diagnostiziert werden [93]. ICG besitzt die Eigenschaft, sich in hypervaskulären und hochgradig permeablen angiogenetischen Blutgefäßgebieten anzusammeln. Insbesondere in den Extravasalräumen von Regionen, die eine dichte Vaskularisation aufweisen, reichert sich das Kontrastmittel an [91]. ICG konnte sich als tumorales Kontrastmittel jedoch nicht durchsetzen, da es schnell von der Leber

aufgenommen wird, eine geringe Stabilität in wässrigen Lösungen aufweist, sich stark an Plasmaproteine bindet und nur über ein geringes Fluoreszenzpotential verfügt [94]. Es wurden folglich Kontrastmittel entwickelt, die auf ICG Basis beruhen, aber dessen negative Eigenschaften möglichst reduziert bzw. eliminiert worden sind [90].

Der hohe Stellenwert der Zyanin-Farbstoff Familie ist in ihren günstigen Anregungs- und Emissionsspektren zu finden [91]. Ein photophysikalisch und pharmakologisch charakterisiertes ICG-Derivat stellt beispielsweise das so genannte SIDAG (Indotricarbocyanine-diglucamin, Bayer Schering Pharma AG, Deutschland) dar, dass sich unspezifisch im tumorösen Gebiet anreichert [90]. Die ICG basierenden Kontrastmittel des Perfusionstyps können erfolgreich für die Tumorkontrastdarstellung verwendet werden; es ist jedoch oft unklar, welche biologisch bedeutsamen Daten eines Tumors reflektiert werden. Derzeit befindet sich das so genannte TSC (TSC, tetrasulfonated carbocyanine-maleimide, Bayer Schering Pharma AG, Deutschland) in der klinischen Prüfung für die optische Mammographie.

Diese Substanz (TSC) wird bezüglich der Tumordarstellung mittels NIR-Laser induzierter optischer Bildgebung im Rahmen dieser Doktorarbeit histologisch charakterisiert.

### **2.5.2.1.2 Spezifische Kontrastmittel**

Spezifische fluoreszenzoptische Kontrastmittel besitzen die Eigenschaft, an bestimmte zelluläre oder molekulare Zielstrukturen zu binden, so dass spezifische biologische Prozesse auf zellulärer oder molekularer Ebene fluoreszenzoptisch dargestellt werden können [88]. Sie können in zielgerichtete und aktivierbare Kontrastmittel eingeteilt werden. Ein zielgerichtetes Kontrastmittel besteht aus einer Komponente (z. B. Antikörper, Protein, Peptid), die gegen eine bestimmte Zielstruktur (z. B. Membran-, Matrixproteine) gerichtet ist und einer signalgebenden Komponente (Fluoreszenzfarbstoff) [88]. Aktivierbare Kontrastmittel dagegen bestehen aus einem Grundgerüst, an das mehrere Fluorochrome gebunden sind und enthalten mehrere Schnittstellen für bestimmte Enzyme [88]. Erst wenn es durch die spezifische Enzymaktivität zur Abspaltung bestimmter Abschnitte des Gerüsts kommt, wird das Fluorochrom aktiviert. Diese Art von Kontrastmittel kann beispielsweise die Aktivität von Enzymen nicht-invasiv darstellen und neben der Lokalisierung auch die Visualisierung der Funktion eines Moleküls erlauben [88]. Aktivierbare Kontrastmittel sind also im Gegensatz zu zielgerichteten Kontrastmitteln erst nach Interaktion mit der Zielstruktur detektierbar [88].

Für eine erfolgreiche molekulare Bildgebung müssen die Zielstrukturen nicht nur für den zu untersuchenden Prozess sehr spezifisch, sondern auch in ausreichend hoher Dichte

## Literaturteil

vorhanden sein. Derzeit erfüllen diese Anforderungen beispielsweise für die Tumorangiogenese nur wenige Targets, wozu das viel versprechende Prostata-spezifische Membranantigen (PSMA) und die extra Domäne B des Fibronektins (ED-B) gehören. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wird ein Antikörper, der gegen ED-B gerichtet ist und mit dem TSC gekoppelt wurde, der so genannte AP39-TSC Antikörper (präklinisches Kontrastmittel, Bayer Schering Pharma AG, Deutschland) untersucht. Daher wird auf dieses Target im folgenden näher eingegangen.

Fibronektine sind multifunktionale, dimerische Glykoproteine, die in der extrazellulären Matrix lokalisiert sind oder im Plasma zirkulieren. Sie stellen adhäsive Proteine dar, die von hoher Bedeutung bei Adhäsions-, Migrations-, Differenzierungs- und Proliferationsprozessen der Zellen sind. Daher sind diese Makromoleküle auch an der Wundheilung, am Tumorwachstum und an der Angiogenese beteiligt [95]. Die Expression eines speziellen Fibronektins, des ED-B-(extra Domäne B)-Fibronektins, obliegt den Myofibroblasten, Endothelzellen und Tumorzellen. Unter physiologischen Bedingungen tritt das Protein nur in embryonalem Gewebe und in den Eierstöcken und der Gebärmutter adulter Gewebe auf. Das Auftreten des ED-B Fibronektins ist sonst stets mit Geweberegenerations- oder entzündlichen Prozessen assoziiert, wobei die Leberzirrhose und die Pankreatitis (Bauchspeicheldrüsenentzündung) Ausnahmen darstellen. Innerhalb tumorös entarteter Gewebe ist das ED-B Fibronektin sowohl perivaskulär als auch im Stroma lokalisiert. Das normale Gewebe, das den Tumor umgibt, exprimiert das Protein in der Regel nicht [95, 96].

Das Tumorangiogenese- und -wachstums assoziierte extrazelluläre Matrixprotein ED-B Fibronektin stellt daher eine Zielstruktur dar, die sich für die molekulare Bildgebung solider Tumore hervorragend eignet. Nicht nur die frühe Tumor-Detektion kann durch das Antigen ermöglicht werden, sondern auch die Verlaufskontrolle antiangiogener Krebstherapien, so dass Voraussagen über den Erfolg getroffen werden können [96].

ED-B Fibronektin zeichnet sich jedoch nicht nur durch seine hohe Selektivität aus, sondern auch durch die Homologie in verschiedenen Spezies. Die vergleichbare Regulation und Verteilung innerhalb muriner und humaner Gewebe führt dazu, dass anhand eines Mausmodells bereits Voraussagen für den humanen Einsatz getroffen werden können [95]. Die Eigenschaften des onkofetalen Antigens führten zur Entwicklung monoklonaler Antikörper, die gegen ED-B Fibronektin gerichtet sind. Das humane, direkt bindende L 19 Einzelketten-(single chain)-Antikörper Fragment (scFv) kristallisierte sich erfolgreich heraus und ermöglicht die Ankopplung an diagnostische und therapeutische Substanzen, die somit zum Target gelangen können [95]. Unterschiedliche rekombinierte und chemisch modifizierte

Derivate des Einzelketten-Antikörper Fragments L19(scFv) wurden von Berndorff et al. in einer szintigraphischen Studie eingesetzt, um die Zielstruktur darzustellen. Dabei überzeugte der so genannte AP39 Antikörper, der in hoher Konzentration schnell vom Tumorgewebe aufgenommen, rapide aus dem Blut beseitigt und über die Niere ausgeschieden werden kann. Diese Eigenschaften tragen zu einem hohen tumoralen Signal bei, das sich stark vom umliegenden nicht-pathologisch veränderten Gewebe abgrenzen lässt. [96].

### **3 MATERIAL und METHODEN**

#### **3.1 Chemische Substanzen und Verbrauchsmaterialien**

In dem folgenden Teil „Material und Methoden“ werden chemische Substanzen und Verbrauchsmaterialien verwendet, die in der Tabelle 11 im Anhang detailliert aufgeführt sind.

#### **3.2 Bestimmung der Isotropie und Anisotropie von Strukturen innerhalb eines Objektes**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll sowohl die Blutgefäßprofildichte als auch die Blutgefäßlänge anhand histologischer Schnitte mittels stereologischer Methoden quantifiziert werden. Hierfür müssten so genannte isotrope, einheitliche, zufällige IUR-Schnitte (siehe Abschnitt 2.4.2.4) verwendet werden, es sei denn die tumoralen Blutgefäße selbst verhalten sich isotrop. Sollten also die Blutgefäße in einem experimentellen, unbehandelten Tumor isotrop sein, dann können so genannte SUR-Schnitte (siehe Abschnitt 2.4.2.3) für diese Auswertungen verwendet werden. Im folgenden wird daher zunächst eine neue Methode präsentiert, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit etabliert wurde. Diese ermöglicht die Untersuchung der Isotropie und Anisotropie von Strukturen in einem Objekt, um dann auf dieser Basis die Blutgefäßverlaufsrichtung innerhalb experimenteller Lungenkarzinome zu ermitteln.

##### **3.2.1 Anisotrope und isotrope Modelle**

Zur Bestimmung der Anisotropie bzw. Isotropie von Strukturen innerhalb eines Objektes sind ein homogenes, anisotropes Modell und zwei heterogene Modelle, von dem eines anisotrope und das andere isotrope Strukturen aufweist, hergestellt und analysiert worden. Anschließend sind innerhalb von drei Lungenkarzinomen die Blutgefäße auf ihren isotropen bzw. anisotropen Charakter hin untersucht worden. Die Herstellung und die Auswertung der Modelle sowie der Tumore werden im folgenden erläutert.

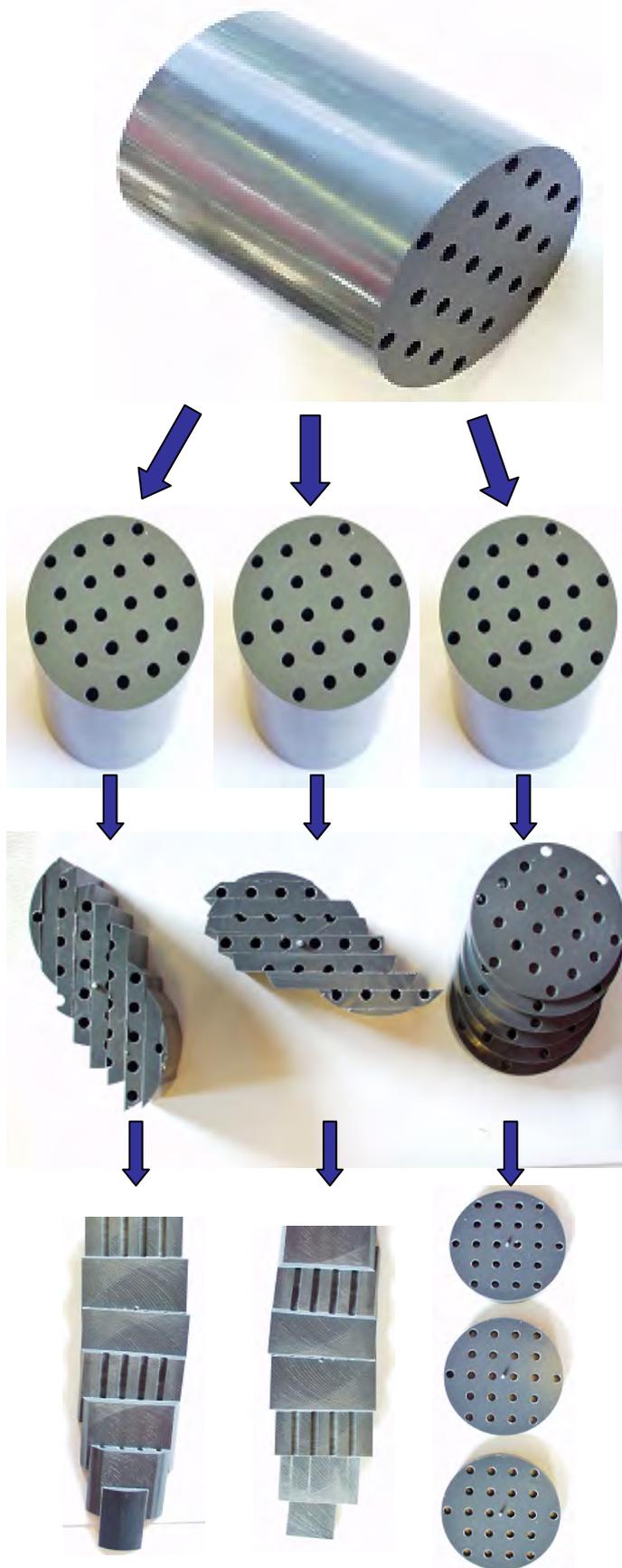
##### **3.2.1.1 Anisotropes homogenes Plastikblock Model**

In das flache, kreisförmige Ende eines 16,5 cm langen, zylindrischen Plastikblocks sind 22 parallele, homogen verteilte Löcher mit einem Durchmesser von 4 mm und einem Abstand von 1 cm zueinander, gebohrt worden, so dass diese komplett durch den Block verlaufen und somit am anderen flachen, kreisförmigen Ende des Plastikblocks wieder erscheinen (Abbildung 13 a). Die Bohrlöcher stellen anisotrope Strukturen innerhalb des Zylinders dar. Anschließend wird der Block in drei 5,5 cm lange Stücke gesägt, wobei die Schneideflächen parallel zu den flachen, kreisförmigen Flächen des Plastikzylinders verlaufen (Abbildung

13 b). Danach werden alle drei Blöcke nach einem einheitlichen, systematischen Zufallsprinzip (SURS) (siehe Abschnitt 2.4.2.3) [78] in parallele Scheiben gesägt, wobei die Schnittrichtung unterschiedlich ist. Der erste Block wird in x-, der zweite in y- und der dritte in z-Richtung aufgeschnitten (Abbildung 13 c). Die x-, y- und z-Achsen stehen rechtwinkelig zueinander und repräsentieren dadurch die drei möglichen Richtungen im dreidimensionalen Raum, die am weitesten voneinander entfernt liegen. Um dem SURS gerecht zu werden wird jeder Block unter Beachtung der Schnittrichtung theoretisch in durchschnittlich acht parallele Scheiben mit einer Dicke von 0,7 cm eingeteilt. Innerhalb des ersten Intervalls wird ein Punkt z zufällig gewählt. Dieser Punkt lag für den x-, y-, und z- Richtungs-Block bei 0,3 cm, 0,2 cm und 0,2 cm. Der zufällig bestimmte Punkt eines Plastikblocks stellt den Schnittpunkt für den ersten Sägeschnitt dar und von diesem ausgehend werden in einem Intervall von jeweils 0,7 cm die folgenden Schnittpunkte festgelegt. Die Frontflächen der entstehenden Scheiben eines Plastikblocks (Abbildung 13 d) werden mit Hilfe eines Lineals ausgemessen und alle Bohrprofile dieses einen Blocks werden manuell ausgezählt. Alle kalkulierten Flächen und Profile aller Scheiben des Blocks werden summiert und auf Profile pro 1 cm<sup>2</sup> berechnet. Es entstehen drei Ergebnisse, die in Relation zueinander gesetzt werden sollen.

## Material und Methoden

**Abbildung 13:** Darstellung des anisotropen, homogenen Plastikblock Modells



a)  
Der Plastikblock wird von anisotropen Strukturen durchzogen, die durch 22 parallele, homogen verteilte, durch den ganzen Block führende Bohrlöcher dargestellt werden.

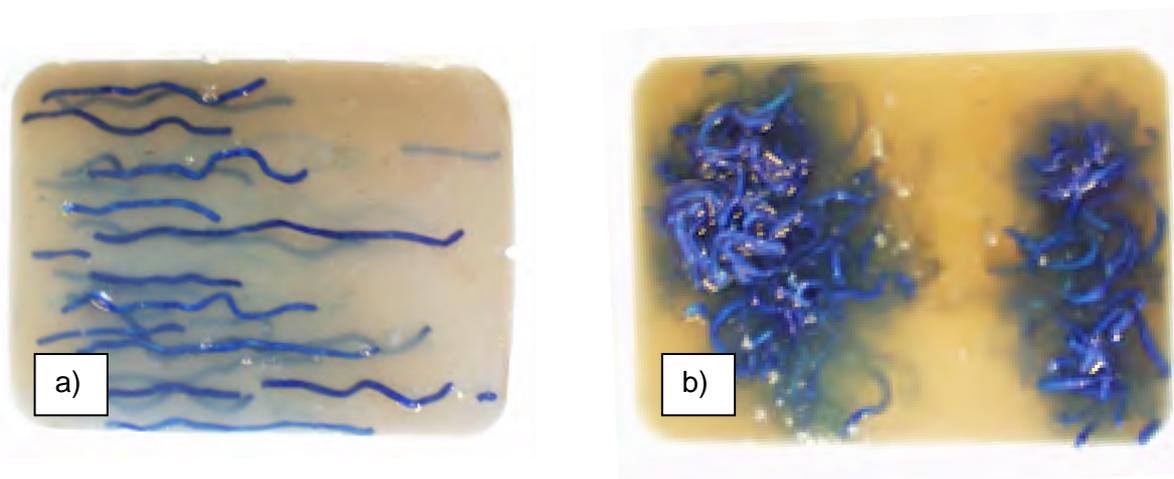
b)  
Der Plastikblock wird in drei gleich große Plastikzylinder gesägt.

c)  
Es werden von jedem Plastikzylinder nach einem systematischen, einheitlichen Zufallsprinzip gleichmäßig dicke Scheiben angefertigt, wobei für jeden Zylinder eine unterschiedliche Schnittrichtung x, y oder z verwendet wird.

d)  
Einige Scheiben der drei Blöcke sind beispielhaft dargestellt. Aus zwei Plastikblöcken entstehen Profile auf den Frontseiten, die sich im Gegensatz zu den Scheiben des dritten Blocks ähneln. In den ersten beiden Blöcken sind weniger längliche Profile enthalten als im quer geschnittenen dritten Block.

### 3.2.1.2 Anisotropes und isotropes heterogenes Nudel-Agar Model

Es werden gekochte und anschließend Toluidin blau gefärbte, leicht gewellte, chinesische Nudeln heterogen in erhitzten (ca. 70°C), flüssigen, 5%igen Agar (Agar, So-Bi-Gel, Bie & Berntsen A/S, Cat: BBB10030-1000, Dänemark) eingebettet, der sich in zwei rechteckigen Plastikboxen (18 x 13 x 6cm) befindet. Die Nudeln in der ersten agargefüllten Box werden anisotrop ausgerichtet, indem sie länglich und annähernd parallel zueinander gelegt werden (Abbildung 14 a) und im zweiten Block isotrop, indem unterschiedlich große Knäule von Nudeln in das Einbettmedium gebracht werden (Abbildung 14 b). Nachdem sich das Agarmedium bei Raumtemperatur abgekühlt hat und sich dadurch dessen flüssiger Zustand in einen festen umgewandelt hat, können die Nudel-Agar Blöcke dem Plastikbehältnis entnommen werden.



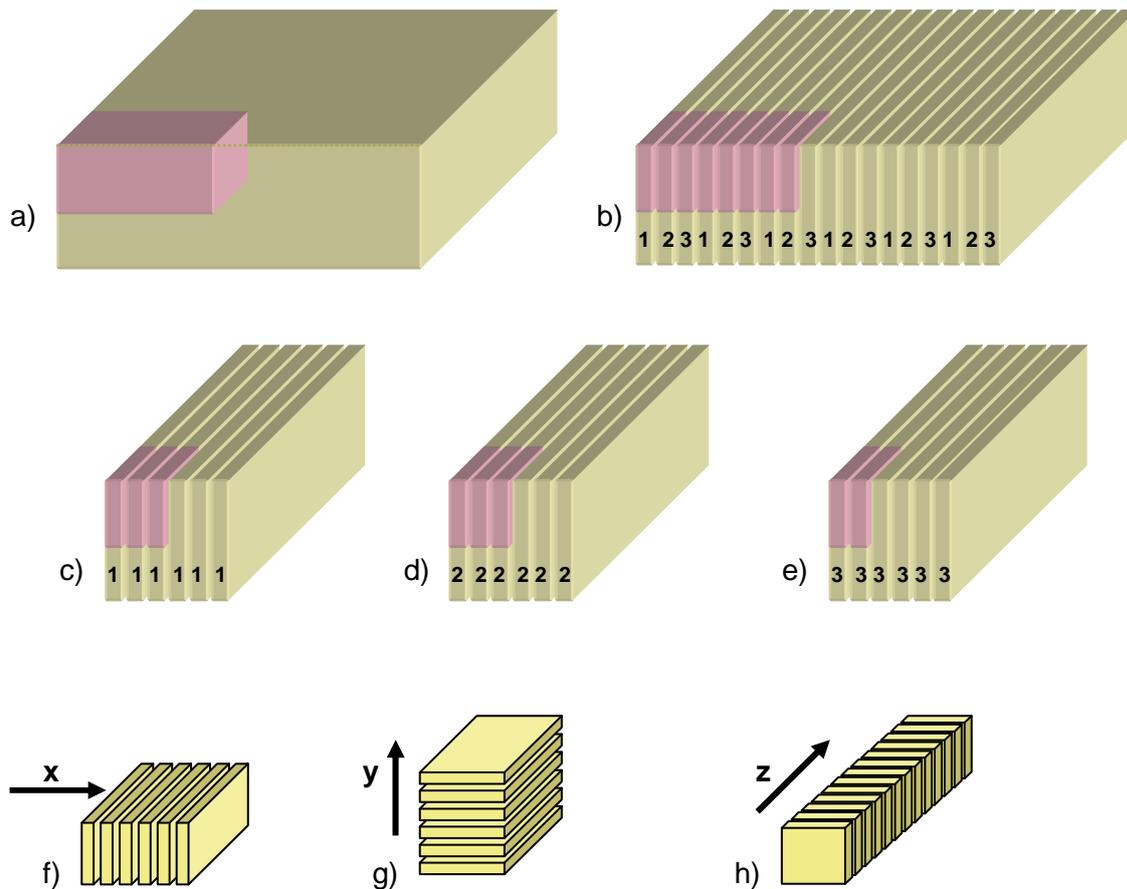
**Abbildung 14:** Darstellung des a) anisotropen, heterogenen Nudel-Agar Modells und b) des isotropen, heterogenen Nudel-Agar Modells

Die im folgenden beschriebene Prozedur wird für beide Modelle durchgeführt. Der Block wird mit Hilfe eines Lineals in 18 parallele Scheiben, die eine Dicke von 1 cm aufweisen, eingeteilt und mit einem Messer geschnitten (Abbildung 15 a, b). Jeweils jede erste, zweite und dritte Scheibe wird verwendet, um insgesamt drei Stapel aufzubauen (Abbildung 15 c-e). Dabei ist unbedingt darauf zu achten, dass die Front- und Hinterseite der Scheiben, wie sie im Originalblock vorgelegen haben, nicht vertauscht werden, so dass alle Frontseiten in eine Richtung im neu erbauten Stapel zeigen. Dann werden die drei Stapel mit einer sehr dünnen Schicht erwärmten, flüssigen Agars bestrichen, so dass nach dessen Abkühlung und Härtung die einzelnen Scheiben zusammen gehalten werden. Es entstehen also durch die beschriebene Prozedur drei repräsentative Proben aus einer heterogenen Originalprobe. Wäre das heterogene Objekt wie das homogene Plastikmodell einfach nur in drei Teile geteilt worden, wären keine repräsentativen Proben entstanden (Abbildung 16).

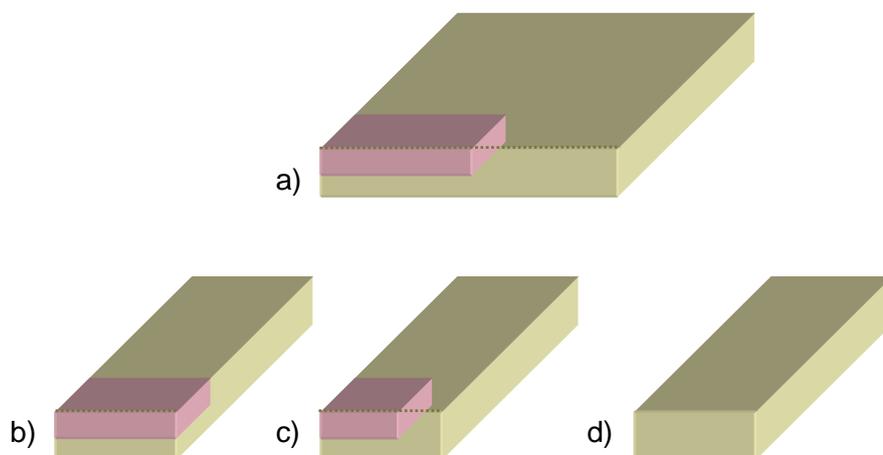
## Material und Methoden

Der erste Stapel wird nun nach dem bekannten einheitlichen, systematischen Zufallsprinzip, in x-, der zweite Stapel in y- und der dritte Stapel in z-Richtung aufgeschnitten (Abbildung 15 f-h). Die gewählte Intervallgröße liegt bei allen Stapeln bei 1 cm und daraus resultieren für die ersten beiden Probenblöcke bzw. Stapel sechs Scheiben (Abbildung 15 f, g) und für den dritten Probenblock 13 Scheiben (Abbildung 15 h). Aus zwei Stapeln (Abbildung 16 g,h) sind somit Scheiben produziert worden, die aus mehreren Anteilen zusammengesetzt sind (Abbildung 17 a), aus einem Stapel (Abbildung 16 f) sind Scheiben hergestellt worden, die komplett sind (Abbildung 17 b). Anschließend werden die Frontseiten aller Scheiben eines Probenblocks einmalig analysiert bzw. für die Zählung der Nudelprofile verwendet. Dafür wird für die kompletten Scheiben des einen Stapels (Abbildung 16 f) ein passender Zählrahmen verwendet, der davor mittels Geodreieck und Folienstift auf durchsichtige Folie gezeichnet worden ist (Abbildung 17 b). Dieser wird zufällig auf die auszuwertende Frontseite positioniert und die Nudelprofile werden nach einer strikten Zählregel, die an den Zählrahmen gebunden ist, ausgewertet (siehe Abschnitt 2.4.4.1). Zusätzlich wird jedes gezählte Nudelprofil durch einen Folienstift auf der Folie markiert, um Über- oder Unterzählungen zu vermeiden. Sowohl bei dem Stapel mit den kompletten Scheiben des heterogenen anisotropen Nudel-Agarblocks als auch des heterogenen isotropen Nudel-Agarblocks ist ein Zählrahmen mit den Maßen 5 x 13 cm<sup>2</sup> verwendet worden. Abschließend werden alle Profilmarkierungen aller Scheiben eines Probenblocks addiert  $\sum Q(\text{prof})$  und alle analysierten Zählrahmflächen summiert  $\sum P(\text{frame})$ . Die Summe der Zählrahmen  $\sum P(\text{frame})$  wird mit der Zählrahmengröße multipliziert. Die Nudelprofildichte  $Q_A$  wird nach folgender Formel berechnet. Die Nudelprofilanzahl pro 1cm<sup>2</sup> wird aus dieser Formel ermittelt.

$$Q_A = \frac{\sum Q(\text{prof})}{\sum P(\text{frame}) \cdot a(\text{frame})}$$



**Abbildung 15:** Skizze eines Gewebeblocks (gelb) mit einer heterogen verteilten Struktur (rosa) (a). Der Block wird in 18 parallele Scheiben eingeteilt (b) und jede erste (1), jede zweite (2) und jede dritte (3) Scheibe wird zum Aufbau eines Stapels verwendet. Die drei neu erstellten Blöcke (c, d, e) stellen repräsentative Proben des originalen Gewebes dar. Abbildungen 30 f, g, h stellen Skizzen der Schneiderichtungen dar. Der erste Probenblock wird in x-Richtung (f), der zweite Probenblock in y-Richtung (g) und der dritte Probenblock in z-Richtung (h) nach einem systematisch einheitlichen Zufallsprinzip in parallele Scheiben geschnitten.

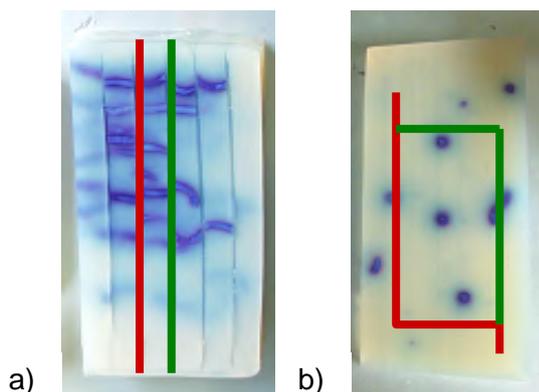


**Abbildung 16:** Skizze eines Gewebeblocks (gelb) mit einer heterogen verteilten Struktur (rosa) (a). Der Block wird in drei Stücke geteilt (b,c,d), wobei alle drei unterschiedlich stark die Eigenschaften des Originalblocks repräsentieren. Im ersten Stück (b) ist die Struktur enthalten, im dritten Stück (d) nicht.

## Material und Methoden

Die Auswertung der zusammengesetzten Scheiben (Abbildung 16 g, h) folgt der Zählregel nach Giger. Hierfür wird jedes Segment der Scheiben einzeln analysiert (Abbildung 17 a). Die rechte Schnittkante repräsentiert die Einschlusslinie und die linke die Ausschlusslinie. Das bedeutet, wenn ein Profil die Einschlusslinie überquert oder berührt oder zwischen den beiden Linien liegt wird es gezählt; berührt oder überquert es die Ausschlusslinie, wird es nicht gezählt. Auch hier werden die gezählten Profile mit einem Folienstift markiert, indem auf die Scheibenoberfläche eine durchsichtige Folie gelegt wird. Die einzelnen Segmente stellen die Auswertungsflächen dar, die in dieser Studie bei durchschnittlich 6 cm<sup>2</sup> für den einen Stapel (Abbildung 16 h) bzw. 13 cm<sup>2</sup> für den anderen Stapel (Abbildung 16 g) liegen. Alle gezählten Profile aller Scheiben pro Stapel werden summiert ( $\sum Q(\text{prof})$ ) und alle Auswertungsflächen addiert ( $\sum a(\text{segment})$ ), so dass die Nudelprofildichte  $Q_A$  nach folgender Formel errechnet werden kann. Die Nudelprofildichte pro 1 cm<sup>2</sup> wird aus dieser Formel ermittelt.

$$Q_A = \frac{\sum Q(\text{prof})}{\sum a(\text{segment})}$$



**Abbildung 17:** Die Abbildung zeigt zwei Scheiben des heterogenen, anisotropen Nudel-Agar Modells, a) eine zusammengesetzte Scheibe, die nach der Gigerschen Zählregel (rote Ausschluss- und grüne Einschlusslinie) ausgewertet wird und b) eine komplette Scheibe, die mittels Zählrahmen (rote Ausschluss-, grüne Einschlusslinie) ausgewertet wird. (Die Ausschluss- und Einschlusslinien sind in beiden Bildern nachträglich eingefügt worden.)

Es wird also aus den drei Probenblöcken eines Nudel-Agar-Modells jeweils ein Ergebnis für die Nudelprofildichte/cm<sup>2</sup> ermittelt. Diese drei Ergebnisse werden in Relation zueinander gesetzt, indem ermittelt wird, um wie viel sich diese Ergebnisse voneinander unterscheiden. Dadurch kann die Wahrscheinlichkeit der Anisotropie bzw. Isotropie der Nudeln ermittelt werden.

### 3.2.1.3 Untersuchung der Verlaufsrichtung (Isotropie/Anisotropie) der Tumorgefäße

#### 3.2.1.3.1 Tumore

Es werden drei experimentelle Lungenkarzinome (humane Lungentumorzelllinie A549) von der Abteilung Optical Imaging & New Modalities Research der Bayer Schering Pharma AG direkt nach deren Entnahme aus der Nacktmaus zur Verfügung gestellt. Die Tumore werden für 24 Stunden in Zinklösung (10x Zinc Fixative, BD Biosciences Pharmingen, Cat: 552658,

USA), in einem verschließbaren Glasbehältnis bei Raumtemperatur fixiert und anschließend bearbeitet.

### 3.2.1.3.2 Anfertigung der Tumorschnitte

Die Anfertigung der Tumorschnitte folgt den Prinzipien, die unter Punkt 3.2.1.2 für die Nudel-Agar Modelle bereits erläutert worden sind. Eine Übersicht über die Anzahl der entstehenden Proben ist in Tabelle 1 dargestellt.

#### ***Vibratomschnitte***

Die Tumore werden einzeln in mit erwärmtem (ca. 70°C), flüssigem Agar (Agar, So-Bi-Gel, Bie & Berntsen A/S, Cat: BBB10030-1000, Dänemark) gefüllte rechteckige Plastikformen eingebettet. Nachdem sich der Agar bei Raumtemperatur abgekühlt und somit verfestigt hat, werden die Agar-Tumorblöcke von der Plastikform getrennt. Danach werden die Proben mittels Vibratom (Vibratome 3000+, Vibratome, USA) in parallele, gleich dicke Scheiben geschnitten, wobei die Originalgröße des Tumors berücksichtigt wird. Es resultieren aus dem ersten Tumor Scheiben mit einer Dicke von 400 µm, aus dem zweiten von 500 µm und aus dem dritten von 250 µm. Die im folgenden beschriebene Prozedur wird für alle drei Tumore durchgeführt. Jeweils jede erste, zweite und dritte Scheibe wird unter Berücksichtigung ihrer Schnittrichtung auf jeweils einen Stapel gelegt, so dass drei Stapel entstehen, die aus Scheiben aufgebaut sind, deren Frontseiten in eine Richtung weisen (Tabelle 1). Im Durchschnitt besteht jeder Stapel aus fünf Scheiben, die wiederum in eine mit erwärmtem, flüssigem Agar gefüllte, rechteckige Plastikeinbettform gebracht werden, so dass die einzelnen Scheiben durch das sich verfestigende Medium zusammen gehalten werden (Abbildung 18 a). Die drei hergestellten Stapelblöcke stellen repräsentative Proben des heterogenen Originalgewebes dar, da sie dessen morphologischen Charakter widerspiegeln. Anschließend wird die Tumorprobe von überflüssigem Agarmaterial befreit, so dass das Tumorgewebe nur von wenig Agar umgeben ist, aber noch hinreichend zusammengehalten wird.

Es werden also pro Tumor jeweils drei repräsentative Tumorproben hergestellt.

## Material und Methoden

Tumor Nr.	Scheibendicke	Anzahl repräsentativer Probenblöcke	Schnittsets pro Probenblock	Schnittsets für Auswertung	Schnittsets als Ersatz
1	400 µm	1 Probe: x- Richtung	3	1	2
		1 Probe: y- Richtung	3	1	2
		1 Probe: z- Richtung	3	1	2
2	500 µm	1 Probe: x- Richtung	3	1	2
		1 Probe: y- Richtung	3	1	2
		1 Probe: z- Richtung	3	1	2
3	250 µm	1 Probe: x- Richtung	3	1	2
		1 Probe: y- Richtung	3	1	2
		1 Probe: z- Richtung	3	1	2

**Tabelle 1:** Übersicht der resultierenden Proben aus den drei originalen Tumorgewebeproben.

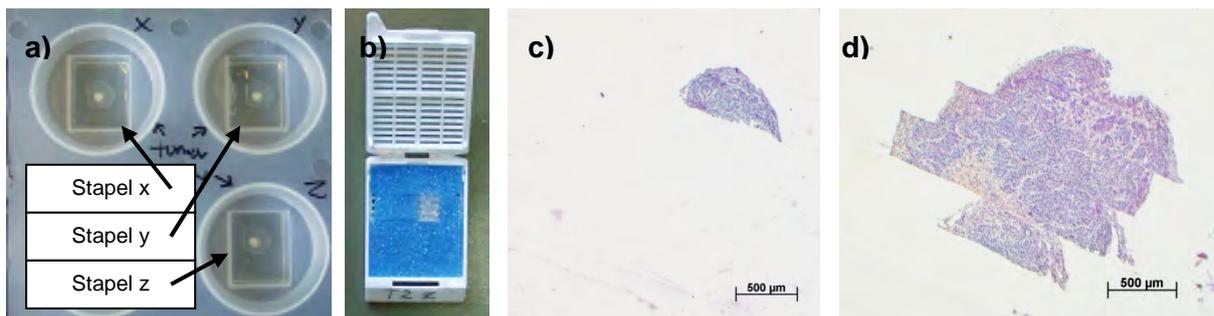
### **Paraffineinbettung**

Jeder so hergestellte Tumorgewebestapel wird in eine Standardplastikkassette (Medim uni-safe, Hounissen, Cat: 10-0113-A, Dänemark), die für Paraffineinbettungen geeignet ist, gelegt und mit einem synthetischen, porösen Schaumgummi (Präparate-Schutzpolster, XT Commerce, B9190195, Deutschland) fixiert, um eine Positionsänderung zu vermeiden (Abbildung 18 b). Paraffin kann sowohl den Agar als auch das Schaumstoffmaterial infiltrieren, so dass diese Materialien den Einbettprozess nicht behindern. Es gilt wieder, dass eine Probe in x-, eine in y- und eine in z-Richtung aufgeschnitten werden soll, so dass alle drei Proben unterschiedlich in der Einbettbox positioniert werden müssen. Der Stapelblock wird so in die Plastikkassette gelegt, dass die Seite nach unten weist, die die spätere Schnittfläche darstellen soll. Letztendlich werden die Kassetten mit den Proben über Nacht in ein automatisches Paraffin-Einbettungs-System gebracht (Infiltrationssystem: Citadel 1000, Shandon, USA; Einbettssystem: Leica EG1150C, Leica, Deutschland). Hierbei werden die Tumorgewebe zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 95%, 95%, 100% Ethanol) für jeweils zwei Stunden pro Alkohollösung dehydriert. Anschließend wird der Alkohol aus dem Gewebe mittels Xylol entfernt (zwei Stunden). Dann wird das Gewebe für zwei Stunden mit Paraffin (Histowax, Histolab, Dänemark) bei einer Temperatur von ca. 58°C infiltriert. Nachdem die Kassetten am nächsten Tag aus dem System geholt worden sind, werden sie bei Raumtemperatur getrocknet, so dass das Einbettmedium härten kann und die Paraffinproben aus der Kassette gelöst werden können.

### **Paraffinschnitte**

Alle neun Proben der drei Tumore werden anschließend in ein Paraffinschneidegerät (2050 supercut, Reichert-Jung, Deutschland) eingespannt und geschnitten, so dass nach dem

bekanntes einheitliches, systematisches Zufallsprinzip (siehe Abschnitt 2.4.2.3) ein Set mit durchschnittlich acht Schnitten pro Gewebeprobe entsteht. Hierfür wird die Höhe der eingebetteten Tumorseiten mit Hilfe eines Lineals ausgemessen, um die Größe des Intervalls zu ermitteln, das den Tumor in acht gleich dicke, parallele Scheiben einteilt. Innerhalb des ersten Intervalls wird zufällig ein Punkt gewählt. Dieser stellt die Schnittstelle für den ersten Schnitt dar. Ausgehend von diesem Punkt wird der Tumor in die ermittelten Intervalle eingeteilt und das Ende eines jeden Intervalls stellt die neue Schnittstelle dar. Zusätzlich werden zwei Serienschritte von jedem Schnitt des ersten Sets angefertigt, so dass zwei weitere Sets mit durchschnittlich acht Schnitten entstehen, die als Ersatzsets dienen sollen (Tabelle 1). Die 3 µm dicken Paraffinschnitte werden unmittelbar nach der Herstellung zunächst mit Hilfe eines Pinsels in ein Wasserbad (ca.40°C) gelegt, um dann aus diesem mittels Pinsel auf Objektträger (Superfrost, Menzel Gläser, Hounissen, Dänemark) aufgezogen zu werden. Die Schnitte werden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend werden sie in einer Plastikbox für histologische Schnitte bei -20°C gelagert.



**Abbildung 18:** Die Abbildung stellt Abschnitte der Bearbeitung eines Tumorgewebes dar. a) Die Vibratomschnitte werden in drei Stapel geteilt und mit Agar fixiert. b) Jede der drei Proben eines Tumors wird in einer Plastikbox mittels Schaumgummi (blau) zur Paraffineinbettung derart fixiert, dass die bestimmte Schnittfläche (x, y oder z-Richtung) direkt vorliegt. c-d) Beispiele von immunhistochemisch (CD31) gefärbten, zusammengesetzten Tumorschnitten.

### 3.2.1.3.3 Immunhistochemische Färbung an Paraffinschnitten (CD31)

Die verwendeten Substanzen sind im Anhang in Tabelle 11 aufgeführt. Zur Entparaffinisierung werden die Schnitte zunächst durch eine absteigende Alkoholreihe (2 x 5 min. Xylol, 2 x 0,5 min. 100%iger Alkohol (Ethanol), 2 x 1 min. 96%iger, 2 x 1 min. 80%iger, 1 min. 70%iger, 1 min. 50%iger) und dann in VE- (vollständig entsalzt) Wasser (1 min.) geführt. Die Antigendemaskierung (persönliche Mitteilung von A.-L. Frisk und S. Bassow, Bayer Schering Pharma AG Berlin) erfolgt durch eine Inkubation (10 min.) mit 0,1%iger Trypsinlösung in einer feuchten Kammer (FK) bei 37°C. Alle weiteren Inkubationen erfolgen bei Raumtemperatur (RT). Waschprozesse werden mit PBS (phosphate buffer saline)-Puffer durchgeführt und folgen nach jedem Inkubationsschritt. Die Aktivität der endogenen

## Material und Methoden

Peroxidase wird durch eine spezielle, Wasserstoffperoxid beinhaltende Lösung durch 10minütige Inkubation blockiert. Die Blockierung des endogenen Biotins folgt. Dafür wird eine Avidin und eine Biotinlösung nacheinander für je 20 min. aufgetragen. Die unspezifischen Proteinbindungsstellen werden durch 10%iges Ziegenserum blockiert (30 min., FK, RT) und mit einem kurzen Eintauchen der Schnitte in den PBS-Puffer abgeschlossen. Anschließend wird der Primärantikörper, ein monoklonaler Ratte-anti-Maus CD31 Antikörper (1:200) aufgetragen (80 min., FK, RT). Die Antikörper werden stets in einer speziellen Antikörperlösung verdünnt. Für die erste Negativkontrolle wird anstelle des ersten anti-CD31 Antikörpers nur das spezielle Antikörperverdünnungsmittel auf einen Tumorschnitt aufgetragen und für die zweite Negativkontrolle biotinyliertes Immunglobulin IgG2 von der Ratte (1:1000). Für die Positivkontrolle wurde Herzgewebe von der Nacktmaus verwendet. Anschließend folgt die Inkubation (30 min., FK, RT) des Sekundärantikörpers (1:200), ein biotinylierter polyklonaler Ziege-anti-Ratte Antikörper. Die Schnitte werden dann mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase inkubiert (30 min., FK, RT). Danach wird 3,3 Zoll-Diaminobenzidin (DAB) Lösung auf die Schnitte aufgetragen. Es wird erst dann 5 min. lang durch VE-Wasser und darauf folgenden Waschprozess entfernt, wenn augenscheinlich eine Braunfärbung innerhalb der Tumorgewebe statt gefunden hat. Zur Orientierung dient hierfür die Positiv- und Negativkontrolle. Die Inkubationszeit mit DAB richtet sich individuell nach den Tumoren und liegt zwischen drei bis fünf Minuten. An den Stellen der Endothelzellen, an denen der erste Antikörper gebunden hat und mit dem zweiten Antikörper und der Streptavidin-Horseradish-Peroxidase einen Komplex gebildet hat, wird das DAB durch einen Oxidationsprozess in ein unlösbares braunes Endprodukt umgewandelt, so dass die Blutgefäße braun erscheinen. Die Gegenfärbung der Zellkerne wird mit Hämatoxylin durchgeführt (45 Sek.). Nachdem die Schnitte kurz in ein VE-Wasserbad eingetaucht worden sind, werden sie für 10 min unter fließendes Leitungswasser gestellt. Die Schnitte werden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 100% Ethanol) geführt und abschließend mindestens für 2 min. in Xylol gestellt. Deckgläschen schließen mit Hilfe von lösemittelhaltigem Eindeckmedium das Gewebe auf den Objektträgern ein.

### 3.2.1.3.4 Auswertung mittels stereologischer Werkzeuge

**Stereologisches System:** Das Mikroskop (Olympus BX 50, 50F-3, 5A03752, Japan) ist mit einer mechanischen Objektträgerhalterbühne ausgestattet, die mit einem Computer in Verbindung steht, auf dem wiederum das stereologische Programm CAST (Cast version 2.1.6.1., Olympus, Dänemark) läuft. Eine Kamera (3-CCD, Ky-F 55B, JVC, DP 70, Olympus, Japan) ist mit dem Mikroskop verbunden und überträgt das mikroskopische Bild auf den Computerbildschirm. Die manuell eingestellte Vergrößerung des Mikroskops muss stets mit der manuell eingegebenen Vergrößerungsangabe im Programm übereinstimmen.

**Stereologische Auswertung:** Das immunhistochemisch bearbeitete Set einer Tumorprobe wird für die Auswertung mittels stereologischen Systems herangezogen (Abbildung 18 c-d zeigt beispielhaft zusammengesetzte Tumorschnitte). Jeder Schnitt eines Tumorsets wird einzeln ausgewertet. Das Tumorgewebe wird unter Verwendung einer 1,25x/0,4 Linse (Olympus, Japan) mikroskopiert und bei einer Vergrößerung von 43fach auf dem Bildschirm wiedergegeben. Es wird manuell mittels eines stereologischen Programms eine grobe Kontur um das Abbild des Tumorschnittes gezogen, um die zu analysierende Region zu definieren. Mikroskop und stereologisches Programm werden nun auf die 20x/0,7 Linse (Olympus, Japan) umgestellt, woraus eine Vergrößerung des mikroskopischen Tumorgewebes auf dem Computerbildschirm von 688fach resultiert. Diese Vergrößerung ermöglicht die Blutgefäßprofile sicher identifizieren zu können. Die Zählrahmengröße wird festgelegt, indem aus den zur Verfügung stehenden Zählgittern der „counting frame“ (dt.: Zählrahmen) ausgewählt wird und in das sich öffnende Fenster die Größe eingegeben wird, die sich an der durchschnittlichen Anzahl der Ereignisse (Blutgefäßprofile) innerhalb des Zählrahmens orientiert, die mindestens bei drei liegen sollte. Für diese stereologische Auswertung ist für alle auszuwertenden Tumore eine Zählrahmengröße von 28500  $\mu\text{m}^2$  gewählt worden. Anschließend wird über den Befehl „Meanderscan“ der systematische Abstand in x- und y- Richtung zwischen den einzelnen auszuwertenden Gesichtsfeldern eingegeben. Die definierten Abstände zwischen den auszuwertenden Feldern und die Größe des Zählrahmens werden für alle Schnitte des Sets eines Tumors übernommen. Nur für jeden neu zu untersuchenden Tumor werden die Einstellungen gegebenenfalls geändert und an das Gewebe angepasst. Die Zählung der Blutgefäßprofile kann nach Beginn des Meanderscans bei der eingestellten Vergrößerung (688fach) durchgeführt werden. Das Computerprogramm definiert und fährt automatisch durch die mechanische Bühne zu den auszuwertenden Feldern, auf die es stets den Zählrahmen projiziert. Die mikroskopischen Gesichtsfelder sind somit einheitlich gewählt, systematisch voneinander entfernt und zufällig vom System innerhalb der Tumorkontur platziert worden, so dass die Kriterien des SUR Prinzips (siehe Abschnitt 2.4.2.3) [78] erfüllt werden. Die Auszählung der Blutgefäßprofile folgt einer mit dem Zählrahmen verbundenen strikten Zählregel [68, 86], die vorgibt, dass jedes Blutgefäßprofil gezählt wird, das innerhalb des Zählrahmens liegt oder die Einschlusslinie überschreitet oder berührt. Die Blutgefäßprofile, die die Ausschlusslinie berühren oder überschreiten werden nicht gezählt (siehe Abschnitt 2.4.4.1). Die Definition eines Blutgefäßprofils folgt der nach Weidner [27], die bereits im Abschnitt 2.3.2.1 aufgeführt worden ist. Die gezählten, positiv gefärbten Endothelzellprofile werden mit einem Marker gekennzeichnet. Zusätzlich erfolgt eine Markierung der Ecken des Zählrahmens mit einem Marker, wenn die Ecke Tumorgewebe schneidet. Die Beendigung der Auswertung eines Gewebefeldes wird in das stereologische Programm eingegeben, durch das dann

## Material und Methoden

automatisch zum nächsten Feld gefahren wird. Alle beiden Marker werden einzeln pro Schnittauswertung vom Programm summiert und abschließend für alle Schnitte eines Sets ermittelt. Die gesamte Profilanzahl sollte zwischen 100 und 200 liegen [68], um „unbiased“ Resultate zu gewährleisten.

Nach der Auszählung eines Schnittsets wird die Blutgefäßprofilanzahl pro Fläche  $Q_A$  nach folgender Formel berechnet (siehe auch Abschnitt 2.4.4.1), wobei  $\sum Q(\text{prof})$  für die Summe aller Blutgefäßprofile steht und  $\sum P(\text{frame})$  für die Summe aller Punkte, die gesetzt worden sind, wenn Tumorgewebe die Ecke des Zählrahmens getroffen hat. Die Fläche des Zählrahmens  $a(\text{frame})$  fließt ebenfalls in die Formel ein.

$$Q_A = \frac{\sum Q(\text{prof})}{\sum P(\text{frame}) \cdot a(\text{frame})}$$

Anschließend werden alle Blutgefäßprofilresultate pro 1 mm<sup>2</sup> errechnet.

### 3.3 Einfluss der histologischen Bearbeitung auf die Schrumpfung von Gefrierschnitten (systematische Fehler nicht stereologischen Ursprungs)

In den folgenden Untersuchungen werden Gefrierschnitte für stereologische Auswertungen (Dichte und Länge tumoraler Blutgefäße, Tumorumfänge) herangezogen. Technische und umgebungsbedingte (z. B. Lufttrocknung, Alkohollösungen), histologische Einflüsse (systematische Fehler nicht stereologischen Ursprungs), die sich auf die Gefrierschnitte und somit auch auf die Auswertungen niederschlagen können, sollen daher vorher überprüft werden (siehe Abschnitt 2.4.2.2). Hierfür wird zum einen das Kryotom technisch überprüft, zum anderen wird die Deformation bzw. die Schrumpfung eines Tumorgewebeschnittes untersucht, indem die Gewebeoberfläche eines tiefgefrorenen Tumors im Einbettmedium mit der Fläche eines histologischen Schnitts verglichen wird. Der Vergleich der Flächen basiert auf einer modifizierten Methode nach Dorph-Petersen et al. (2000), [73]. In ihrer Studie beschreiben sie u. a. die Ermittlung der Flächendeformation.

#### 3.3.1 Kalibrierung des Kryostats mittels einer Messuhr

Alle Gefrierschnitte dieser Studie sind mit dem HM560 Kryostat der Fa. Microm (HM 560, Microm, Cat:956060, Deutschland) angefertigt worden, an dem die Schnittdicke eingestellt werden kann. Der Vorschub des Gerätes, der mit dem Teilbereich verbunden ist, an dem die Gefrierprobe eingespannt wird, müsste mit der eingegebenen Schnittdickeneinstellung übereinstimmen.

Um die Vorschubstrecke des Kryostats zu überprüfen, wurde zunächst die Schnittdicke auf 5 µm am Gerät eingestellt. Anschließend wurde eine Messuhr mit der Unterstützung eines Technikers der Firma Microm im Gerät angebracht, so dass diese den Vorschub bemessen konnte. Die Messuhr konnte nur in dem Bereich, in dem normalerweise die Gefrierprobe eingespannt wird, befestigt werden. Daher wurde keine Gefrierprobe für diese Untersuchung in den Kryostat eingespannt. Nach der Einstellung der Messuhr durch den Techniker der Firma Microm wurde der Vorschub nach 100, 200, 300, 400 und 500 Schnittbewegungen des Kryostaten an der Messuhr abgelesen.

### **3.3.2 Bemessung der Fläche des Tumorschnittes vor und nach dem Schneide- und Färbeprozess**

In der folgenden Untersuchung soll der Einfluss der technischen Herstellung und der Färbung eines Gefrierschnitts eines tumoralen Gewebes untersucht werden. Dafür wird die Flächendeformation des Tumorgewebeschnitts vor und nach dem Schneide- und Färbeprozess ermittelt.

Ein aus der Nacktmaus stammender, experimenteller Mammatumor (humane Brusttumorzelllinien MCF7) wurde von der onkologischen Abteilung der Bayer Schering Pharma AG durch Herrn Dr. H. Hess-Stumpp zur Verfügung gestellt. Die Tumorprobe lag tiefgefroren, eingebettet in Tissue tek (O.C.T. Compound, Cat: 041831008, Sakura, Niederlande) vor und wurde bis zur Bearbeitung bei -80°C gelagert.

Der Probenblock wird in den Kryostat eingespannt und soweit getrimmt, bis ungefähr die Mitte des Tumors erreicht ist und sich somit hinreichend Tumormaterial auf der Schnittoberfläche präsentiert. Es werden zusätzlich einige 5 µm dicke Schnitte abgetragen, um die geeignete Schneide- und Objekttemperatur auf das Material und die Schnittdicke abzustimmen. Die Temperatur der Probe wird auf -15°C eingestellt, die der Schneideklinge (Microtome blades, Type C35, Feather, Japan) auf -18°C. Dann folgt die Anfertigung von insgesamt fünf Gefrierschnitten aus dem mittleren Tumorbereich (keine Serienschnitte). Bevor ein Kryostatschnitt angefertigt und auf einen raumtemperierten Objektträger aufgezogen wird, wird ein Lineal an den Gewebekblock gehalten und dies mittels Digitalkamera (Nikon, Cool Pix 995) fotografiert (Abbildung 19 a). Die Gewebeschnitte werden bei Raumtemperatur für eine Stunde getrocknet. Anschließend werden die Objektträger auf eine dunkle Fläche, in diesem Fall einen dunkelgrünen Labortisch, gelegt, um die nativen Gewebe einschließlich dem daneben gelegten Lineal zu fotografieren (Abbildung 19 b). Danach werden die Tumorschnitte gefärbt (siehe Abschnitt 3.3.2.1) und anschließend auf einen hellen Untergrund, auf ein weißes Blatt Papier, neben ein Lineal

## **Material und Methoden**

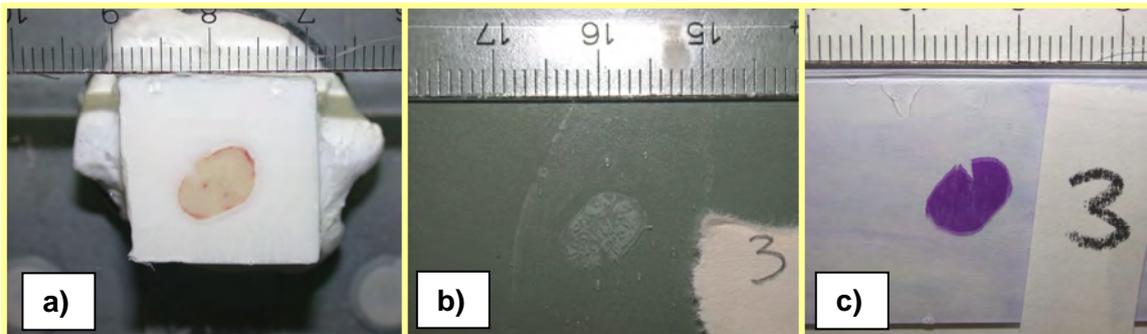
gelegt, um davon ebenfalls Digitalfotos anzufertigen (Abbildung 19 c).

### **3.3.2.1 Hämalaun Färbung**

Danach werden die fünf Schnitte zunächst für 30 sek. in 4°C kaltem Aceton fixiert und dann für 2 min. mit Hämalaunlösung überzogen. Anschließend werden die Schnitte zur Bläuung der Zellkerne für 10 min. unter laufendes Leitungswasser platziert. Abschließend werden die histologischen Gewebeschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) geführt und für mindestens 2 min. in Xylol gestellt. Das Eindecken erfolgt mit dem Eindeckmedium Eukitt. Die verwendeten Substanzen sind im Anhang in Tabelle 11 aufgeführt.

### **3.3.2.2 Stereologische Ausmessung der Schnittfläche mittels Zählgitter**

Alle angefertigten Digitalfotos (der Oberflächen des Gefrierblocks, der Nativschnitte und der gefärbten Schnitte) werden auf weißes Papier ausgedruckt und einzeln und in zufälliger Reihenfolge unter einer Stereolupe (Nikon 76449), die mit zwei Lichtquellen (Highlight 2000, Olympus) ausgestattet ist, mittels Punktegitter, wie es bei der Cavalieri Methode angewendet wird (siehe Abschnitt 2.4.3), ausgewertet. Hierfür wird ein schwarzes Gitter, das aus 1 mm<sup>2</sup> großen Kästchen besteht und auf einer durchsichtigen Folie abgebildet ist, zufällig auf das Gewebefoto gelegt. Nur wenn die untere linke Ecke eines Kästchens mit der Tumorgewebeabbildung gefüllt ist, wird es gezählt. Anschließend werden die gezählten Punkte summiert und mit der Kästchengröße von 1 mm<sup>2</sup> multipliziert, um die Gesamtfläche zu ermitteln. Zusätzlich wird der Maßstab des Fotos ermittelt, indem das abgebildete Lineal mit einem Lineal ausgemessen wird, und mit der ausgewerteten Fläche verrechnet, um das Endergebnis für die Flächengröße des Gewebes zu erhalten. Die ermittelten Resultate für die Gefrierblock-, Nativschnitt- und gefärbten Schnittflächen werden miteinander verglichen, um die Schrumpfung bzw. Deformation zwischen den einzelnen Schritten zu ermitteln.



**Abbildung 19:** Anhand des dritten Tumorschnitts des Mammatumors sind die fotografischen Abbildungen beispielhaft dargestellt. Im ersten Bild (a) stellt sich der angeschnittene Tumor eingespannt in der Kryostatvorrichtung dar. Im zweiten Bild (b) erscheint der bei Raumtemperatur getrocknete, weißliche Gewebeschnitt auf dem Objektträger, im dritten Bild (c) liegt derselbe Schnitt mit Hämalaun gefärbt vor.

### 3.4 Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge und deren Übereinstimmung

In dieser Arbeit wurde die Reproduzierbarkeit von zwei Methoden überprüft und zusätzlich deren Übereinstimmung. In diesem Zusammenhang sollen die Begriffe Reproduzierbarkeit und Übereinstimmung vorab definiert werden. Die *Reproduzierbarkeit* gibt die Wiederholbarkeit einer Methode an. Wenn eine Methode unter den gleichen Versuchsbedingungen wiederholt angewendet wird, sollten im Idealfall die gleichen Ergebnisse erzielt werden. Daher wird bei wissenschaftlichen Methoden stets eine sehr hohe Reproduzierbarkeit angestrebt. Die *Übereinstimmung* von zwei Methoden beschreibt das Maß an Vergleichbarkeit bzw. Gleichheit der Endergebnisse, die die jeweilige Methode liefert. Sind die Endergebnisse beider Methoden identisch, so stimmen die Methoden überein. Weichen die Endergebnisse jedoch stark voneinander ab, so ist die Übereinstimmung beider Methoden sehr gering.

Die Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge soll durch die mikroskopische Auswertung tumoraler Blutgefäße immunhistochemisch gefärbter Tumorgewebeschnitte von insgesamt elf experimentellen Tumoren überprüft werden. Hierfür werden für beide Methoden histologische Tumorgewebeschnitte eines Tumors a) wiederholt ausgewertet (mehrfache Auszählung des gleichen Schnittes (Weidner) bzw. des gleichen Schnittsets (Stereologie)) und b) unterschiedliche Schnitte eines Tumors ausgewertet (einfache Auszählung mehrerer Schnitte (Weidner) bzw. Schnittsets (Stereologie)). Die Untersuchung der Übereinstimmung

## Material und Methoden

beider Methoden wird anhand der erhobenen Resultate der wiederholten Auswertung (a) vorgenommen.

Bei der Untersuchung der Reproduzierbarkeit der beiden Methoden wird beachtet, dass die Reihenfolge der Auswertung der Schnitte bzw. Schnittsets aller elf Tumore zufällig gewesen ist. Sowohl der zufällige Zeitabstand, der zwischen mehreren Tagen oder Wochen liegen kann, als auch die zufällige Reihenfolge der Schnitte bzw. Schnittsets dienen der Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode, um zu vermeiden, dass der Untersucher von vorigen Ergebnissen des jeweiligen Tumors beeinflusst werden kann.

### 3.4.1 Versuchsvorbereitung

#### 3.4.1.1 Tumore

Die onkologische Abteilung der Bayer Schering Pharma AG Berlin stellte durch Herrn Dr. H. Hess-Stumpp zwei Lungenkarzinome der humanen Zelllinie A549 und drei epitheliale Prostatakarzinome der humanen Zelllinie DU145 zur Verfügung, die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert worden waren. Diese sind in eine rechteckige Plastikeinbettform (Peel-A-Way Embedding Mold, Prod No. 27110, Ted Pella, Inc., Redding, USA) im Einbettmedium Tissue tek (O.C.T. Compound, Cat: 041831008, Sakura, Niederlande) eingebettet und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  in Isopentan (Isopentan, Fluka, Cat: 59075, Schweiz) tiefgefroren worden. Sechs unvollständige Mammakarzinome der humanen Zelllinie MDA-MB 435 wurden von dem radiologischen Institut (Klinische Radiologie, Röntgendiagnostik) der Universität Münster durch Herrn A. Wall zur Verfügung gestellt. Diese tiefgefrorenen Tumore sind auf Trockeneis gelagert zugesendet worden. Sie wurden nach Ankunft in die oben genannte Einbettform und das Einbettmedium gebettet und mittels Isopentan tiefgefroren. Alle elf Tumore wurden bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Alle Tumorproben sind ursprünglich experimentell in Nacktmäusen angezüchtet worden. Die genaue Bezeichnung der Tumore ist im folgenden aufgelistet:

*Lungenkarzinom A 549-1*

*Lungenkarzinom A 549-2*

*Prostatakarzinom 1-1, DU 145-1*

*Prostatakarzinom 1-1, DU 145-2*

*Prostatakarzinom 2-4, DU 145*

*Mammakarzinom MDA- MB 435-1*

*Mammakarzinom MDA- MB 435-2*

*Mammakarzinom MDA- MB 435-3*

*Mammakarzinom MDA- MB 435-4*

*Mammakarzinom MDA- MB 435-5*

*Mammakarzinom MDA- MB 435-6*

### 3.4.1.2 Gefrierschnitte

Die Anfertigung der Gefrierschnitte folgt einem einheitlichen, systematischen, zufälligen Probenziehungsprinzip (siehe Abschnitt 2.4.2.3) [78]. Hierfür wird die Höhe der eingebetteten Tumorproben mit Hilfe eines Lineals ausgemessen, um die Größe des Intervalls zu ermitteln, das den Tumor in elf gleich dicke, parallele Scheiben einteilen würde. Innerhalb des ersten Intervalls wird zufällig ein Punkt gewählt. Dieser stellt die Schnittstelle für den ersten Schnitt dar. Ausgehend von diesem Punkt wird der Tumor in die ermittelten Intervalle eingeteilt und das Ende eines jeden Intervalls stellt die neue Schnittstelle dar. Diese Prozedur wird dreimal für jeden Tumor wiederholt, so dass es insgesamt vier verschiedene Anfangsschnittpunkte innerhalb des ersten Intervalls gibt, die alle verschiedene, aufeinander folgende Schnittstellen mit sich bringen. (Es stehen somit vier Schnittsets pro Tumor für die weitere Bearbeitung zur Verfügung, wovon drei gefärbt werden und eins als Ersatzset dienen soll.) Die Probe wird hierfür in den Kryostaten (HM 560, Microm, Cat: 956060, Deutschland) eingespannt. Die Temperatur der Probe wird auf ca.  $-15^{\circ}\text{C}$  eingestellt, die der Schneideklinge (Microtome blades, Type C35, Feather, Japan) auf ca.  $-18^{\circ}\text{C}$ . Die Schnittdicke beträgt  $7\ \mu\text{m}$ . Mit Hilfe des auf der Anzeige erscheinenden Zählers des Kryostaten können die verschiedenen Schnittstellen leicht ermittelt werden. Bei Anfertigung eines Gewebeschnitts wird von diesem stets ein zusätzlicher Serienschnitt angefertigt. Dieser Serienschnitt soll als Ersatzschnitt dienen und wird mit dem vorigen Schnitt zusammen auf einen beschrifteten Objektträger (Silane-prep slides, Sigma-Aldrich, Cat: S4651-72EA, Deutschland) aufgezogen und bei Raumtemperatur für ca. eine Stunde getrocknet. Jedes einzelne Set eines Tumors besteht durchschnittlich aus elf Objektträgern mit jeweils zwei Schnitten, wobei der zweite Schnitt auf dem Objektträger nur als Ersatzschnitt dienen soll. Falls der erste Schnitt beispielsweise aufgrund von Beschädigungen oder Färbefaktoren nicht auswertbar sein sollte, wird der Ersatzschnitt anstelle des ersten Schnitts zur Auswertung herangezogen. Die Schnitte werden in einer mit Zellstoff ausgelegten und mit Alufolie umwickelten Objektträgerbox (Objektträger-Behälter, VWR International, Cat: 631-9141, Deutschland) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.4.1.3 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten mit Färbeautomat (CD31)

Es werden drei Schnittsets pro Tumor mittels einer direkten immunhistochemischen Methode gefärbt, das vierte Set dient als Ersatzset. (Die verwendeten Substanzen sind detailliert im Anhang in Tabelle 11 aufgeführt.) Die Gefrierschnitte werden in Aceton ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) fixiert (5 min.). Sie werden für wenige Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und das Gewebe wird mit einem Fettstift umkreist. Der immunhistochemische Färbeprozess wird von einem

## **Material und Methoden**

Färbeautomaten übernommen, der nach folgendem Standardprotokoll arbeitet. Die Waschschrte werden nach jedem Inkubationsschritt mittels TBS (tris buffered saline) Pufferlösung vollzogen. Ein spezielles Blockierungsreagenz blockiert zunächst die endogene Peroxidase (15 min.), dann wird das endogene Biotin durch zunächst eine Avidin- dann Biotinlösung geblockt, wobei die Inkubationszeit pro Lösung 20 min. beträgt. Die Antikörper werden stets mit einer speziellen Antikörperlösung verdünnt. Die Gefrierschnitte werden für 50 min. mit einem biotinylierten Ratte-anti-Maus CD31 Primäranitkörper (1:1000, FK) inkubiert. Pro Färbedurchgang sind eine Positiv- und zwei Negativkontrollen mitgeführt worden. Für die erste Negativkontrolle ist anstelle des anti- CD31 Antikörpers die reine Antikörperlösung verwendet worden und für die zweite Negativkontrolle biotinyliertes Immunglobulin IgG2 von der Ratte (1:1000). Für die Positivkontrolle ist Pankreasgewebe von der Nacktmaus verwendet worden. Anschließend folgt eine 30 minütige Inkubation mit Extravidin-Peroxidase Konjugat. Die 3,3 Zoll-Diaminobenzidin (DAB) Lösung wird für drei Minuten auf die Schnitte aufgetragen. Der Oxidationsprozess wird durch ein VE-Wasserbad (5 min.) gestoppt auf das ein Waschgang folgt. Der weitere Färbevorgang wird nicht mehr vom Autostainer durchgeführt, sondern manuell fortgesetzt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgt mit Hämatoxilin (45 Sek.). Zur Entwicklung der Farbreaktion (Bläuung) werden die Schnitte für 10 min. unter fließendem Leitungswasser positioniert und anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) geführt. Abschließend werden sie für mindestens 2 min. in Xylol gestellt. Deckgläschen schließen mit Hilfe von lösemittelhaltigem Eindeckmedium das Gewebe auf den Objektträgern ein.

### **3.4.2 Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner**

#### **a) Bestimmung der MVD nach Weidner anhand drei verschiedener Schnitte eines Tumors**

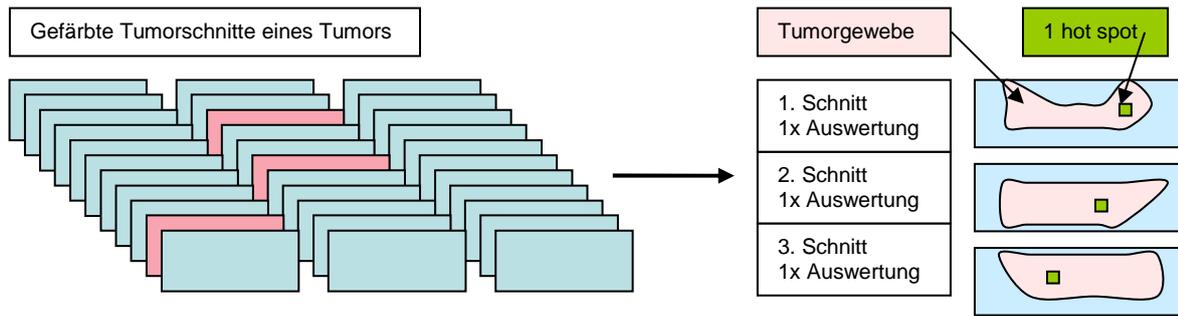
In dieser Untersuchung werden alle elf Tumore ausgewertet, wobei insgesamt drei Schnitte pro Tumor ausgewertet werden. Im folgenden wird die Auswertungsmethode für einen Tumorschnitt erklärt.

Die Auswertung der MVD nach Weidner, die auf der Auszählung eines hot spots basiert, wird anlehnd an dessen Beschreibung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.2.1) [27]. Für die hot spot Auswertung wird zunächst ein technisch hervorragender, qualitativ am besten und für den Tumor repräsentativ erscheinender Schnitt von allen immunhistochemisch bearbeiteten Schnitten des Tumors ausgewählt (Abbildung 20). Der Schnitt wird unter das Mikroskop (Axioskop 40, Zeiss, Cat: 491902-9850-000, Deutschland) gelegt und bei zwei kleinen Vergrößerungen (4x10 und 10x10) meanderförmig durchfahren und betrachtet, um die Stelle heraus zu suchen, die die höchste Durchblutung aufweist – den so genannten hot

spot. Zur Orientierung dient die durch die immunhistochemische Färbung hervorgerufene Braunfärbung der Gefäße. Dieser hot spot wird bei einer Vergrößerung von 20x10 eingestellt. Als Blutgefäß zählt jede angefärbte Endothelzelle und jeder angefärbte Endothelzellhaufen, wenn dieser von anderen Endothelstrukturen deutlich getrennt liegt. Es werden keine Erythrozyten oder Gefäßlumina gezählt. Um eine Über- oder Unterzählung der Blutgefäßanzahl zu vermeiden, werden die gezählten Blutgefäßprofile markiert. Hierfür wird das mikroskopische Bild vom Mikroskop durch eine Kamera (DXC-950P, 3CCD color video camera, Sony, Japan) und einen daran gekoppelten Computer auf einen Computerbildschirm übertragen. Zusätzlich wird das stereologische Computerprogramm (stereoinvestigator, microbrightfield, USA ) für diese Analyse benutzt. Das auf dem Monitor betrachtete mikroskopische Feld wird zunächst manuell mit einer Messlinie durch das Computerprogramm bemessen. Das Gesichtsfeld stellt bei einer Vergrößerung von 20x10 stets eine Gewebefläche von 0,443 mm<sup>2</sup> dar, so dass eine weitere an dieses Feld angrenzende Fläche innerhalb des hotspots ausgewertet werden muss, da nach Weidners Kriterien mindestens eine Gewebefläche von 0,74 mm<sup>2</sup> ausgewertet werden muss (siehe Abschnitt 2.3.2.1). Daher werden insgesamt 0,886 mm<sup>2</sup> innerhalb des hotspots ausgezählt. Jede gezählte Struktur wird mit einem Marker markiert (siehe Abbildung 23 a) und die Summe der gesetzten Marker wird vom Computerprogramm angegeben.

Nach einem Zeitabstand von mehreren Tagen oder Wochen wird ein zweiter gefärbter Schnitt des Tumors nach den oben aufgeführten Kriterien herausgesucht und ausgewertet. Nach einem weiteren Zeitabstand von mehreren Tagen oder Wochen wird ein dritter gefärbter Schnitt des Tumors nach den oben aufgeführten Kriterien herausgesucht und ausgewertet (Abbildung 20). Die Reihenfolge der Auswertung der insgesamt drei Schnitte aller elf Tumore ist zufällig gewesen. Sowohl der zufällige Zeitabstand als auch die zufällige Reihenfolge der Schnitte dienen der Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode, um zu vermeiden, dass der Untersucher von vorigen Ergebnisse des jeweiligen Tumors beeinflusst werden kann. Alle Schnitte werden nach ihrer Auswertung wieder in die Schnittsets zurückgelegt und die vollständigen Sets stehen für die nachfolgende Untersuchung (3.4.2 b) zur Verfügung.

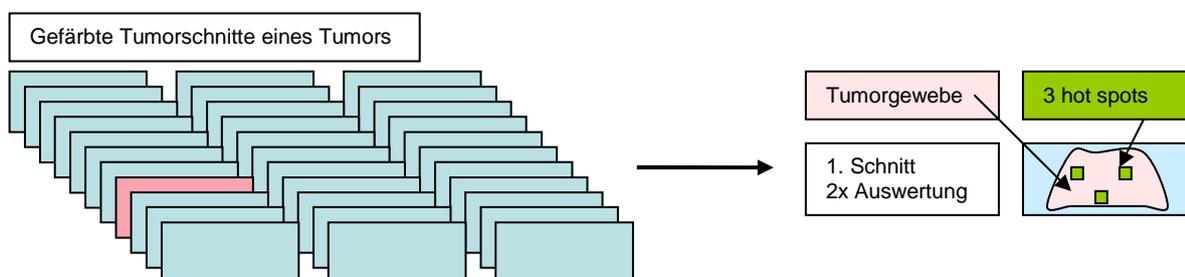
## Material und Methoden



**Abbildung 20:** Die Skizze verdeutlicht die Auswahl der drei Schnitte zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner. Es werden aus allen immunhistochemisch bearbeiteten Schnitten eines Tumors insgesamt drei repräsentativ erscheinende Schnitte (rot) gewählt. Jeder dieser Schnitte wird einmal ausgewertet wobei jeweils ein hot spot (grün) ausgezählt wird.

### b) Wiederholte Bestimmung der MVD eines Tumorschnittes nach den Kriterien von Weidner

Für die weitere Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner werden erneut alle elf Tumore ausgewertet, wobei nur ein Schnitt aus allen immunhistochemisch bearbeiteten Schnitten eines Tumors nach den oben genannten Kriterien (siehe Abschnitt 3.4.2 a) ausgewählt und ausgewertet wird (Abbildung 21). Die Auszählung des Schnittes unterscheidet sich darin, dass pro Schnitt drei hotspots ausgewählt und ausgezählt werden (Abbildung 21), wobei jeder einzelne hot spot so ausgezählt wird wie es oben bereits beschrieben worden ist (siehe Abschnitt 3.4.2 a). Nach mehreren Tagen oder Wochen wird dieser Schnitt mit der gleichen Methode noch einmal ausgewertet. Die Reihenfolge der nochmals auszuwertenden Tumorschnitte ist wieder zufällig, um auszuschließen, dass der Untersucher von vorigen Ergebnissen des jeweiligen Tumors beeinflusst werden kann. Aus den drei hotspots pro Schnitt wird der Mittel- und Maximalwert ermittelt. (Da nicht nur ein hotspot pro Tumorschnitt ausgezählt wird, sondern drei handelt es sich um eine leicht modifizierte Methode nach Weidner, die heutzutage jedoch häufiger angewendet wird. Es wird zur Vereinfachung im folgenden von der Methode nach Weidner gesprochen).



**Abbildung 21:** Die Skizze verdeutlicht die Auswahl des einen Schnittes zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner. Es wird aus allen immunhistochemisch bearbeiteten Schnitten eines Tumors ein repräsentativ erscheinender Schnitt (rot) gewählt. Dieser Schnitt wird zweimal ausgewertet wobei jeweils drei hot spots (grün) ausgezählt werden.

### c) Auswertung

Sowohl für die Auswertung von drei Tumorschnitten (siehe Abschnitt 3.4.2 a) eines Tumors als auch für die Auswertung eines zweimal ausgewerteten Tumorschnitts desselben Tumors (siehe Abschnitt 3.4.2 b) nach den Kriterien nach Weidner werden alle Ergebnisse der Blutgefässdichte für 1 mm<sup>2</sup> Fläche hochgerechnet. Die statistische Auswertung der Reproduzierbarkeit der Weidnerschen Methodik erfolgt mittels Bland Altman Diagramm (siehe Abschnitt 3.6.1).

### 3.4.3 Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der Methode mittels stereologischer Werkzeuge

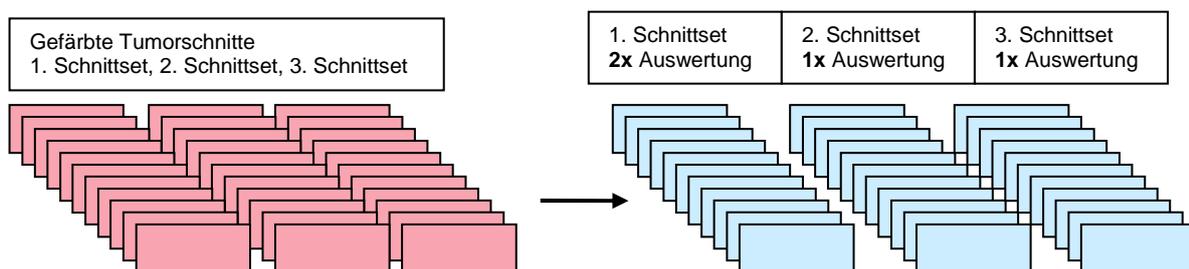
#### Bestimmung der Blutgefäßprofildichte mittels stereologischer Werkzeuge:

##### a) drei verschiedener Schnittsets eines Tumors

##### b) die wiederholte Bestimmung der Blutgefäßprofildichte eines der drei Schnittsets

In dieser Untersuchung wird die Reproduzierbarkeit der Methode mittels stereologischer Werkzeuge anhand der elf Tumore untersucht. Es werden insgesamt a) drei immunhistochemisch bearbeitete Sets eines Tumors ausgewertet wobei b) ein Set davon zweimal ausgewertet wird (Abbildung 22). Zwischen den einzelnen bzw. wiederholten Auswertungen eines Tumorsets liegen mehrere Tage oder Wochen, da die Tumorsets aller elf Tumore in zufälliger Reihenfolge ausgewertet worden sind.

Es ist anzumerken, dass vom Lungentumor A 549-1 und vom Mammatumor MDA-MB 435-1 nur zwei anti-CD31 gefärbte Sets zur Auswertung zur Verfügung standen. Die beiden anderen Sets pro Tumor standen aufgrund technischer und immunhistochemischer Artefakte nicht vollständig zur Verfügung, so dass auf eine stereologische Analyse verzichtet worden ist.



**Abbildung 22:** Die Skizze verdeutlicht die Auswahl der Schnittsets zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode mittels stereologischer Werkzeuge. Es werden alle drei immunhistochemisch bearbeiteten Schnittsets gewählt (rot). Jedes Schnittset wird einmal ausgewertet. Eines der drei Schnittsets wird wiederholt ausgewertet (z.B. das erste Schnittset).

**Stereologisches System:** Die histologischen Tumorschnitte werden mit Hilfe eines stereologischen Systems ausgewertet. Das Mikroskop (Axioskop 40, Zeiss, Deutschland) ist mit einer mechanischen Objektträgerhalterbühne ausgestattet, die mit einem Computer in

## Material und Methoden

Verbindung steht, auf dem wiederum das stereologische Programm stereoinvestigator (stereoinvestigator, microbrightfield, USA) läuft. Eine Kamera (DXC-950P, 3CCD Color Videocamera, Sony, Japan) ist mit dem Mikroskop verbunden und überträgt das mikroskopische Bild auf den Computerbildschirm. Die manuell eingestellte Vergrößerung des Mikroskops muss stets mit der manuell eingegebenen Vergrößerungsangabe im Programm übereinstimmen.

**Stereologische Auswertung:** In dieser Untersuchung sind alle drei Schnittsets der elf Tumore ausgewertet worden, wobei ein Schnittset davon wiederholt ausgewertet worden ist (Abbildung 22). Im folgenden wird die stereologische Auswertung für ein Schnittset erklärt.

Der erste Tumorschnitt eines Sets wird bei einer Vergrößerung von 4 x 10 unter das Mikroskop gelegt und auf dem Bildschirm wiedergegeben. Die auszuwertende Region wird festgelegt indem manuell eine Kontur um das Abbild des Tumorschnittes gezogen wird. Hierfür wird der Befehl „Contour“ im Programm eingegeben und zum Schließen der Kontur „Close Contour“ eingegeben. Anschließend wird der systematische Abstand in z- und y-Richtung zwischen den einzelnen Feldern, die innerhalb des Gewebeschnittes zu analysieren sind, eingegeben, indem der Anzeigeknopf „Probes“ aktiviert wird und der Befehl „Preview SRS Layout“ angewiesen werden kann. Es erscheint ein Fenster, in das die angestrebte Anzahl der Probefelder eingegeben werden kann und das Programm berechnet selbst die benötigten Abstände oder es können direkt die Abstände per Zahl vorgegeben werden. Das Mikroskop und das Programm werden nun auf die Vergrößerung 40x10 eingestellt. Die Zählrahmengröße wird festgelegt indem unter dem Anzeigeknopf „Probes“ die Auswahl „Define counting frame“ ausgewählt wird und in dem erscheinenden Fenster die Breite und Höhe eingegeben werden kann. Die Größe orientiert sich an der durchschnittlichen Anzahl der zu zählenden Ereignisse (Blutgefäßprofile) innerhalb des Rahmens, die bei dieser Auswertung ca. zwischen vier und sechs lagen. Die definierten Abstände zwischen den auszuwertenden Feldern und die Größe des Zählrahmens werden für alle Schnitte des Sets eines Tumors übernommen. Nur für jeden neu zu untersuchenden Tumor werden die Einstellungen wieder geändert und auf die Größe der Gewebefläche abgestimmt. Die Zählung der Blutgefäßprofile wird bei einer Vergrößerung von 40x10 durchgeführt. Die Auswertung wird mit dem Befehl „Fractionator“<sup>1</sup> begonnen. Das Computerprogramm definiert und fährt automatisch durch die mechanische Bühne zu den auszuwertenden Gewebefeldern, auf die es den Zählrahmen projiziert (siehe Abbildung 23 b). Die mikroskopischen Gesichtsfelder sind somit durch das System einheitlich gewählt

---

<sup>1</sup> Aufgrund technischer Einstellungen des Computerprogramms ist der Befehl „Fractionator“ eingegeben worden, obwohl die Fractionator Methode an sich nicht zur Anwendung kommt!

worden, liegen systematisch voneinander entfernt und sind zufällig vom System innerhalb der Tumorkontur platziert worden. Die Auszählung der Blutgefäßprofile folgt einer mit dem Zählrahmen verbundenen strikten Zählregel [68, 86], die bereits unter Abschnitt 2.4.4.1 und 3.2.1.3.4 erklärt worden ist. Die Definition eines Blutgefäßprofiles folgt der nach Weidner [27], die bereits unter Abschnitt 3.4.2 aufgeführt worden ist. Die gezählten, braun gefärbten Profile werden mit einem Marker gekennzeichnet und automatisch vom System zusammengezählt. Das System fährt selbständig zum nächsten Feld, wenn die rechte Maustaste angeklickt wird. Nachdem alle Schnitte eines Tumors ausgewertet worden sind, wird die Blutgefäßprofilanzahl mit der Anzahl der ausgewerteten Zählrahmen, die im System abgerufen werden können, verrechnet, um die Blutgefäßprofildichte pro 1 mm<sup>2</sup> ermitteln zu können. Die gezählte Anzahl an Profilen sollte zwischen 100 und 200 liegen [68].

### c) Auswertung

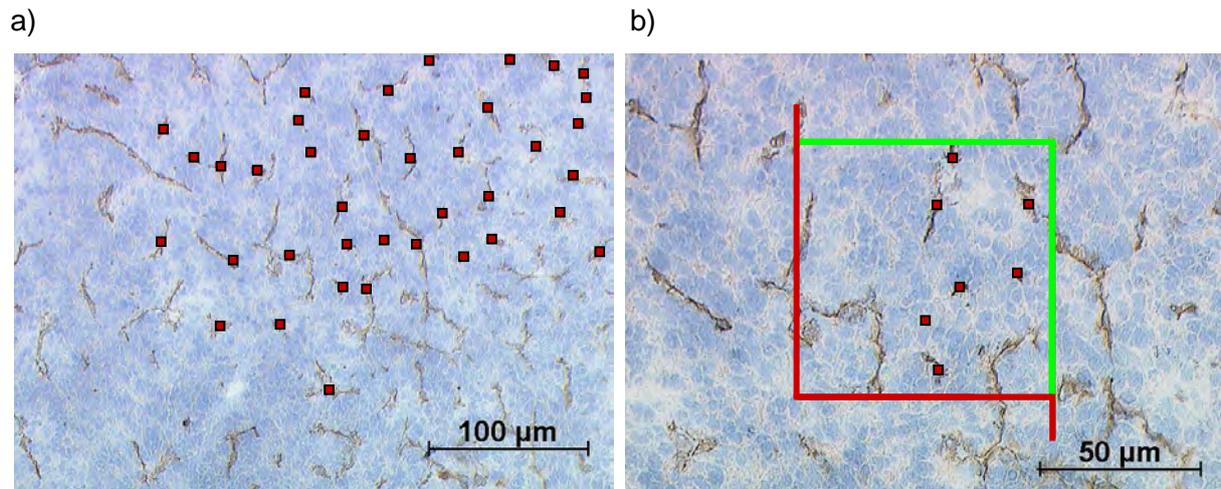
#### Berechnung der Blutgefäßprofildichte:

Die Berechnung der Blutgefäßprofildichte, ein zweidimensionales Resultat, basiert auf stereologischer Schätzung der Anzahl der Profile pro Fläche (siehe Abschnitt 2.4.4.1) [68]. Durchschnittlich elf histologische Tumorschnitte sind pro Tumorprobe ausgewertet worden. Die gezählten Blutgefäßprofile für alle Schnitte pro Tumor werden addiert und stellen die totale Summe  $Q(\text{prof})$  dar. Die Anzahl aller ausgewerteten Zählrahmen  $P(\text{frame})$  wird mit der Fläche des Zählrahmens  $a(\text{frame})$  multipliziert, um die Gesamtfläche zu ermitteln. Die Blutgefäßprofile pro Fläche  $Q_A$  werden nach folgender Formel errechnet:

$$Q_A = \frac{\sum Q(\text{prof})}{\sum P(\text{frame}) \cdot a(\text{frame})}$$

Die Ergebnisse werden anschließend für eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> berechnet, um sie mit den Weidnerschen Ergebnissen vergleichen zu können.

## Material und Methoden



**Abbildung 23:** a) Ein Gesichtsfeld von 0,44 mm<sup>2</sup> eines immunhistochemisch (CD31) gefärbten Mammakarzinoms bei einer 200fachen Vergrößerung wird nach Weidner ausgewertet, indem jedes Blutgefäßprofil (braun) gezählt und markiert (rot) wird. (Auf der Abbildung sind nicht alle Blutgefäße markiert.) b) Auf eines der einheitlich, systematisch, zufällig gewählten Gesichtsfelder des Mammakarzinoms wird bei einer 400fachen Vergrößerung ein Zählrahmen projiziert. Die grünen Linien des Zählrahmens stellen die Einschlusslinien dar, die roten die Ausschlusslinien. Es werden hier sieben Blutgefäßprofile (braun) gezählt und markiert (rot). (Der Zählrahmen (b) und die Marker (a,b) sind nachgezeichnet worden, um diese deutlicher hervorzuheben.)

Die Reproduzierbarkeit der stereologischen Methodik wird statistisch mittels Bland Altman Diagramm überprüft (siehe Abschnitt 3.6.1).

### 3.4.4 Übereinstimmung der Ergebnisse der Auswertung nach Weidner und der Auswertung mittels stereologischer Werkzeuge

Zur Überprüfung der Übereinstimmung der Methode nach Weidner und der mittels stereologischer Werkzeuge werden die *ersten* Ergebnisse der wiederholten Auswertung eines Schnittes nach Weidner (Abbildung 21) und die *ersten* Ergebnisse der wiederholten Auswertung eines Schnittsets mittels stereologischer Werkzeuge (Abbildung 22) herangezogen und mittels Bland Altman Diagramm (siehe Abschnitt 3.6.1) überprüft.

### **3.5 Quantifizierung histomorphologischer Strukturen in experimentellen Tumoren mittels stereologischer Methoden in vitro und deren Korrelation mit der in vivo Tumorsignalintensität nach Gabe von optischen Kontrastmitteln**

In dieser Untersuchung soll die Tumorsignalintensität experimenteller, orthotoper Pankreastumore der Nacktmaus unter Verwendung a) eines unspezifischen und b) eines Tumorgefäß-spezifischen Kontrastmittels mittels optischer Bildgebung in vivo bestimmt werden. Diese ermittelten Kontrastwerte sollen mit histomorphologischen Parametern des Tumors korreliert werden. Für die mikroskopische Quantifizierung der Vaskularisation, des Gesamtvolumens und Volumens sowohl des intakten als auch nekrotischen Gewebeanteils des Tumors werden stereologische Methoden verwendet.

#### **3.5.1 Optische Bildgebung - in vivo Versuch**

##### **3.5.1.1 Tumorzellinokulation**

Die Tumorzellen der humanen, pankreatischen, neuroendokrinen (NET)-Zelllinie BON stammen von vier verschiedenen Klonen (A2#22: BON-Angiopoietin-2 Klon 22, A2#6: BON-Angiopoietin-2 Klon 6, M#23: BON-Mock Klon 23, M#22: BON-Mock Klon 22) ab, die die Gastroenterologische Abteilung der Charite Berlin durch Herrn Dr. A. Scholz zur Verfügung gestellt hat. Die A2#22 und A2#6 Klone besitzen die Eigenschaft einer Transfizierung der Tumorzelllinie mit humanem Angiopoietin-2, die M#22 und M#23 Klone hingegen zeichnen sich durch einen leeren Expressionsvektor (Kontrollen) aus. Die Tumorzellen sind durch die genannte Einrichtung ins Pankreasgewebe von Nacktmäusen inokuliert worden. Dabei wurde nach der modifizierten Methode von Alves et al [14] vorgegangen. Nachdem die Tiere mit einer intraperitoneal injizierten Lösung aus Ketavet (Ketavet 100mg/ml, Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid, Pfizer, Deutschland) in einer Dosierung von 100mg/kg Körpergewicht und Rompun (Rompun 2%, Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid, Bayer Healthcare, Deutschland) in einer Dosierung von 10mg/kg Körpergewicht narkotisiert worden sind, wurde die Bauchdecke medial eröffnet und der Pankreaskopf aufgesucht. In diesen wurden mit Hilfe einer Spritze  $1,0 \times 10^6$  Tumorzellen, die in 10  $\mu$ l PBS verdünnt vorlagen, injiziert. Anschließend wurde die Bauchwand wieder verschlossen. Die Nacktmäuse befinden sich während der Einschlaf- als auch Aufwachphase der Narkose in Tierkäfigen, die in einem mobilen temperierbaren Schrank (Modell 48-VS-IV, Sacanbur A/S, Dänemark) stehen, um insbesondere die Erholungsphase der Versuchstiere zu unterstützen. Tiere bei denen

## Material und Methoden

während der Tumorzellinokulation ein Austritt von Flüssigkeit in die freie Bauchhöhle oder eine nicht adäquate Zunahme des Pankreasvolumens unter Injektion zu beobachten war, wurden intraoperativ durch zervikale Dislokation getötet, um eine peritoneale Aussaat der Tumorzellen zu verhindern. Für die im folgenden beschriebene Studie wurden insgesamt 39 tumortragende Nacktmäuse verwendet und in zwei Gruppen eingeteilt, da zwei unterschiedliche Kontrastmittel in dieser Untersuchung angewendet werden. Es wurde bei der Aufteilung der Mäuse in zwei Gruppen darauf geachtet, dass es zu einer gleichmäßigen Verteilung der Tiere mit Angiopoetin- und mit Leervektor-transfizierten Tumoren kam. Die erste Gruppe bestand aus insgesamt 22 Versuchstieren wovon fünf den A2#6, fünf den A2#22, sechs den M#22 und sechs den M#23 Klon trugen. Die zweite Gruppe beinhaltete insgesamt 17 Mäuse von denen drei den A2#6, fünf den A2#22, vier den M#22 und fünf den M#23 Klon trugen. Auf die unterschiedlichen Klone (A2#6, A2#22, M#22, M#23) wird in dieser Untersuchung nicht näher eingegangen, da diese für die oben genannte Fragestellung nicht relevant sind. Im folgenden wird von Gruppe 1 (n=22) und Gruppe 2 (n=17) gesprochen.

### 3.5.1.2 Tumortragende Tiere

Die weiblichen, durchschnittlich 22g schweren Nacktmäuse stammen von der Züchtungslinie NMRI nu/nu ab und werden während der elfwöchigen Tumorstadiumsphase in, für immundefiziente Mäuse, artgerechten Käfigsystemen in Gruppen gehalten. Es werden maximal fünf Tieren in einem Käfig (Eu Eurostandard Typ III, Cat. 1290 D, Abmessungen: 425 x 266 x 155 mm / 820 cm<sup>2</sup>, Tecniplast, Italien) zusammen gehalten. Jeder Käfig ist mit einer Filterhaube (Filterhaube, Cat. 1290 D - 400 SU, Tecniplast, Italien) ausgestattet, die einen Filtervlies aus 100% Polyester aufweist, der eine 92%ige Rückhalterate von bis zu 8-10 µm kleinen Partikeln aus der Atmosphäre garantiert. Die Käfige sind zusätzlich mit roten Häuschen aus Polycarbonat (Maushaus, Cat. ACRE 010, Abmessungen: 117 x 117 x 64 (+35) mm, Tecniplast, Italien) ausgestattet. Jeder Käfig ist mit Einstreu (Lignocel, Cat. FS14, Rettenmaier & Söhne GmbH und CoKG, Deutschland) ausgestattet. Die Mäusegruppen werden alle zwei Tage in neue Käfige, die mit neuer Einstreu und Häuschen ausgestattet sind, umgesetzt. Alle Käfige sind in einem speziellen Schrank mit durchsichtigen Türen (Scantainer, Cat. C-110, Klasse EU10, Abmessung: 1420 x 640 x 1865 mm, Scanbur BK A/S, Dänemark) untergebracht, der eine kontinuierliche Luftwechselrate garantiert und mit Zu- und Abluftfiltern ausgestattet ist, die 98,5% aller Partikel, die größer als 0,3 µm sind, zurück hält.

In der Zeit der Tumorstadiumsphase wird mindestens zweimal wöchentlich sowohl die Tumorstadiumsgröße palpiert als auch das Körpergewicht erfasst. Der Allgemeinzustand der Tiere

wird täglich überprüft. Frisches Wasser und Futter (ssniff NM, 10 mm, Cat. V1244-0, ssniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland) steht den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Ernährung der Tiere wird zehn Tage vor der bildgebenden Untersuchung (Nahinfrarot Bildgebung), also am 67. Tag nach der Tumorzellinokulation, auf eine manganarme Spezialdiät (ssniff R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) umgestellt, um durch Porphyrine in der Standarddiät hervorgerufene Autofluoreszenzen zu vermeiden.

Elf Wochen nachdem die Tumorzellen inokuliert worden sind und sich daraus Tumore gebildet haben, wird der zweitägige Versuch der Bildgebung durchgeführt. Hierfür wird den Mäusen zunächst Kontrastmittel intravenös appliziert. Danach müssen die Tiere bis zur Bildaufnahme, die 24 Stunden später erfolgt, einzeln in Käfigen gehalten werden, die neben der Einstreu und dem Häuschen zusätzlich mit Zellstoffpapier ausgelegt sind, um die Kontamination der Haut mit Fluoreszenzfarbstoff durch Körperausscheidungen so niedrig wie möglich zu halten.

Das Tierversuchsvorhaben wurde als genehmigungspflichtiger Tierversuch beim Landesamt für Gesundheit und Soziales unter der Anzeigenummer A0136/01 registriert und genehmigt.

### **3.5.2 Kontrastmittel**

In diesem Experiment werden zwei unterschiedliche Kontrastmittel verwendet. Zum einen wird der Fluoreszenzfarbstoff TSC (tetrasulfonated corbocyanine dye), ein unspezifisches sich im Tumor anreicherndes Kontrastmittel eingesetzt. Zum anderen wird das tumorgefäßspezifische Kontrastmittel AP39-TSC, das aus an den Farbstoff TSC gekoppelten spezifischen gegen ED (ExtraDomäne)-B-Fibronektin gerichteten Antikörper besteht, verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff TSC besitzt die Eigenschaft bei einer Laserlichtwellenlänge ca. 740 nm angeregt zu werden und bei ca. 802 nm zu fluoreszieren.

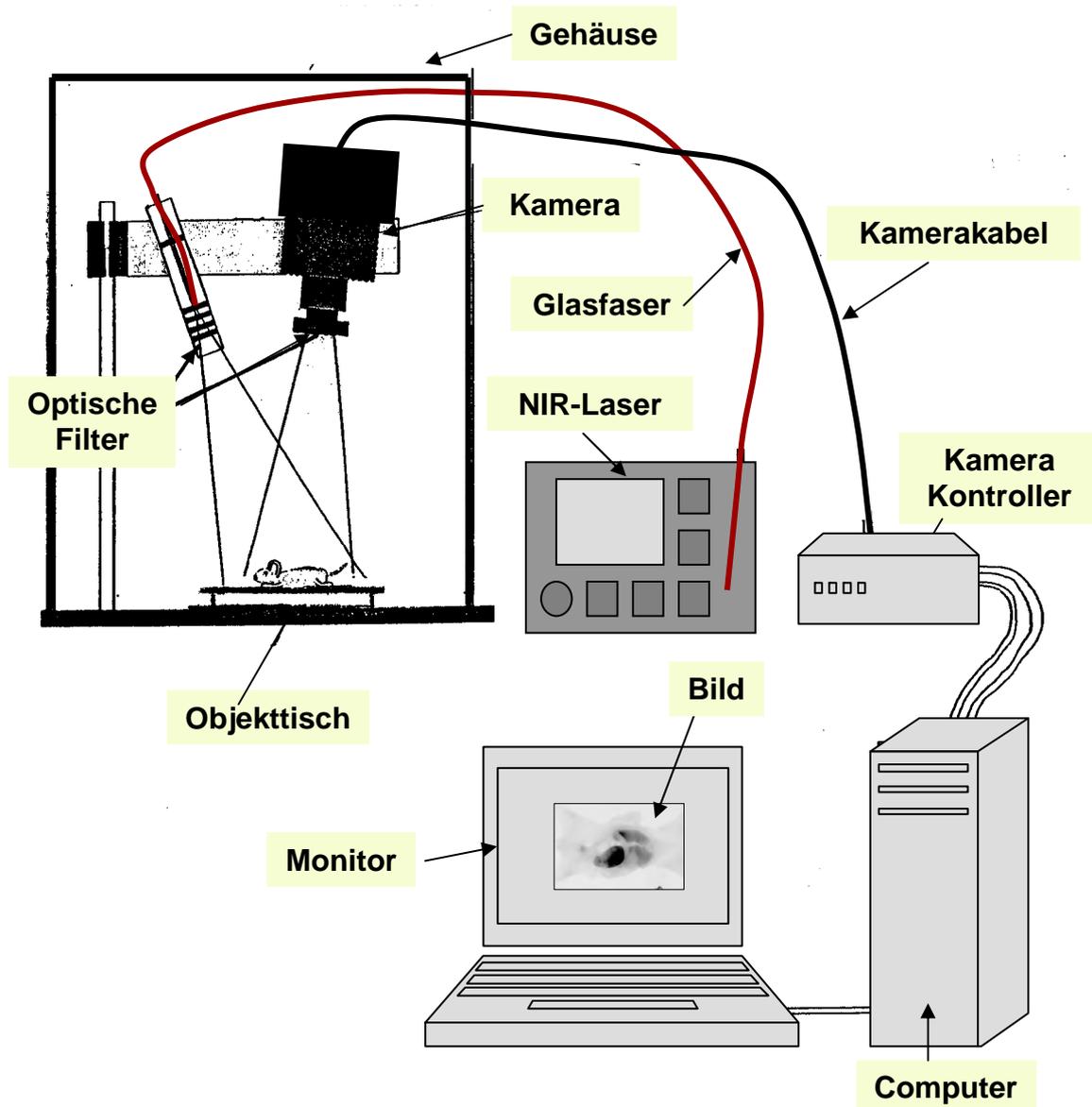
### **3.5.3 Nahinfrarot (NIR)-Fluoreszenz-Bildgebung**

#### **3.5.3.1 NIR-Fluoreszenz-Laser-Imaging Gerät**

Die optische Bildgebung erfolgt durch ein Nahinfrarot (NIR)-Fluoreszenz-Imaging Gerät (engl.: imaging, dt.: Bildgebung), das speziell für die Bayer Schering Pharma AG von der Laser- und Medizin-Technologie GmbH Berlin gebaut worden ist. Das NIR-Laser System ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt. Dieses Gerät besteht aus einem lichtdichten, schwarzen Gehäuse (100 cm x 60 cm x 40 cm), dessen innere Bodenfläche mit einer schwarzen Neopren-Matte ausgestattet ist. Zusätzlich befindet sich ein Objektisch auf dem Boden, der ebenfalls mit einer schwarzen Neopren-Matte ausgelegt ist. Die schwarzen

## Material und Methoden

Neopren-Matten dienen zur Vermeidung von Lichtreflexionen. Das lichtdichte Gehäuse ist zudem mit einem Laser und einer Kamera ausgestattet. Der cw-(engl.: continuous wave, dt.: kontinuierliche Wellen) Diodenlaser (Typ Ceralas, 742nm/1,5 Watt, Seriennummer 0510-G, Ceram Optec GmbH, Deutschland), der einen Nahinfrarot-Laserlichtstrahl mit einer Wellenlänge von 742 nm und einer maximalen Energie von 1,5 Watt produzieren kann, und die Peltier-gegen-Luft gekühlte CCD-Kamera (Typ C4542-95-12ER, Fa. Hamamatsu, Seriennummer 930275, Japan), die mit einem hochauflösenden Objektiv (Typ XNP 1.4/23-0302 CM120, Fa. Schneider, Seriennummer: 27001109-0000-00, Deutschland) ausgestattet ist, sind auf die Lageposition (den Objektisch) gerichtet. Das elektrisch betriebene NIR-Laserlicht wird über eine Glasfaser (Glasfaser, 5m, OZ Optics Ltd, Typ 613-831-0981, Kanada) in das Innere des Gehäuses geleitet. Es trifft, nachdem es zwei optische Bandpassfilter ( $740\pm 2,5$  nm und  $740\pm 2,0$  nm) passiert hat, auf den Organismus und regt den sich im Tumor befindlichen Fluoreszenzfarbstoff an. Die entstehenden Emissionswellenlängen werden durch zwei weitere optische Bandpassfilter ( $802,5\pm 5,0$  nm und  $801\pm 3,0$  nm) selektiert und durch die digitale CCD-Kamera detektiert. Durch ein Kamerakabel, über einen Kamerakontroller wird das schwarz/weiß Bild durch eine Framegrabberkarte (Meteor 2 digital) an den Computer gesendet und durch eine Mess-Software (Simple PCI, Compix) auf dem Bildschirm dargestellt.



**Abbildung 24:** Skizze des NIR-Fluoreszenz-Imaging Gerätes, Quelle: modifiziert nach C. Perltz et al., 2005 [90]

### 3.5.3.2 Versuchsdurchführung

Für die bildgebende Untersuchung werden die Mäuse narkotisiert. Hierfür wird jede Nacktmaus mit einer Lösung aus Ketavet (Ketavet 100mg/ml, Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid, Pfizer, Deutschland) in einer Dosierung von 100mg/kg Körpergewicht und Rompun (Rompun 2%, Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid, Bayer Healthcare, Deutschland) in einer Dosierung von 10mg/kg Körpergewicht narkotisiert. Dann erst wird das Tier in das NIR-Fluoreszenz Imaging Gerät auf den Rücken auf den Objekttisch gelegt.

Nach Einstellung sämtlicher Parameter der Apparatur und korrekter Positionierung des narkotisierten Tieres im Bildausschnitt der Kamera werden zunächst elf Wochen nach der

## **Material und Methoden**

Tumorzellinokulation Fluoreszenzaufnahmen vor Applikation des Farbstoffs gemacht. Diese Leerwertaufnahmen werden standardmäßig bei viersekündiger Belichtungszeit und bei 1,0 Watt angefertigt. Danach erst erfolgt die Kontrastmittelinjektion.

Den Nacktmäusen wird ein, in steril gefiltertem PBS-Puffer (phosphate buffered saline, 001M, pH7,4, Cat: P-3813, Sigma, Deutschland) verdünntes Kontrastmittel in die Schwanzvene appliziert. Das Gesamtvolumen der Injektionslösung wird auf 100 µl pro 10 g des Körpergewichts abgestimmt. Jedem Tier der einen Gruppe (n=17) wird der Fluoreszenzfarbstoff TSC, in einer Dosierung von 0,05 µM/kg Körpergewicht (KG) injiziert. Den Mäusen der anderen Gruppe (n=22) wird das Kontrastmittel AP39-TSC in einer Dosierung von 0,05 µM/kg KG verabreicht.

Die optische Bildgebung erfolgt bei viersekündiger Belichtungszeit und 1,0 Watt 24 Stunden nach intravenöser Kontrastmittelapplikation, da nach dieser Zeit die höchste Substanzakkumulation im tumoralen Gewebe vorliegt. (Die Daten aus den Voruntersuchungen bezüglich der Ermittlung dieser Zeitspanne werden in dieser Arbeit nicht dargestellt.) Die Kontrasteffekte sind aufgrund ihres kinetischen Verhaltens und der Elimination insbesondere in der Leber, Blase, Gebärmutter und den Nieren der Mäuse sichtbar. Aufgrund der lokalen Nähe der Tumorregion zur Leber war eine in vivo Aufnahme, die das Tumorgewebe hinreichend von dem Nachbarorgan abgrenzt, nicht möglich. Daher sind die narkotisierten Tiere durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet worden. Die Bauchdecke wurde eröffnet, so dass die Tumorregion freigelegt und eine in situ Messung des Pankreastumors durchgeführt wurde (siehe Abbildung 33). Zusätzlich sind Fotoaufnahmen des eröffneten Körpers durch eine Digitalkamera (Nikon, Cool Pix 995) angefertigt worden (siehe Abbildung 33).

### **3.5.3.3 Auswertung**

Die Kontrastwerte der einzelnen Tiere werden ermittelt und ermöglichen nicht nur einen Vergleich zwischen den Tieren, sondern auch zwischen den beiden Gruppen.

Die aufgenommenen Fluoreszenzbildsequenzen erlauben eine Diskriminierung des Tumors vom umliegenden Normalgewebe (Kontrollgewebe), so dass ein Kontrastwert aus Ziel- und Referenzregion errechnet werden kann, der beschreibt wie viel höher der Wert der Fluoreszenzintensitäten im Tumor im Vergleich zum Kontrollgewebe ist. Hierfür wird im Bild die interessierende Tumorregion und eine im Leistenbereich liegende Kontrollgeweberegion mittels PCI-Software (Compix Inc., Imaging Systems, Fa. Hamamatsu, Japan) bestimmt,

manuell markiert und abgespeichert. Anschließend wird für beide Bereiche die Fluoreszenzintensität mit Hilfe des NIR-XP Computerprogramms, das speziell von der Abteilung Optical Imaging and New Modalities Research der Bayer Schering Pharma AG Berlin dafür hergestellt worden ist, quantifiziert. Die Berechnung des Kontrastwerts beruht auf der Formel:

$$\text{Kontrastwert} = (\text{Fluoreszenzwert der Tumorregion} / \text{Fluoreszenzwert der Kontrollregion}) - 1$$

### **3.5.4 Mikroskopische Quantifizierung intratumoraler Strukturen mittels stereologischer Methoden - in vitro Versuch**

#### **3.5.4.1 Gewebekonservierung**

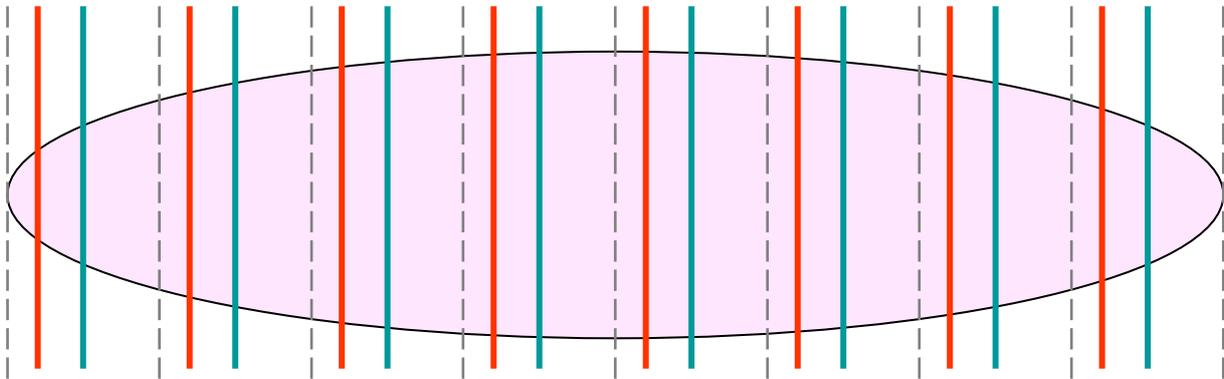
Die Pankreastumore werden den Mäusen unmittelbar nach der Bildgebung entnommen, per Waage (Mettler PM4600, Delta Range, Schweiz) gewogen und durch ein elektronisches Lineal (DigitCal, Tesa, Typ 05.30032, Schweiz) manuell dreiseitig (Höhe, Breite, Tiefe) vermessen. Die Gewebe werden dann einzeln in mit dem Einbettmedium Tissue tek (O.C.T. Compound, Cat: 041831008, Sakura, Niederlande) gefüllten, viereckigen Plastikeinbettformen (Peel-A-Way Embedding Mold, Prod No. 27110, Ted Pella, Inc., Redding, USA) gebettet, so dass das Medium die Tumore vollständig umschließt, und bei -70°C in Isopentan (Isopentan, Fluka, Cat: 59075, Schweiz) tiefgefroren. Die Lagerung erfolgt in einem -80°C Gefrierschrank.

#### **3.5.4.2 Gefrierschnitte**

Die Anfertigung der Gefrierschnitte folgt einem systematisch, einheitlichen Zufallsprinzip (siehe Abschnitt 2.4.2.3) [78]. Die Vorgehensweise bei Gefrierschnitten wurde bereits unter Abschnitt 3.4.1.2 beschrieben. Die eingebetteten Tumorprobenblöcke werden in ca. acht gleich dicke, parallele Scheiben eingeteilt. Innerhalb des ersten Intervalls wird zufällig ein Punkt gewählt. Dieser stellt die Schnittstelle für den ersten Schnitt dar. Ausgehend von diesem Punkt wird der Tumor in die ermittelten Intervalle eingeteilt und das Ende eines jeden Intervalls stellt die neue Schnittstelle dar. Diese Prozedur wird noch einmal für jeden Tumor wiederholt, so dass es insgesamt zwei verschiedene Anfangsschnittpunkte innerhalb des ersten Intervalls gibt, die verschiedene, aufeinander folgende Schnittstellen mit sich bringen. Es entstehen dadurch zwei Schnittsets des Tumors, die der Auswertung dienen sollen (Abbildung 25). Zur Anfertigung von Ersatzschnitten werden nach jedem Schnitt drei (Serien)Schnitte angefertigt. Der erste Serienschnitt wird zusammen mit dem ersten zur Auswertung dienenden Schnitt auf einen Objektträger gezogen. Der zweite und der dritte Serienschnitt liegen unmittelbar hintereinander, jedoch liegt der zweite Serienschnitt 20 µm vom ersten Auswertungsschnitt entfernt. Der zweite und der dritte Serienschnitt werden

## Material und Methoden

zusammen auf einen Objektträger gezogen, so dass sie insgesamt das Ersatzset für das auszuwertende Schnittset bilden. Für die Anfertigung der 5 µm dicken Kryostatschnitte wird ein Kryostat (HM 560, Microm, Cat: 956060, Deutschland) verwendet. Die Temperatur der Probe wird auf ca. -19°C eingestellt, die der Schneideklinge (Microtome blades, Type C35, Feather, Japan) auf ca. -21°C. Das Gewebeschnittpaar wird auf einen beschrifteten Objektträger (Silane-prep slides, Sigma-Aldrich, Cat: S4651-72EA, Deutschland) aufgezogen und bei Raumtemperatur für ca. zwei Stunden getrocknet. Es entstehen also pro Tumor insgesamt vier Schnittsets mit durchschnittlich sieben Objektträgern auf denen sich jeweils zwei Gewebeschnitte befinden (Zwei Schnittsets davon dienen als Ersatzsets). Die Schnitte werden in einer mit Zellstoff ausgelegten und mit Alufolie umwickelten Objektträgerbox (Objektträger-Behälter, VWR International, Cat: 631-9141, Deutschland) bei -80°C gelagert.



**Abbildung 25:** Die Skizze zeigt die SUR Probenziehung der beiden Schnittsets. Der Tumor (rosa) wird in acht Intervalle eingeteilt (graue gestrichelte Linien). Innerhalb des ersten Intervalls werden zufällig zwei Punkte gewählt. Diese stellen die Schnittstellen für den ersten Schnitt des ersten Schnittsets (rot) und den ersten Schnitt des zweiten Schnittsets (blau) dar. Ausgehend von diesen Punkten wird der Tumor in die ermittelten Intervalle eingeteilt und das Ende eines jeden Intervalls stellt die neue Schnittstelle dar.

### 3.5.4.3 Immunhistochemische Färbung ohne Färbeautomat (CD 31)

Es wird ein Schnittset pro Tumor mittels indirekter immunhistochemischer Färbemethode bearbeitet, um anhand dieser Schnitte die Blutgefäße zu quantifizieren. Die Färbung wird manuell nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Die verwendeten Substanzen sind im Anhang in Tabelle 11 aufgeführt.

Die Gefrierschnitte werden in Aceton (+4°C) fixiert (5 min.) Sie werden für wenige Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und das Gewebe wird mit einem Fettstift umkreist. Die Waschschrte erfolgen stets nach jedem Inkubationsschritt und werden mit einer PBS-Pufferlösung vollzogen. Ein spezielles Blockierungsreagenz blockiert zunächst die endogene Peroxidase (15 min.). Anschließend wird das endogene Biotin durch zunächst eine Avidin- dann Biotinlösung geblockt, wobei die Inkubationszeit pro Lösung 20 min. beträgt.

Anschließend werden unspezifische Proteinbindungsstellen durch eine 5%ige Kaninchen-Serum Lösung blockiert (30 min.). Alle Antikörper werden stets mit einer speziellen Antikörperlösung verdünnt. Die Kryostatschnitte werden mit einem monoklonalen Ratte-anti-Maus CD31 Antikörper (1:500) in einer feuchten Kammer zunächst für 60 min. bei Raumtemperatur, dann über Nacht bei +4°C und wieder für 60 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Färbedurchgang sind eine Positiv- und zwei Negativkontrollen mitgeführt worden. Für die erste Negativkontrolle ist anstelle des anti-CD31 Antikörpers die reine Antikörperlösung verwendet worden und für die zweite Negativkontrolle biotinyliertes Immunglobulin IgG2 von der Ratte (IgG2 biotinyliert, BD Pharmingen, Cat: 553928, Deutschland), das 1:1000 in der speziellen Antikörperlösung verdünnt worden ist. Für die Positivkontrolle wurde Pankreasgewebe von der Nacktmaus verwendet. Anschließend erfolgt die Inkubation (60 min., FK) mit dem Sekundärantikörper, einem biotinylierten Kaninchen-anti-Ratte Antikörper (1:1000) Dann werden die Schnitte für 30 min. mit dem in PBS-Puffer 1:300 verdünnten Extravidin-Peroxidase Konjugat bedeckt. Die 3,3 Zoll-Diaminobenzidin (DAB) Lösung wird anschließend aufgetragen. Erst wenn augenscheinlich eine Braunfärbung auf den Tumorschnittgeweben zu erkennen ist (in wenigen Fällen auch mikroskopisch), wird die DAB-Lösung durch ein 5-minütiges VE-Wasserbad mit anschließendem PBS Pufferwaschgang heruntergewaschen. Zur Orientierung dient hierfür auch die Positiv- und Negativkontrolle. Die Inkubationszeit mit DAB wird individuell auf jeden Tumor abgestimmt und liegt zwischen 2,5 min und 8 min. Die Blutgefäße erscheinen bei erfolgreicher Färbung braun. Die Gegenfärbung der Zellkerne wird mit Hämatoxilin durchgeführt (45 Sek). Danach werden die Schnitte für 10 min. unter fließendes Leitungswasser gestellt. Die Schnitte werden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) geführt und abschließend mindestens für 2 min. in Xylol gestellt. Deckgläschen schließen mit Hilfe von lösemittelhaltigem Eindeckmedium das Gewebe auf den Objektträgern ein.

### 3.5.4.4 Hämalaun-Eosin Färbung

Das zweite Auswertungssset eines Tumors wird einer Hämalaun-Eosin (HE) Färbung unterzogen, die einem Standardprotokoll folgt. Anhand der HE gefärbten Schnitte sollen das Tumolvolumen und insbesondere das Volumen der nekrotischen und intakten Tumorgewebeanteile quantifiziert werden. Die verwendeten Substanzen sind im Anhang in Tabelle 11 aufgeführt. Zunächst werden die Schnitte für 30 Sek. in Aceton (+4°C) fixiert, dann für 1,5 min. mit Hämalaunlösung überzogen. Anschließend werden die Schnitte für 10 min. unter fließendem Leitungswasser platziert worauf eine 45-sekündige Inkubation mit Eosinlösung folgt. Diese Lösung besteht aus Eosin Pulver und 60%igem Ethanol, die im Verhältnis 4:1 verdünnt worden ist. Pro 100 ml dieser Lösung wird 0,1 ml Eisessig hinzugefügt. Abschließend werden die histologischen Gewebeschnitte durch eine

## Material und Methoden

aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) geführt und für mindestens 2 min. in Xylol gestellt. Das Eindecken erfolgt wie bei der immunhistochemischen Färbung mit dem Eindeckmedium Eukitt.

### 3.5.5 Stereologische Untersuchung

Es werden stereologisch sowohl die Vaskularisation als auch die Volumina des Gesamttumors und der nekrotischen und vitalen Tumorgewebeanteile quantifiziert. Die Blutgefäßlänge, die nekrotischen und vitalen Tumorgewebevolumina werden mit Hilfe des statistischen Computerprogramms Sigma Plot (Version 8.0) mit den jeweiligen Kontrastwerten der optischen Bildgebung in Korrelation gesetzt.

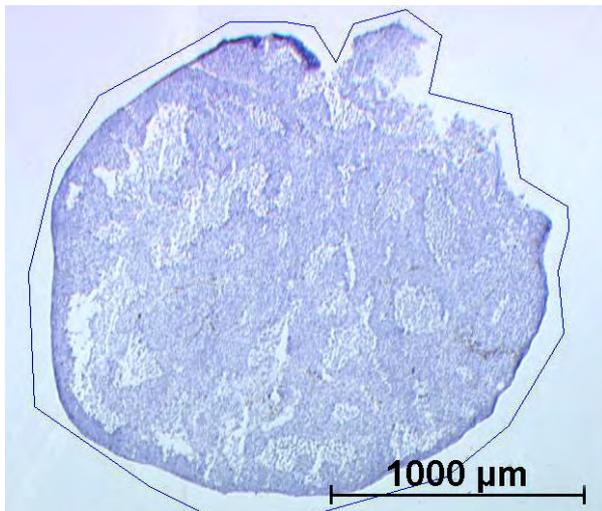
Es wurden 37 von insgesamt 39 Tumoren mikroskopisch ausgewertet. Zwei experimentelle Tumore (Gruppe 1), die mit dem gefäßspezifischen Kontrastmittel (AP39-TSC) behandelt wurden, können aufgrund ihres mangelhaften morphologischen, histologischen Bildes nicht bewertet und daher bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden. Somit werden nur 20 Tumore aus der Gruppe AP39-TSC berücksichtigt.

**Stereologisches System:** Für die folgenden Auswertungen wird das stereologische System verwendet, das bereits unter Abschnitt 3.2.1.3.4 beschrieben worden ist.

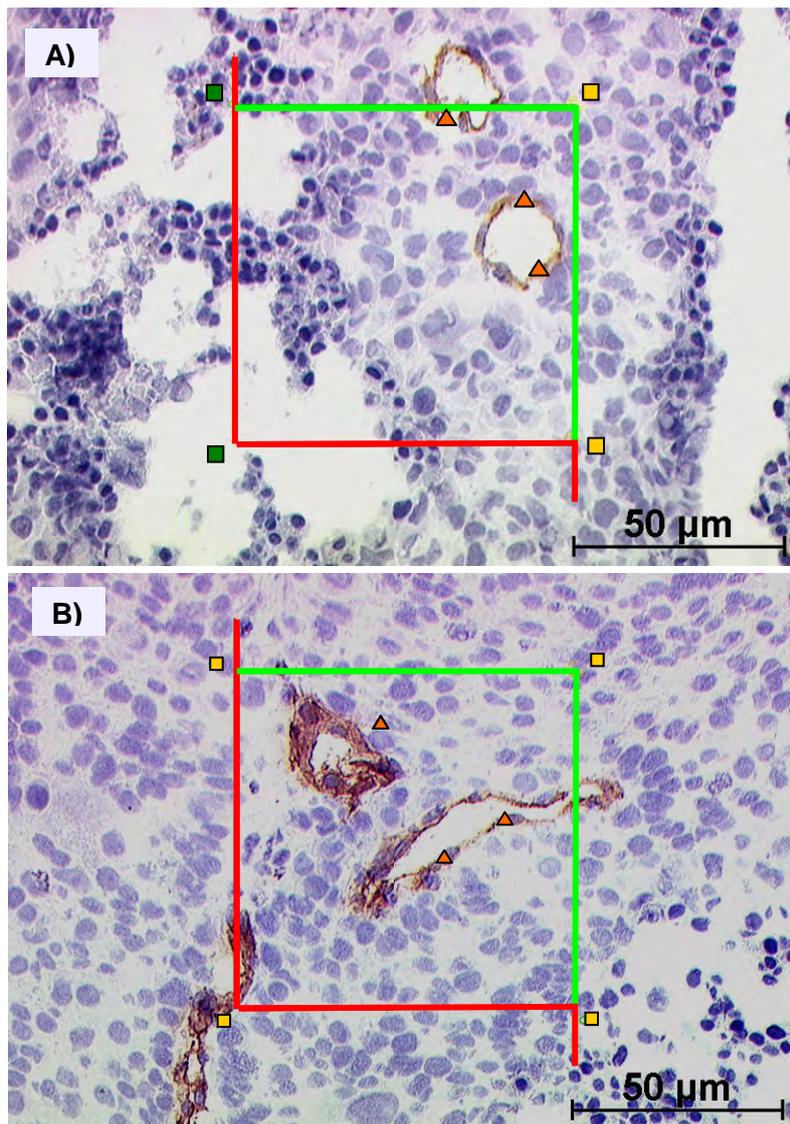
#### 3.5.5.1 Stereologische Bestimmung der Blutgefäßlänge und des Diffusionsradius

Das immunhistochemisch bearbeitete Set eines Tumors wird für die stereologische Auswertung herangezogen. Die Tumorsets werden in zufälliger Reihenfolge und ohne Kenntnis der zugehörigen Kontrastwerte der bildgebenden Analyse und deren Klonabstammung ausgewertet, um die mikroskopische Auswertung unbeeinflusst vornehmen zu können. Auf einem Objektträger befinden sich zwei gefärbte Serienschnitte, von denen nur der erste zur Auswertung herangezogen wird, es sei denn dieser weist Artefakte auf. Dann wird der Ersatzschnitt analysiert. Die stereologische Auswertung beruht auf der Blutgefäßprofilzählung wie sie im Abschnitt 3.2.1.3.4 bereits beschrieben worden ist. Sie wird daher verkürzt dargestellt. Das Abbild der Tumorgeweberregion wird unter Verwendung einer 1,25x/0,4 Linse (Olympus, Japan) (43fache Vergrößerung) durch eine grobe Kontur definiert (siehe Abbildung 26). Die Blutgefäßprofile werden bei einer 688fachen Vergrößerung unter Verwendung einer 20x/0,7 Linse (Olympus, Japan) gezählt. Die Zählrahmengröße von 28482  $\mu\text{m}^2$  ist so gewählt worden, dass mindestens durchschnittlich drei Blutgefäßprofile innerhalb des Rahmens vorzufinden sind. Anschließend wird der systematische Abstand in x- und y-Richtung zwischen den einzelnen, auszuwertenden Gesichtsfeldern eingegeben. Das Computerprogramm fährt durch die mechanische Bühne

automatisch zu den auszuwertenden Feldern, auf die es stets den Zählrahmen projiziert (siehe Abbildung 27). Sollte ein auszuwertendes Gesichtsfeld kein Tumorgewebe zeigen, sondern beispielsweise normales Pankreasgewebe, wird dieser Bereich natürlich nicht ausgezählt. Die Auszählung der Blutgefäßprofile folgt einer mit dem Zählrahmen verbundenen strikten Zählregel (siehe Abschnitt 2.4.4.1 und 3.2.1.3.4) [68, 86]. Die Definition eines Blutgefäßprofils folgt der nach Weidner [27], die bereits im Abschnitt 3.4.2 aufgeführt worden ist. Die gezählten, positiv gefärbten Endothelzellprofile werden mit einem Marker gekennzeichnet. Zusätzlich erfolgt eine Markierung der Ecken des Zählrahmens mit einem zweiten Marker, wenn die Ecke intaktes Tumorgewebe schneidet und mit einem dritten Marker, wenn die Ecke auf nekrotisches Gewebe trifft. Alle drei Marker werden einzeln pro Schnittauswertung vom Programm summiert und abschließend die Gesamtsumme für alle Schnitte eines Sets ermittelt. Dann wird für jeden Tumor die Gesamtblutgefäßlänge und der Diffusionsradius errechnet. Die gesamte Profilanzahl sollte stets zwischen 100 und 200 liegen [68] (die Anzahl der Blutgefäßprofile und der Zählrahmen-Eckmarker bei intaktem Gewebe sind in Tabelle 13 im Anhang aufgeführt).



**Abbildung 26:** Eine Kontur (blau) wird um den histologischen Schnitt gezogen, um die auszuwertende Region zu definieren. (Originalvergrößerung 43x).

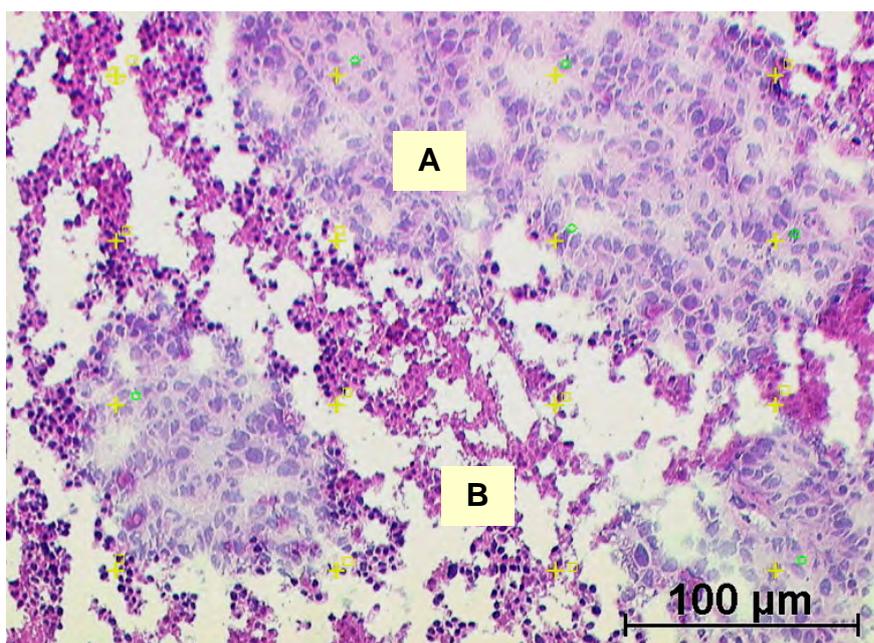


**Abbildung 27:** Es sind zwei zu analysierende Gesichtsfelder (A, B) eines BON-Tumors abgebildet (Originalvergrößerung 688fach; CD31 Färbung) auf die jeweils ein Zählrahmen projiziert worden ist. Alle gezählten Blutgefäßprofile (braun) sind markiert (orangenes Dreieck). Zusätzlich werden die vier Ecken des Zählrahmens markiert, wenn diese vitales Tumorgewebe (gelbes Rechteck) oder nekrotisches (grünes Rechteck) schneiden. (Sowohl der Zählrahmen als auch die Marker sind nachgezeichnet worden, um diese deutlicher hervorzuheben.)

### 3.5.5.2 Stereologische Bestimmung des gesamten, vitalen und nekrotischen Tumorummens

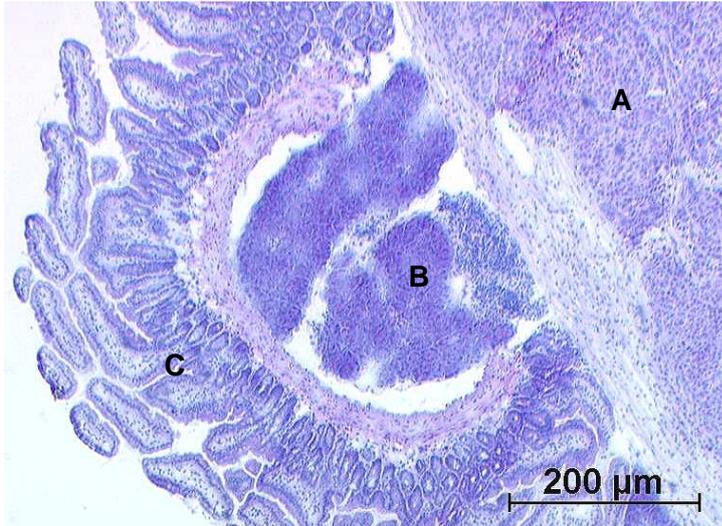
Die Bestimmung des Schätzwertes des gesamten, nekrotischen und vitalen Tumorummens basiert auf dem Cavalieri Prinzip. Hiefür werden die HE-gefärbten Sets der Tumore verwendet, die in zufälliger Reihenfolge und ohne Kenntnis der jeweiligen Kontrastwerte der bildgebenden Analyse und Klonabstammung ausgewählt werden, so dass die stereologischen Resultate nicht beeinflusst werden können. Zunächst wird wieder die auszuwertende Region definiert, indem manuell eine Kontur um das Abbild des Tumorgewebes gezogen wird (Abbildung 26), mit Hilfe des stereologischen Computerprogramms bei einer Vergrößerung von 43fach unter der Verwendung einer 1,25x Linse (Olympus, Japan) des Mikroskops. Für die Auswertung wird eine 4x Linse (Olympus, Japan) für das Mikroskop verwendet, so dass das von dort aus übertragene Bild in einer 137fachen Vergrößerung auf dem Bildschirm vorliegt. Die Bildschirmgröße  $a(screen)$  bzw.

das auszuwertende Abbild des Gesichtsfeldes auf dem Bildschirm beträgt bei jeder Auswertung  $2892531,60 \mu\text{m}^2$ . Es wird unter den stereologischen Zählwerkzeugen das Punktegitter herausgesucht, das aus kleinen Kreuzen besteht und stets auf die Auswertungsfelder projiziert wird (Abbildung 28). Der Abstand zwischen den Kreuzen in x- und y-Richtung kann manuell eingegeben werden, so dass jeder Punkt des Gitters eine konstante Fläche ( $a/p$ ) repräsentiert. Diese Gittereinstellung wird für alle Tumervolumenbestimmungen beibehalten, so dass ( $a/p$ ) in diesem Auswertungsfall stets den Wert  $180783,20 \mu\text{m}^2$  besitzt. Auch bei dieser Auswertung gilt wieder die Faustregel, dass zwischen 100 - 200 Ereignisse insgesamt - bezogen auf alle Schnitte eines Sets - ausgezählt werden sollten [68]. Anschließend folgt die Befehleingabe zum Meanderscan, so dass zunächst die gewünschten Abstände zwischen den auszuwertenden Gesichtsfeldern in x- und y-Richtung eingetragen werden können und dann die Analyse beginnen kann. Es wird ein Marker gesetzt, wenn die rechte obere Ecke des Kreuzpunktes vitales Tumorgewebe beinhaltet, ein anderer Marker, wenn diese Ecke nekrotisches Gewebe beinhaltet (Abbildung 28). Das System fährt automatisch zum nächsten Auswertungsfeld, wenn der entsprechende Befehl eingegeben wird. Sollte ein auszuwertendes Gesichtsfeld kein Tumorgewebe zeigen, sondern beispielsweise normales Pankreasgewebe, wird dieser Bereich natürlich nicht ausgezählt (Abbildung 29). Die Anzahl beider Markierungen wird jeweils für ein komplettes Schnittset summiert. Abschließend werden die Volumina des gesamten Tumors und der nekrotischen und vitalen Bereiche berechnet. Zusätzlich wird der Fehlerkoeffizient (CE) mittels Formel manuell berechnet [68, 69, 78, 85, 97]. (Die Werte für den pro Tier individuell eingestellten Meanderscan, der ausgewerteten Schnittanzahl und der Intervallgröße zwischen den Schnitten kann der Tabelle 12 im Anhang entnommen werden.)



**Abbildung 28:** Auf ein Gesichtsfeld ist ein Punktegitter (gelbe Kreuze) zufällig projiziert worden. Es wird jeweils ein Marker gesetzt, wenn intaktes (A) und nekrotisches (B) Gewebe durch einen Punkt geschnitten wird.

## Material und Methoden



**Abbildung 29:** Durch die Hämalaun Eosin Färbung wird das Tumorgewebe (A) und der Teil des umliegenden Gewebes hervorgehoben. In diesem Fall sind Pankreas (B) und Magen (C) zu sehen.

### 3.5.5.3 Auswertung der Volumina

Anhand der gezählten Marker für nekrotisches und vitales Gewebe kann von diesen eine prozentuale Angabe errechnet werden. Beide Marker summiert ergeben 100%, so dass bei beispielsweise 30 gezählten Markern für vitales Gewebe und bei 70 für nekrotisches zu 30% intaktes Gewebe und zu 70% nekrotisches vorliegt. Das totale Gesamtvolumen des Tumors kann durch folgende Formel ermittelt werden [68, 69, 85].

$$V(tumor) = \frac{dx \cdot dy}{a(screen)} \cdot t \cdot (a/p) \cdot \sum P(tissue)$$

$V(tumor)$ : totales Tumolvolumen

$dx \cdot dy$ : Abstand zwischen den Auswertungsfeldern in x- und y-Richtung

$a(screen)$ : Bildschirmfläche (des mikroskopischen Abbilds)

$t$ : Abstand zwischen den einzelnen Schnitten

$(a/p)$ : die durch einen Gitterpunkt repräsentierte Fläche

$\sum P(tissue)$ : Summe der Marker, die gesetzt wurden, wenn die Gitterpunkte Tumorgewebe geschnitten haben

Das bestimmte prozentuale Resultat des vitalen bzw. nekrotischen Gewebes wird verwendet, um es anhand des totalen Gesamtvolumens zu errechnen, so dass das totale Volumen von intaktem und nekrotischem Gewebe angegeben werden konnte.

#### 3.5.5.3.1 Berechnung des Fehlerkoeffizienten CE der einzelnen Tumorumfängen

Der Fehlerkoeffizient CE (coefficient of error) wird für jedes stereologisch bestimmte Tumorgesamtvolumen und jedes Volumen des vitalen Tumorgewebes einzeln für jeden Tumor berechnet. Die Präzision, angegeben durch den Fehlerkoeffizienten CE (siehe Abschnitt 2.4.3.1), der Volumenschätzung besteht aus zwei verschiedenen voneinander

unabhängigen Faktoren a) dem Noise effect und b) der Varianz der Summe der Flächen [85]. Der Fehlerkoeffizient wurde nach Kriterien von Gundersen et Jensen [78] und Gundersen [78, 85, 97] sowie nach folgender Formel berechnet [78, 85, 97], die im folgenden näher erläutert wird.

**Fehlerkoeffizient CE**

$$CE(V(tumor)) = \frac{\sqrt{totalVar}}{\sum P(tumor)} = \frac{\sqrt{Noise + Var(\sum a)}}{\sum P(tumor)}$$

a) **Noise Effect**

$$Noise = 0,0724 \cdot (b / \sqrt{a}) \cdot \sqrt{n \cdot \sum P(tumor)}$$

Der Quotient  $(b / \sqrt{a})$  steht für die durchschnittliche Profilform bzw. dessen Komplexität, wobei b für die totale Grenzlinie und a für die totale Profilfläche steht. Der Wert kann mit bloßem Auge in dem Nomogramm (siehe Abschnitt 2.4.3.1) nach Gundersen und Jensen abgelesen werden [78]. In diesem Fall ist der Komplexitätswert 14 gewählt worden. Die Anzahl der ausgewerteten Schnitte  $n$  und die Gesamtanzahl der Schnittpunkte zwischen Gitter und Gewebe pro Tumor  $\sum P(tumor)$  fließen ebenfalls in den Noise effect Wert  $Noise$  ein.

b) **Varianz der Summe der Flächen**

$$Var(\sum a) = \frac{3(A - Noise) - 4B + C}{240}$$

Die gezählte Anzahl der Marker ( $P_i$ ) eines histologischen Schnittes aus einem Set eines Tumors wird mit sich selbst multipliziert ( $P_i \cdot P_i$ ). Diese Formel wird für jeden einzelnen Schnitt angewendet. Die Summe aller Einzelergebnisse ergibt dann A und entspricht  $\sum(P_i \cdot P_i)$ . Der B-Wert ergibt sich aus der Summe der Einzelergebnisse, die nach  $\sum(P_i \cdot P_{i+1})$  berechnet worden sind und der C- Wert steht für die Summe der Einzelergebnisse, die mit Hilfe der Formel  $\sum(P_i \cdot P_{i+2})$  ermittelt werden konnten.

**3.5.5.3.2 Berechnung des Fehlerkoeffizienten CE und des Variationskoeffizienten CV für die gesamte Studie**

Die folgenden Berechnungen des Fehlerkoeffizienten CE für die gesamte Studie, des Variationskoeffizienten CV und des gesamten Variationskoeffizienten OCV (observed coefficient of variation) bezieht sich ausschließlich auf die Tumorumfänge des intakten Gewebes aller Tumore.

## Material und Methoden

Der CE Wert für die gesamte Studie errechnet sich nach folgender Formel:

$$CE_{gesamt} = \sqrt{\frac{(CE_1)^2 + (CE_2)^2 + \dots + (CE_n)^2}{n}}$$

Jeder errechnete CE Wert pro Tumor wird quadriert. Diese Einzelergebnisse werden anschließend summiert und durch die Tumorzahl ( $n=37$ ) dividiert. Aus dem Zwischenergebnis wird dann die Wurzel gezogen.

Der Variationskoeffizient  $CV$  (coefficient of variation) wird aus der Standardabweichung  $SD$  der Summe aller Volumina aller Tumore geteilt durch deren Mittelwert ( $mean$ ) errechnet.

$$CV = \frac{SD}{mean}$$

Der quadrierte  $OCV$  (observed coefficient of variation) Wert wird aus der Summe des quadrierten  $CV$  Resultats und des quadrierten  $CE_{gesamt}$  Ergebnisses gebildet.

$$OCV^2 = CV^2 + (CE_{gesamt})^2$$

Anschließend wird der Quotient  $z$  aus  $(CE_{gesamt})^2$  und  $OCV^2$  gebildet und sollte laut Faustregel zwischen 0,2 und 0,5 liegen [85].

$$z = \frac{(CE_{gesamt})^2}{OCV^2}$$

### 3.5.5.4 Auswertung der Blutgefäßlänge

Die Blutgefäßlänge wird laut den Kriterien nach Gundersen [68, 81, 82], Nyengaard [68, 81, 82] und Howard & Reed [68, 81, 82] berechnet. In dieser Arbeit wird die gesamte Länge für die Blutgefäße errechnet, die sich innerhalb des intakten Tumorumfangs befinden. Hierfür errechnet sich die gesamte Blutgefäßlänge  $L$  aus dem Produkt der Blutgefäßlängendichte  $L_v$  und dem Referenzvolumen  $V(ref)$ , das in diesem Fall das Volumen des vitalen Tumorumfangs  $V(tumor)$  darstellt, das bereits mittels Cavalieri Methode ermittelt worden ist (Abschnitt 3.5.5.2 und 3.5.5.3). Die Formeln zur Bestimmung der Blutgefäßlänge werden im folgenden detailliert ausgeführt. [68, 81, 82].

$$L = L_v \cdot V(tumor)$$

Die Berechnung der Längendichte  $L_v$  erfolgt durch die Multiplikation der Zahl 2, einer Konstanten, und des  $Q_A$  Werts, die stereologische Schätzung der Anzahl der Profile pro Fläche [68]. (Die Profildichtenberechnung bezüglich des  $Q_A$  Werts wurde bereits unter Abschnitt 3.4.3 erläutert.)

$$L_v = 2 \cdot Q_A$$

Die Formel stellt sich somit wie folgt dar:

$$L_v = 2 \cdot \frac{\sum Q(\text{prof}) \cdot p}{\sum P(\text{tumor}) \cdot a(\text{frame})}$$

$\sum Q(\text{profile})$ : Summe aller gezählten Blutgefäßprofile aller Schnitte eines Tumorsets

$p$ : Anzahl der ausgewerteten Ecken des Zählrahmens (in diesem Fall sind es vier Ecken, also  $p=4$ )

$\sum P(\text{tumor})$ : Summe aller gezählten Marker, die gesetzt worden sind, wenn die Zählrahmenecken intaktes Tumorgewebe geschnitten haben

$a(\text{frame})$ : Fläche des verwendeten Zählrahmens

Es ist zu beachten, dass bei dieser Dichtenbestimmung für die Ermittlung der Blutgefäßlänge der Zählrahmen an allen vier Ecken markiert worden ist. Jede Markierung steht somit für  $\frac{1}{4}$  der Zählrahmenfläche und fließt in die Formel mit ein.

### 3.5.5.5 Auswertung des Diffusionsradius

Der Diffusionsradius  $r(\text{diff})$  reflektiert den durchschnittlichen Abstand zwischen den einzelnen Gefäßen und wird nach folgender Formel laut Nyengaad berechnet [82]:

$$r(\text{diff}) = \sqrt{\frac{1}{L_v \cdot \pi}}$$

Die Längendichte  $L_v$  bezieht sich auf die unter Abschnitt 3.5.5.4 ausgeführte Berechnung, so dass sich der Diffusionsradius nur auf Gefäße konzentriert, die innerhalb des intakten Tumorgewebes liegen.

### 3.5.5.6 Korrelation der Kontrastwerte und der stereologischen Resultate

Die Kontrastwerte der Gruppe 1 und 2 werden zunächst miteinander verglichen. Anschließend werden die stereologischen Parameter zwischen den beiden Gruppen verglichen. Dann werden die Kontrastwerte der Gruppe 1 und der Gruppe 2 mit der stereologisch ermittelten Blutgefäßlänge, des Volumens der nekrotischen und intakten Tumorgewebeanteile korreliert. Hierfür wird das Computerprogramm Sigma Stat 3.0 und Sigma Plot 8.0 verwendet.

## 3.6 Statistik

### 3.6.1 Bland-Altman Diagramm

Das Bland-Altman Diagramm wird im Rahmen dieser Doktorarbeit häufig angewendet und wird daher detailliert beschrieben. Das Bland-Altman Diagramm ist ein Punktdiagramm und

## Material und Methoden

stellt den Vergleich zweier Messmethoden hinsichtlich ihrer Übereinstimmung dar. In dieser Arbeit wird angenommen, dass zwei unterschiedliche Messmethoden dasselbe messen. Um deren Übereinstimmung zu überprüfen, wird das Bland-Altman Diagramm angewendet. Hierbei werden die Differenzen der beiden Messmethoden gegen den Mittelwert beider Methoden aufgetragen. Da der wahre Wert unbekannt ist, stellt der Mittelwert beider Methoden die beste Schätzung dar. Die Standardabweichung der Differenzen ( $s_{diff}$ ) wird nach folgender Formel berechnet, wobei  $d_1, d_2 \dots d_n$  die jeweilige Differenz beider Messwerte angibt,  $d$  den Mittelwert der gesamten Differenzwerte und  $n$  die Anzahl der Messungen.

$$s_{diff} = \sqrt{\frac{(d_1 - d)^2 + (d_2 - d)^2 \dots + (d_n - d)^2}{n - 1}}$$

Wenn die Differenzen  $d$  einer Normalverteilung unterliegen, würden 95% der Differenzen zwischen  $d - 1,96s$  und  $d + 1,96s$  liegen. Diese Grenzen der Übereinstimmung („limits of agreement“ lt. Bland und Altman) schließen somit einen bestimmten Bereich ein, der im folgenden Schwankungsbereich genannt wird.

Wenn z. B. die steigenden mittleren Werte jedoch eine höhere Variabilität aufweisen, gilt die Annahme der gleichen Variabilität nicht mehr. In diesem Fall bietet sich die Darstellung der Originalwerte in dem Diagramm nicht an. Eine gängige Möglichkeit die Werte trotzdem darzustellen liegt darin die Originalwerte zu logarithmieren. Die Reproduzierbarkeit einer Methode kann durch das Bland-Altman Diagramm ebenfalls dargestellt werden. Im Idealfall müsste die Differenz beider Messwerte stets Null ergeben [98]. Die Bland-Altman Diagramme werden in dieser Arbeit mittels Computerprogramm Excel 2003 erstellt.

### 3.6.2 Boxplot

Der Boxplot stellt ein Diagramm dar, das die Daten graphisch zusammenfasst indem die statistischen Werte repräsentiert werden. In dieser Doktorarbeit wurden Boxplots verwendet, die mittels Computerprogramm SigmaPlot 8.0 erstellt worden sind und daher im folgenden beschrieben werden. Der Bereich, in dem die mittleren 50% der Beobachtungen liegen, wird durch eine Box hervorgehoben. Diese Box wird durch das sogenannte dritte und erste Quartil (bzw. das 25ste und 75ste Perzentil) begrenzt. Eine Linie innerhalb der Box markiert den Median. Bei einer schiefen Verteilung sind im Gegensatz zur symmetrischen Verteilung die Abstände des ersten und des dritten Quartils vom Median verschieden [99]. Die Enden der Fehlerbalken (engl.: error bars), die sich über- und unterhalb der Box befinden, geben das 90ste und 10te Perzentil an. Die Punkte, die außerhalb dieses Bereichs liegen, werden als „Ausreißer“ (engl.: outlier) bezeichnet [3, 99]. In dieser Arbeit wurden die Boxplots stets mit einem vertikalen Streudiagramm (engl.: scatter plot) kombiniert, so dass die einzelnen

Werte zusätzlich dargestellt werden konnten. Die Streudiagramme wurden ebenfalls mittels Computerprogramm SigmaPlot 8.0 erstellt .

### 3.6.3 t-Test

Im Zusammenhang mit den Daten, die in den Boxplots aufgetragen worden sind, wurde der sogenannte t-Test angewendet. Dieser Test diente in dieser Arbeit dazu den Unterschied zwischen zwei Gruppen von Daten zu ermitteln. Zur Berechnung wurde das Computerprogramm SigmaPlot 8.0 verwendet. Der t-Test untersucht, ob sich die Mittelwerte zweier Daten-Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Hierbei wird die Hypothese getestet, die besagt, dass die Mittelwerte beider Daten-Gruppen gleich sind [5]. In dieser Arbeit wird für das Signifikanzniveau  $\alpha$  der Wert 0,05 festgelegt. Dies bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht, wenn  $p \leq 0,05$  gilt.

### 3.6.4 Multiple lineare Regression

Die multiple lineare Regression wird in dieser Arbeit für die Korrelation zwischen den Kontrastwerten der optischen Bildgebung und den stereologischen Parametern verwendet. Sowohl die graphischen Darstellungen als auch die statistischen Auswertungen bezüglich der multiplen linearen Regression wurden mit den Computerprogrammen SigmaStat 3.0 und SigmaPlot 8.0 erstellt. Bei der multiplen linearen Regression ist ein Set unabhängiger, variabler Werte (x-Werte) bekannt. In diesem Fall sind es die stereologischen Daten. Für die möglichen Werte der abhängigen Variablen (y-Werte) wird eine Gaußsche Normalverteilung und eine konstante Varianz über die Regressionsebene angenommen. In dieser Arbeit stellen die Kontrastwerte der optischen Bildgebung die abhängigen Variablen dar. In dieser Arbeit wurden im Zusammenhang mit der graphischen Darstellung der multiplen linearen Regression die statistischen Parameter a) Korrelationskoeffizient ( $r$ ) und b) p-Wert ( $p$ ) angegeben und werden daher kurz erläutert. Der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) gibt an wie gut das Regressionsmodell die Daten beschreibt und reicht von -1 bis 1. Wenn der Wert  $r$ , der Zahl 0 entspricht, dann erlauben die Werte der unabhängigen Variablen keine Voraussage über die abhängige Variable. Beträgt der  $r$ -Wert 1 (bzw. -1), dann können die abhängigen Variablen von den unabhängigen Variablen perfekt vorhergesagt werden. Der  $p$ -Wert gibt die Wahrscheinlichkeit der Assoziation zwischen den Variablen an. In dieser Arbeit wird für das Signifikanzniveau  $\alpha$  der Wert 0,05 festgelegt. Dies bedeutet, dass eine Assoziation zwischen den Variablen besteht und die unabhängigen Variablen die abhängigen Variablen vorhersagen können, wenn  $p \leq 0,05$  gilt [2]. Im folgenden wird von „signifikanten Werten“ gesprochen, wenn  $p \leq 0,05$  ist.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Bestimmung der Isotropie und Anisotropie von Strukturen innerhalb eines Objektes

#### 4.1.1 Plastikblock- und Nudel-Agar-Modelle

Die Ergebnisse der Profildichten je x-, y- und z- Richtung der drei experimentellen Modelle sind in Tabelle 2 aufgeführt. Zwei Profildichten (x-, y- Richtung) des anisotropen homogenen Plastikblock Models weisen Resultate nahe null auf ( $0,087/\text{cm}^2$  und  $0,117/\text{cm}^2$ ) im Gegensatz zu der dritten Profildichte (z-Richtung), die mit einem Wert von  $4,630/\text{cm}^2$  vierzig bzw. 53 mal größer als die anderen beiden Profildichten ist. Zwei Schneiderichtungen weisen also eine geringe Profildichte auf, eine dritte hingegen eine erheblich höhere. Ein ähnliches Resultat liefert das anisotrope heterogene Nudel-Agar-Model. Zwei Ergebnisse (y- und z- Richtung) der drei Profildichten liefern Werte nahe des Zahlenwertes null ( $0,04/\text{cm}^2$  und  $0,09/\text{cm}^2$ ), die dritte Schnittrichtung (x-Richtung) hingegen einen elf bzw. fünfmal so hohen Wert ( $0,42/\text{cm}^2$ ). Im Gegensatz zu den anisotropen Modellen liefert das isotrope heterogene Nudel-Agar-Model drei Werte für die drei Richtungen, die enger zusammen liegen. Die höchste ermittelte Profildichte (x-Richtung:  $1,00/\text{cm}^2$ ) ist im Gegensatz zu den zwei anderen (y-Richtung:  $0,50/\text{cm}^2$  ; z-Richtung:  $0,82/\text{cm}^2$ ) nur 1,2- bzw. 2-fach höher.

#### 4.1.2 Tumorgefäße

Die Blutgefäßprofile pro  $1 \text{ mm}^2$  für die x-, y- und z-Richtungen der drei untersuchten Lungenkarzinome sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Division des jeweils höchsten (Tumornr. 1: 119 Blutgefäßprofile/ $\text{mm}^2$ , Tumornr. 2: 70 Blutgefäßprofile/ $\text{mm}^2$ , Tumornr. 3: 75 Blutgefäßprofile/ $\text{mm}^2$ ) und niedrigsten (Tumornr. 1: 93 Blutgefäßprofile/ $\text{mm}^2$ , Tumornr. 2: 49 Blutgefäßprofile/ $\text{mm}^2$ , Tumornr. 3: 51 Blutgefäßprofile/ $\text{mm}^2$ ) Resultats pro Tumor liefert für den ersten Tumor einen Wert von 1,3, für den zweiten 1,3 und für den dritten 1,5. Diese Zahlenwerte deuten auf den geringen Unterschied zwischen den Werten hin und weisen auf die Isotropie der Tumorblutgefäße hin. (Diese eng beieinander liegenden Ergebnisse sind mit den Ergebnissen des isotropen heterogenen Nudel-Agar Models vergleichbar.)

Profile pro Fläche (cm <sup>2</sup> )	Anisotropes		Isotropes
	Plastikblock Model	Nudel-Agar Model	Nudel-Agar Model
x-Richtung	0,087	0,42	1,00
y-Richtung	0,117	0,04	0,50
z-Richtung	4,630	0,09	0,82

**Tabelle 2:** Die Resultate der Profildichten je x-, y- und z-Richtung der drei experimentellen Modelle sind aufgeführt. Die anisotropen Modelle (Plastikblock Model und Nudel-Agar Model) weisen in zwei Schneiderichtungen eine geringe Profildichte auf und in die dritte Schneiderichtung eine höhere Profildichte. Die Ergebnisse der drei Schneiderichtungen des isotropen Nudel-Agar Models dagegen liegen eng zusammen.

Blutgefäßprofile pro Fläche (mm <sup>2</sup> )	Lungenkarzinom		
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3
x- Richtung	96	49	51
y-Richtung	119	70	75
z-Richtung	93	68	61

**Tabelle 3:** Die Resultate der Blutgefäßprofildichten je x-, y- und z-Richtung der drei Lungentumore (Nr.1, Nr.2, Nr. 3) sind aufgeführt. Die Ergebnisse der drei Schneiderichtungen liegen bei jedem Tumor eng zusammen und weisen auf die Isotropie der tumoralen Blutgefäße hin.

## 4.2 Einfluss systematischer Fehler nicht stereologischen Ursprungs: Einfluss der histologischen Bearbeitung auf die Schrumpfung des Schnittes

### 4.2.1 Kalibrierung des Kryostats mittels einer Messuhr

In Tabelle 4 sind die Resultate der errechneten und mittels geeichter Messuhr gemessenen Strecke ( $\mu\text{m}$ ) aufgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die errechnete Strecke ( $\mu\text{m}$ ), die der Vorschub des Kryostats nach einer bestimmten Schnittanzahl erreicht haben sollte, nicht den mittels Messuhr erhobenen Streckenwerten (gemessene Strecke,  $\mu\text{m}$ ) entspricht. Die Differenz beider Streckenwerte zeigt, dass die errechneten Streckenwerte stets über den gemessenen Werten liegen. Durch den geometrischen Mittelwert kann daher eine mittlere Verkürzung um 0,57% ermittelt werden, wobei die höchste Verkürzung nach 100 Schnitten um 1,4% zu beobachten war. Die Messungen nach 200, 300, 400 und 500 Schnitten hingegen wiesen alle Abweichungswerte unter 0,5% auf. Der errechnete Wert liegt stets gering gradig über dem mittels Messuhr gemessenen Ergebnis. Diese Untersuchung ist einmal durchgeführt worden ( $n=1$ ). Der Gerätefehler liegt somit durchschnittlich deutlich unter 1%.

## Ergebnisse

<b>Schnitt (Nr.)</b>	<b>errechnete Strecke</b>	<b>gemessene Strecke (µm)</b>	<b>Differenz (µm)</b>	<b>Verkürzung (%)</b>
100	500	493	7	1,40
200	1000	997	3	0,30
300	1500	1496	4	0,27
400	2000	1992	8	0,40
500	2500	2488	12	0,48
<b>geometrischer Mittelwert</b>				<b>0,57</b>

**Tabelle 4:** Die Tabelle gibt die Differenz und prozentuale Verkürzung zwischen der errechneten und gemessenen Strecke des Vorschubs des Kryostats an. Der geometrische Mittelwert gibt die mittlere Verkürzung um 0,57% an.

### 4.2.2 Bemessung der Fläche des Tumorschnittes vor und nach dem Schneide- und Färbeprozess

#### 4.2.2.1 Stereologische Ausmessung der Schnittfläche mittels Zählgitter

Aus der Summe der Anzahl der Gitterpunkte, unter Berücksichtigung der Maßstäbe der Abbildungen (siehe Anhang, Tabelle 14), und der Zählgittergröße werden die fünf Schnittflächen berechnet. Die Einzelergebnisse und daraus berechneten Schrumpfungsfaktoren (%) sind in Tabelle 5 aufgeführt. Es kann für die mittlere Schrumpfung zwischen der Fläche des im Kryostaten eingespannten Probenblocks und des daraus produzierten Nativschnitts der fünf Resultate ein Wert um 7,32% ermittelt werden. Eine mittlere Schrumpfung um 2,33% konnte zwischen der Fläche des Schnitts im getrockneten, nativen und im gefärbten Zustand ermittelt werden. Somit liegt diese Schrumpfung durchschnittlich niedriger als die davor ermittelte.

<b>Tumor Schnittnr.</b>	<b>A (mm<sup>2</sup>)</b>			<b>Schrumpfung der einzelnen Fläche um</b>		<b>Mittlere Schrumpfung der Fläche um (%)</b>	
	<b>B</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>von B zu N</b>	<b>von N zu S</b>	<b>von B zu N</b>	<b>von N zu S</b>
1	47,22	42,67	42,28	9,65	0,90	7,32 (n=5)	2,33 (n=5)
2	47,11	41,67	41,27	11,56	0,94		
3	47,56	44,29	44,98	6,87	-1,56		
4	45,67	44,81	42,87	1,89	4,34		
5	47,56	44,53	41,49	6,36	6,83		

**Tabelle 5:** Die Tabelle zeigt die mittels Zählgitter ausgewerteten Flächenwerte (A) der Abbildungen des Gewebeblocks (B), des Nativschnitts (N) und des gefärbten Schnitts (S) und die daraus resultierenden Schrumpfungen der einzelnen Flächen (%) und der mittleren Schrumpfung aller fünf (n=5) Flächen (%), von dem Gewebeblock zum Nativschnitt (von B zu N) und vom Nativschnitt zum gefärbten Schnitt (von N zu S).

### 4.3 Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge und deren Übereinstimmung

In den folgenden Tabellen sind stets die Tumornummern angegeben, die für folgende Tumortypen bzw. Tumorzelllinien stehen:

1: Lungenkarzinom A 549-1	7: Mammakarzinom MDA- MB 435-2
2: Lungenkarzinom A 549-2	8: Mammakarzinom MDA- MB 435-3
3: Prostatakarzinom 1-1, DU 145-1	9: Mammakarzinom MDA- MB 435-4
4: Prostatakarzinom 1-1, DU 145-2	10: Mammakarzinom MDA- MB 435-5
5: Prostatakarzinom 2-4, DU 145	11: Mammakarzinom MDA- MB 435-6
6: Mammakarzinom MDA- MB 435-1	

#### 4.3.1 Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge anhand wiederholter Auswertung derselben Tumorschnitte

##### 4.3.1.1 Ergebnisse der wiederholten Auswertung eines Tumorschnittes nach den Kriterien von Weidner

Der Schnitt eines Tumors ist zweimal nach der modifizierten Methode nach Weidner ausgewertet worden, indem stets drei hotspots ausgezählt worden sind. Ein hotspot wurde innerhalb einer Gesamtfläche von 0,89 mm<sup>2</sup> analysiert. Aus diesen drei Ergebnissen wurde der Mittelwert, der im folgenden W3mean genannt wird, und der Maximalwert, der im folgenden W3max genannt wird, ermittelt. Diese Endresultate wurden für die microvessel density pro 1 mm<sup>2</sup> umgerechnet (Tabelle 6). Bei Betrachtung der Einzelergebnisse konnte festgestellt werden, dass der erste ausgewählte hotspot nicht immer die höchste Blutgefäßprofilanzahl aufwies, obwohl diese Region subjektiv als die am besten durchblutete Region erschien. Sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Schnittauswertung wiesen in sechs von elf Fällen der zweite oder sogar erst der dritte hotspot die meisten Blutgefäßprofile auf (Tabelle 6).

Die Mittelwerte und die Differenzen aus den beiden Endergebnissen der W3mean und der W3max Resultate der wiederholten Auszählung pro Tumor wurden ermittelt, um die Reproduzierbarkeit zwischen den Ergebnissen mittels Bland Altman Diagramm (siehe Abschnitt 3.6.1) zu untersuchen (Werte siehe Tabelle 15 im Anhang). Anhand der Graphen

## Ergebnisse

(Abbildung 30 a, c) ist festzustellen, dass je höher die Endergebnisse waren, desto mehr weichen die Werte der zweifachen Auswertung voneinander ab. Die Werte (W3mean und W3max) werden daher logarithmiert und im Bland Altman Diagramm (Abbildung 30 b, d) dargestellt. Der Mittelwert der Differenzen der W3mean Resultate ergibt -0,051, die Standardabweichung  $\pm 0,080$ . Der Schwankungsbereich der logarithmierten W3mean Werte liegt somit bei  $-0,051 \pm 0,157$ . Der Mittelwert der Differenzen der W3max Ergebnisse lautet -0,024, die Standardabweichung  $\pm 0,081$ . Der Schwankungsbereich der logarithmierten W3max Werte liegt folglich bei  $\pm 0,160$ . Die gemittelten Differenzen müssten bei perfekter Reproduzierbarkeit 0 betragen, da die gleiche Methode benutzt worden ist. Bei der erstgenannten W3mean Methode weicht der Wert mehr von 0 ab als bei der zweiten W3max Methode.

Tumor Nr.	Erste Auswertung nach Weidner					Zweite Auswertung nach Weidner				
	hotspot 0,89 mm <sup>2</sup>			Endresultat 1 mm <sup>2</sup>		hotspot 0,89 mm <sup>2</sup>			Endresultat 1 mm <sup>2</sup>	
	1	2	3	W3mean	W3max	1	2	3	W3mean	W3max
1	47	49	59	58,3	66,6	63	78	65	77,5	88,0
2	82	82	39	76,4	92,5	78	62	79	82,4	89,2
3	150	167	122	165,2	188,5	157	197	207	211,1	233,6
4	97	41	37	65,8	109,5	94	35	75	76,7	106,1
5	102	116	109	123,0	130,9	142	126	135	151,6	160,3
6	245	258	215	270,1	291,2	330	272	334	352,1	377,0
7	370	362	478	455,2	539,5	354	244	325	347,2	399,5
8	278	244	205	273,5	313,8	274	291	208	290,8	328,4
9	268	483	299	395,0	545,1	366	415	375	434,9	468,4
10	818	532	531	707,7	923,2	778	439	415	614,0	878,1
11	255	353	439	393,9	495,5	529	479	437	543,6	597,1

**Tabelle 6:** Innerhalb eines Schnittes eines Tumors wurden drei hotspots jeweils innerhalb einer 0,89 mm<sup>2</sup> Fläche nach den Prinzipien von Weidner (leicht modifiziert) ausgezählt. Diese Auszählung wurde wiederholt. Sowohl die Einzelergebnisse für beide Auswertungen als auch die daraus resultierenden Mittel- (W3mean) und Maximalwerte (W3max) sind aufgeführt. Die Endresultate sind für Blutgefässanschnitte pro 1 mm<sup>2</sup> berechnet worden. Die grau unterlegten Tabellenabschnitte weisen auf den Maximalwert der drei ausgezählten hotspots (0,89 mm<sup>2</sup>) hin. Es wird deutlich, dass nicht immer der zuerst ausgezählte hotspot die höchste microvessel density (MVD) aufweist.

### 4.3.1.2 Ergebnisse der wiederholten Auswertung eines Schnittsets mittels stereologischer Werkzeuge

Die Endergebnisse der zweifachen Auswertung der Blutgefässprofildichte pro 1 mm<sup>2</sup> des Sets eines Tumors mittels stereologischer Werkzeuge sind in Tabelle 7 aufgeführt. Im folgenden wird vereinfacht von stereologischen Werten gesprochen. Die Reproduzierbarkeit der Methode wird durch das Bland-Altman Diagramm (siehe Abschnitt 3.6.1) untersucht

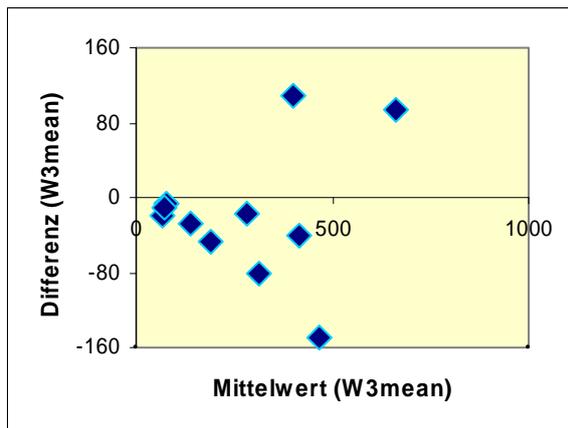
(Abbildung 30 e). (Die dafür errechneten Differenzen und Mittelwerte aus der ersten und zweiten Auswertung sind in Tabelle 16 im Anhang aufgeführt). Es ist bei den stereologischen Werten zu erkennen, dass je höher die Ergebnisse der Blutgefässdichte sind, umso höher variieren die Ergebnisse der zweifachen Auswertung. Im Vergleich zu den Resultaten nach Weidner ( $W3_{\text{mean}}$ ,  $W3_{\text{max}}$ ) liegt die Variation jedoch deutlich niedriger. Daher wurden die logarithmierten stereologischen Daten des Set 1 im Bland Altman Diagramm aufgetragen (Abbildung 30 f). Der Mittelwert der Differenzen beträgt 0,009 und die Standardabweichung  $\pm 0,065$ . Der Schwankungsbereich liegt somit bei  $0,009 \pm 0,127$ . Im Gegensatz zu den Mittelwerten der Differenzen der  $W3_{\text{mean}}$  und  $W3_{\text{max}}$  Werte, weisen die Set 1 Resultate eine höhere Annäherung an den Nullpunkt auf, so dass die stereologischen Resultate eine höhere Reproduzierbarkeit im Vergleich zu den Resultaten nach Weidner aufweisen. Zusätzlich ist der Wert des Schwankungsbereichs der Weidnerschen Auswertungen ( $W3_{\text{mean}}$ :  $\pm 0,157$ ,  $W3_{\text{max}}$ :  $\pm 0,160$ ) höher als der der stereologischen Werte. Der Bereich in dem die Werte durchschnittlich variieren ist somit für die Set 1 Werte kleiner.

<b>Zweifache Auswertung des stereologischen Sets 1</b>		
<b>Tumor Nr.</b>	<b>Set 1 (Profile pro 1 mm<sup>2</sup>)</b>	
	<b>1. Auswertung</b>	<b>2. Auswertung</b>
<b>1</b>	84,1	<i>71,6</i>
<b>2</b>	54,2	<i>67,9</i>
<b>3</b>	123,0	<i>108,5</i>
<b>4</b>	76,5	<i>55,9</i>
<b>5</b>	102,8	<i>106,6</i>
<b>6</b>	381,9	<i>443,2</i>
<b>7</b>	436,0	<i>459,1</i>
<b>8</b>	412,7	<i>389,8</i>
<b>9</b>	439,8	<i>468,8</i>
<b>10</b>	548,5	<i>513,9</i>
<b>11</b>	370,1	<i>362,4</i>

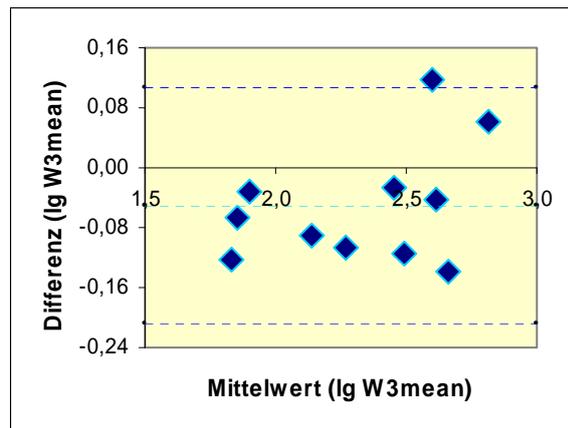
**Tabelle 7:** Die Blutgefässprofile/mm<sup>2</sup> der ersten und zweiten (kursiv) stereologischen Auswertung des Set 1 der Tumore sind angegeben.

## Ergebnisse

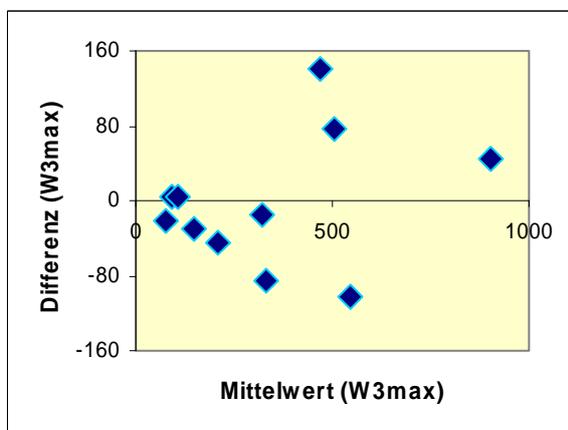
a)



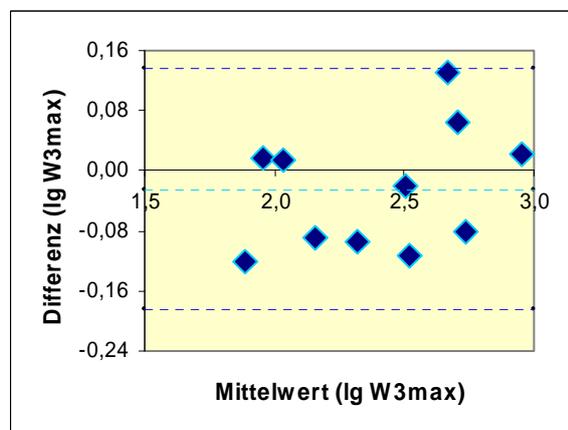
b)



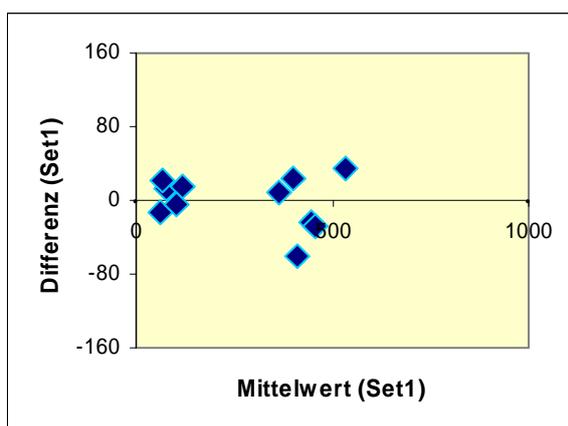
c)



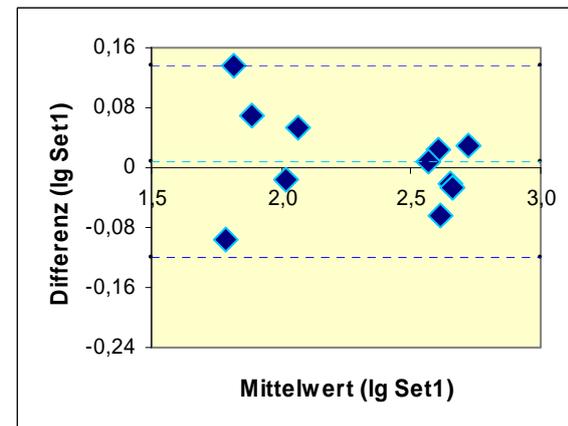
d)



e)



f)

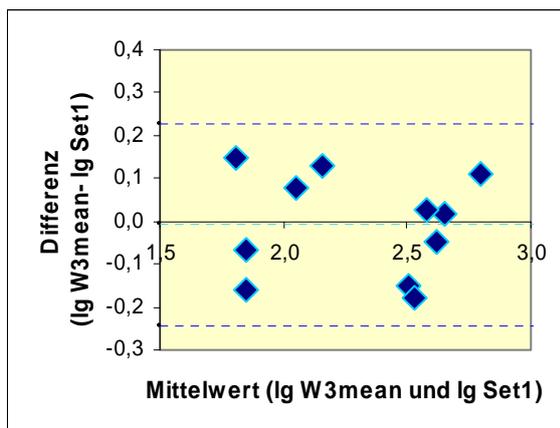


**Abbildung 30:** Die Bland Altman Diagramme stellen die zweifachen Auswertungen nach Weidner W3mean (a), W3max (c) und mittels stereologischer Werkzeuge Set 1 (e) dar. Die Reproduzierbarkeit von W3mean (b), W3max (d) und Set 1 (f) wird anhand der logarithmierten Werte überprüft. In den Graphen b, d, f sind der Mittelwert der Differenzen durch eine gestrichelte hellblaue Linie gekennzeichnet. Der Schwankungsbereich der Werte ist durch dunkelblau gestrichelte Linien markiert.

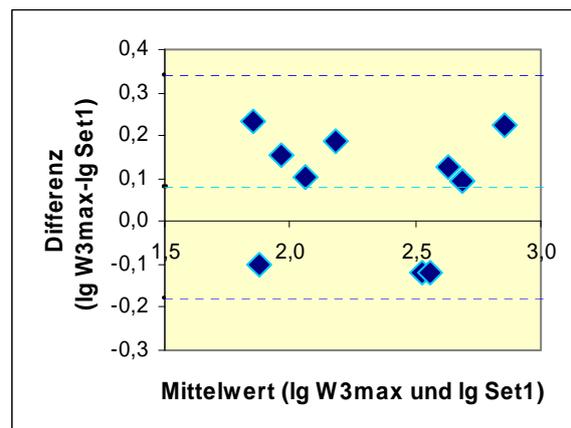
### 4.3.2 Übereinstimmung der Ergebnisse der ersten Auswertung nach Weidner und der ersten Auswertung mittels stereologischer Werkzeuge

Die Ergebnisse der ersten Auswertung der W3mean, W3max und stereologischen Set 1 Werte werden miteinander verglichen. Dafür werden die W3mean, W3max und stereologischen Set 1 Werte der ersten Auswertung logarithmiert und anhand des Bland Altman Diagramms (siehe Abschnitt 3.6.1) dargestellt (Abbildung 31). Die logarithmierten W3mean Werte und stereologischen Set 1 Werte ergeben einen Mittelwert der Differenzen von 0,008 und eine Standardabweichung von  $\pm 0,120$ . Der Schwankungsbereich liegt somit bei  $0,008 \pm 0,235$  (Abbildung 31 a). Die logarithmierten W3max Resultate und stereologischen Set 1 Ergebnisse liefern einen Mittelwert der Differenzen von 0,080 und eine Standardabweichung von  $\pm 0,133$ . Der Schwankungsbereich ergibt folglich  $0,080 \pm 0,260$  (Abbildung 31 b). Anhand beider Graphen ist zu erkennen, dass die Weidnerschen Ergebnisse (W3mean und W3max) nicht immer größer als die stereologischen Werte sind. Zusätzlich weichen die W3max Werte stärker von den stereologischen Set 1 Resultaten ab als die W3mean Ergebnisse und variieren stärker.

a)



b)



**Abbildung 31:** Die ersten Auswertungsergebnisse der logarithmierten W3mean (a) und W3max (b) Werte sind mit den ersten Auswertungsergebnissen der logarithmierten stereologischen Set 1 Ergebnisse im Bland Altman Diagramm dargestellt. Die Mittelwerte der Differenzen sind durch eine hellblau gestrichelte Linie dargestellt, die Schwankungsbreite der Werte durch dunkelblaue gestrichelte Linien.

### 4.3.3 Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge anhand mehrerer Auswertungen verschiedener Tumorschnitte

#### 4.3.3.1 Ergebnisse der Auswertung drei verschiedener Schnitte eines Tumors nach Weidner

Es sind drei Schnitte pro Tumor nach Weidner ausgewertet worden, wobei ein hotspot innerhalb einer 0,89 mm<sup>2</sup> großen Fläche ausgezählt worden ist. Aus den drei Werten ist der größte ( $G_w$ ) und kleinste ( $K_w$ ) Wert (grau hervorgehoben in Tabelle 8) in 1 mm<sup>2</sup> umgerechnet worden. Aus diesen Resultaten wurde der Mittelwert und die Differenz unter Berücksichtigung der Auswertungsreihenfolge errechnet (Tabelle 8). Diese Auswertung wird im folgenden W1 genannt. Die auf eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> bezogenen größten und kleinsten Werte werden logarithmiert und im Bland Altman Diagramm dargestellt (Abbildung 32 a). Der Mittelwert der Differenzen beträgt 0,023 mit einer Standardabweichung von  $\pm 0,214$ . Der Schwankungsbereich liegt somit bei  $0,023 \pm 0,419$ .

Auswertung eines hotspots von jeweils drei Schnitten					
Tumor	Schnitt Nr.			Mittelwert	Differenz
	0,89 mm <sup>2</sup>			1 mm <sup>2</sup>	1 mm <sup>2</sup>
Nr.	1	2	3	$G_w, K_w$	$G_w, K_w$
1	68	29	55	54,7	44,0
2	113	103	88	113,4	28,2
3	164	165	162	184,5	3,4
4	92	133	82	121,3	57,6
5	148	168	112	158,0	63,2
6	528	459	314	475,2	241,5
7	227	337	432	371,9	-231,4
8	253	283	286	304,2	-37,2
9	321	292	347	360,6	-62,1
10	270	413	297	385,4	-161,4
11	260	471	292	412,5	-238,1

**Tabelle 8:** Es sind drei Schnitte (1,2,3) pro Tumor ausgewertet worden, wobei Blutgefäßprofile pro 0,89 mm<sup>2</sup> ausgezählt worden sind. Aus den drei Werten ist der größte ( $G_w$ ) und kleinste ( $K_w$ ) Wert (grau) in 1 mm<sup>2</sup> umgerechnet worden und aus diesen wurde der Mittelwert und die Differenz errechnet.

#### 4.3.3.2 Ergebnisse der Auswertung drei verschiedener Schnittsets eines Tumors mittels stereologischer Werkzeuge

Die Einzelergebnisse der Auswertung drei verschiedener Schnittsets (Set 1, Set 2, Set 3) eines Tumors mittels stereologischer Werkzeuge sind in Tabelle 9 aufgeführt. Vom Lungentumor A 549-1 und vom Mammatumor MDA-MB 435-1 lagen nur zwei Sets zur

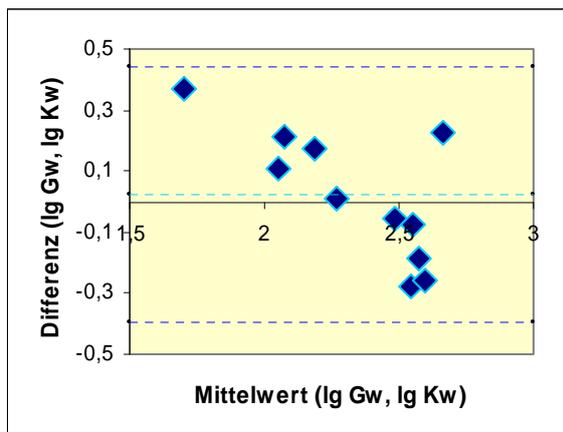
Auswertung vor. Aus den vorliegenden Werten pro Tumor sind der größte ( $G_S$ ) und der kleinste ( $K_S$ ) Wert gewählt worden, um aus diesen die Differenzen, unter Berücksichtigung der Reihenfolge der Ergebnisse, und den Mittelwert zu errechnen (Tabelle 9). Der größte ( $G_S$ ) und der kleinste ( $K_S$ ) Wert sind logarithmiert und im Bland Altman dargestellt worden (Abbildung 32 b). Der Mittelwert der Differenzen ergibt bei den logarithmierten Werten  $-0,038$  mit einer Standardabweichung von  $\pm 0,084$ . Der Schwankungsbereich liegt somit bei  $\pm 0,165$ .

## Ergebnisse

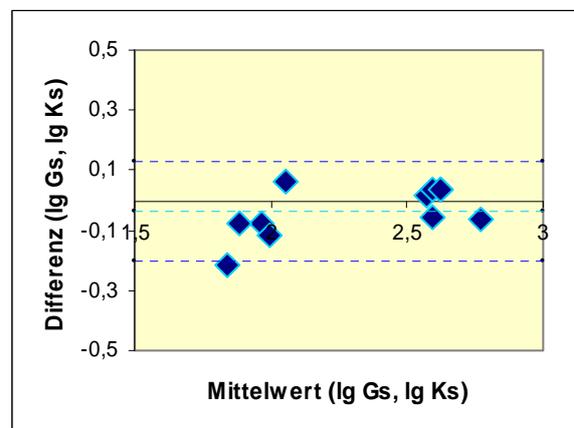
Stereologische Auswertung von drei Sets					
Profile pro 1 mm <sup>2</sup>					
Tumor	Set			Differenz	Mittelwert
Nr.	1	2	3	G <sub>S</sub> , K <sub>S</sub>	G <sub>S</sub> , K <sub>S</sub>
1	84,1	100,6	-	-16,5	92,3
2	54,2	88,8	72,1	-34,5	71,5
3	123,0	120,1	105,7	17,3	114,4
4	76,5	69,8	83,3	-13,4	76,6
5	102,8	86,7	113,7	-26,9	100,2
6	381,9	368,9	-	13,0	375,4
7	435,0	403,2	408,0	32,8	419,6
8	412,7	388,9	377,1	35,7	394,9
9	439,8	406,0	409,7	33,8	422,9
10	548,5	630,5	600,1	-82,0	589,5
11	370,1	422,2	391,7	-52,1	396,1

**Tabelle 9:** Es sind drei Sets (Set 1, 2, 3) eines Tumors (von Lungenkarzinom Nr.1, Mammakarzinom Nr.6 nur zwei Sets) mittels stereologischer Werkzeuge für die Blutgefäßprofildichte pro 1 mm<sup>2</sup> ausgewertet worden. Die Differenz und der Mittelwert sind aus dem größten (G<sub>S</sub>) und kleinsten (K<sub>S</sub>) Wert der Ergebnisse pro Tumor gebildet worden.

a)



b)



**Abbildung 32:** Der Bland Altman Graph (a) stellt die Ergebnisse der logarithmierten größten (G<sub>W</sub>) und kleinsten (K<sub>W</sub>) Werte der hotspot Auszählung W1 nach Weidner dar. Graph (b) zeigt die logarithmierten größten (G<sub>S</sub>) und kleinsten (K<sub>S</sub>) der stereologischen (Set 1, 2, 3) Werte. Die hellblau gestrichelte Linie stellt den Mittelwert der Differenzen dar, die dunkelblauen Linien die Grenzen des Schwankungsbereichs.

#### **4.4 Quantifizierung histomorphologischer Strukturen in experimentellen Tumoren mittels stereologischer Methoden und deren Korrelation mit der Tumorsignalintensität nach Gabe von optischen Kontrastmitteln**

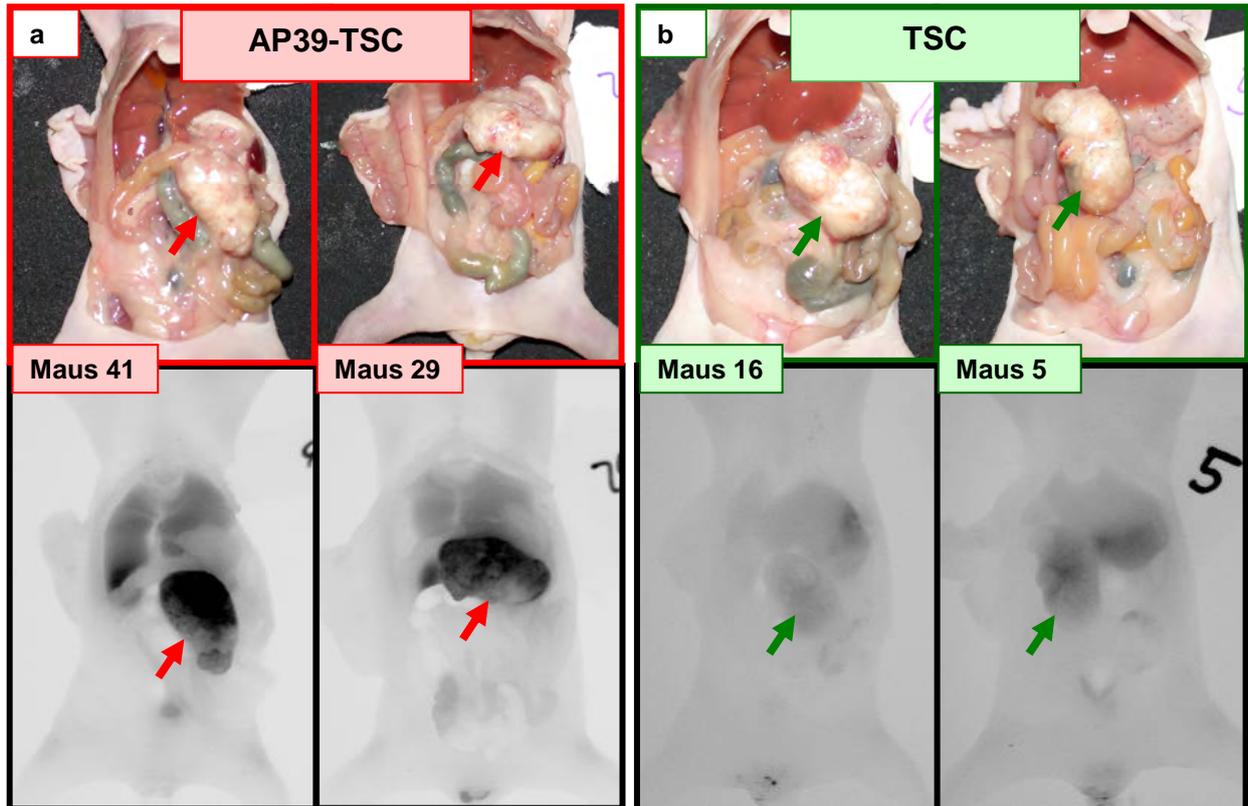
Die Kontrastwerte der optischen Bildgebung der Gruppe 1 und 2 werden zunächst miteinander verglichen. Anschließend werden die stereologischen Parameter (Tumervolumina, nekrotische und intakte Tumervolumina, Blutgefäße, Diffusionsradien) zwischen den beiden Gruppen verglichen. Dann werden die Kontrastwerte der Gruppe 1 und der Gruppe 2 mit der stereologisch ermittelten Blutgefäßlänge, des Volumens der nekrotischen und intakten Tumorgewebeanteile korreliert.

##### **4.4.1 Tumorsignalintensität nach intravenöser Gabe von optischen Kontrastmitteln**

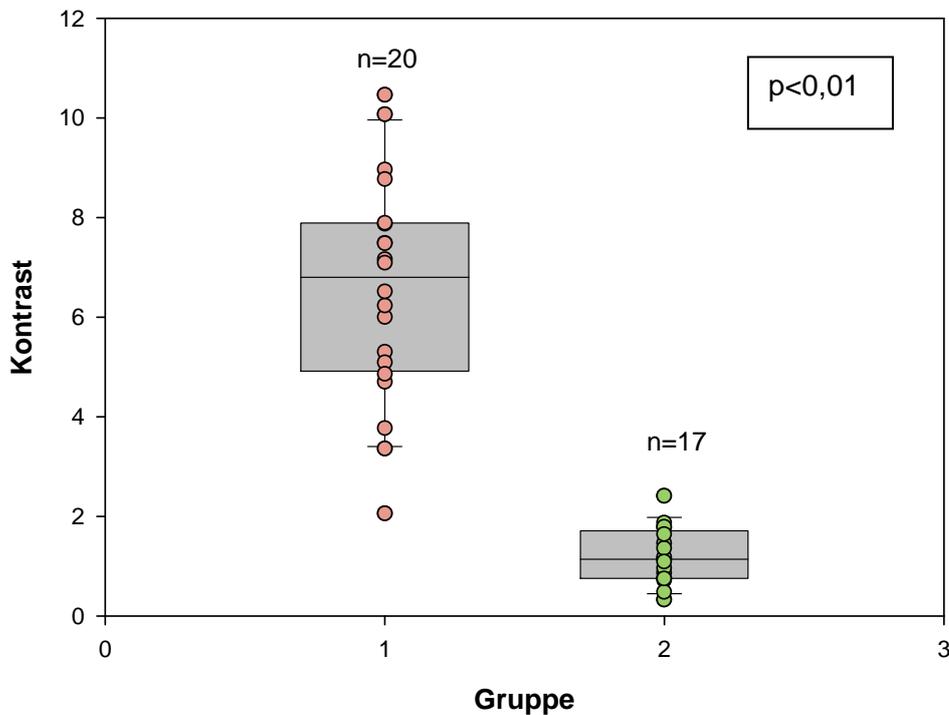
Nach der optischen Bildgebung wurden die Kontraste der Tumore anhand der entstandenen Bilder mit Hilfe eines Bildanalyseprogramms ermittelt. Die Abbildung 33 stellt beispielhaft vier behandelte Mäuse dar. Abbildung 33 a zeigt zwei Tiere aus der Gruppe 1, die das spezifische Kontrastmittel AP39-TSC verabreicht bekommen haben, Abbildung 33 b, zwei Mäuse aus der Gruppe 2, die das unspezifische Kontrastmittel TSC erhalten haben. Die Abbildung 33 zeigt jeweils in der oberen Reihe makroskopische Digitalaufnahmen der eröffneten Bauchhöhle der Mäuse, so dass der experimentelle Pankreastumor sichtbar wird, in der unteren Reihe die dazugehörigen laserinduzierten in situ Fluoreszenzbildaufnahmen. Es ist bereits an den beispielhaften Bildern zu erkennen, dass die Signalintensität des Tumors nach Gabe des AP39-TSC deutlicher als nach Gabe des TSC Kontrastmittels ist.

Die Kontrastwerte des spezifischen Kontrastmittels AP39-TSC (Gruppe 1) liegen zwischen 2,06 und 10,46, wobei der Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) bei  $6,56 \pm 2,21$  liegt. Die Kontrastwerte des unspezifischen Kontrastmittels TSC (Gruppe 2) liegen zwischen 0,33 und 2,41; der Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) beträgt  $1,21 \pm 0,56$ . Die Kontrastwerte der beiden Gruppen sind in Abbildung 34 dargestellt. Der Graph weist einen signifikanten ( $p < 0,01$ ) Unterschied zwischen den Kontrastwerten der beiden Gruppen auf. Die Kontraste der Gruppe 1 sind im Gegensatz zu den Werten der Gruppe 2 signifikant höher. In Tabelle 17 im Anhang sind die einzelnen Tumorkontrastwerte der jeweiligen Gruppe aufgeführt. (Die Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung der optischen Daten sind zur Übersicht in Tabelle 10 dargestellt.)

## Ergebnisse



**Abbildung 33:** Obere Reihe: Eröffnete Bauchhöhlen (Maus 41, 29, 16, 5) mit sichtbaren Pankreastumoren der NET Zelllinie BON (Pfeile). Untere Reihe: Dazugehörige NIR-Laser induzierte Fluoreszenz-Bildaufnahmen (Pfeile zeigen auf Tumorregion). Die Mäuse 41 und 29 sind mit dem Kontrastmittel AP39-TSC (a, rot), die Mäuse 16 und 5 mit dem unspezifischen Kontrastmittel TSC (b, grün) behandelt worden.



**Abbildung 34:** Die Abbildung stellt die Kontrastwerte der Gruppe 1 (n=20) und 2 (n=17) dar. Die Kontrastwerte beider Gruppen unterscheiden sich signifikant ( $p<0,01$ ) voneinander.

#### **4.4.2 Quantifizierung pathomorphologischer Strukturen in experimentellen Pankreastumoren mittels stereologischer Methoden**

Es wurden insgesamt 20 Tumore der Tiergruppe 1, die mit dem spezifischen Kontrastmittel AP39-TSC behandelt worden sind, und 17 Tumore der Tiergruppe 2, die mit dem unspezifischen Kontrastmittel TSC behandelt worden sind, stereologisch ausgewertet. Zunächst wurden mittels Cavalieri Methode die Tumorumfänge und sowohl die vitalen als auch nekrotischen Tumorregionen ermittelt. Anschließend wurden die Blutgefäße stereologisch quantifiziert. Alle stereologischen Daten sind zunächst zwischen der ersten und der zweiten Gruppe verglichen worden. Anschließend wurden die stereologischen Daten mit den Werten der optischen Bildgebung korreliert.

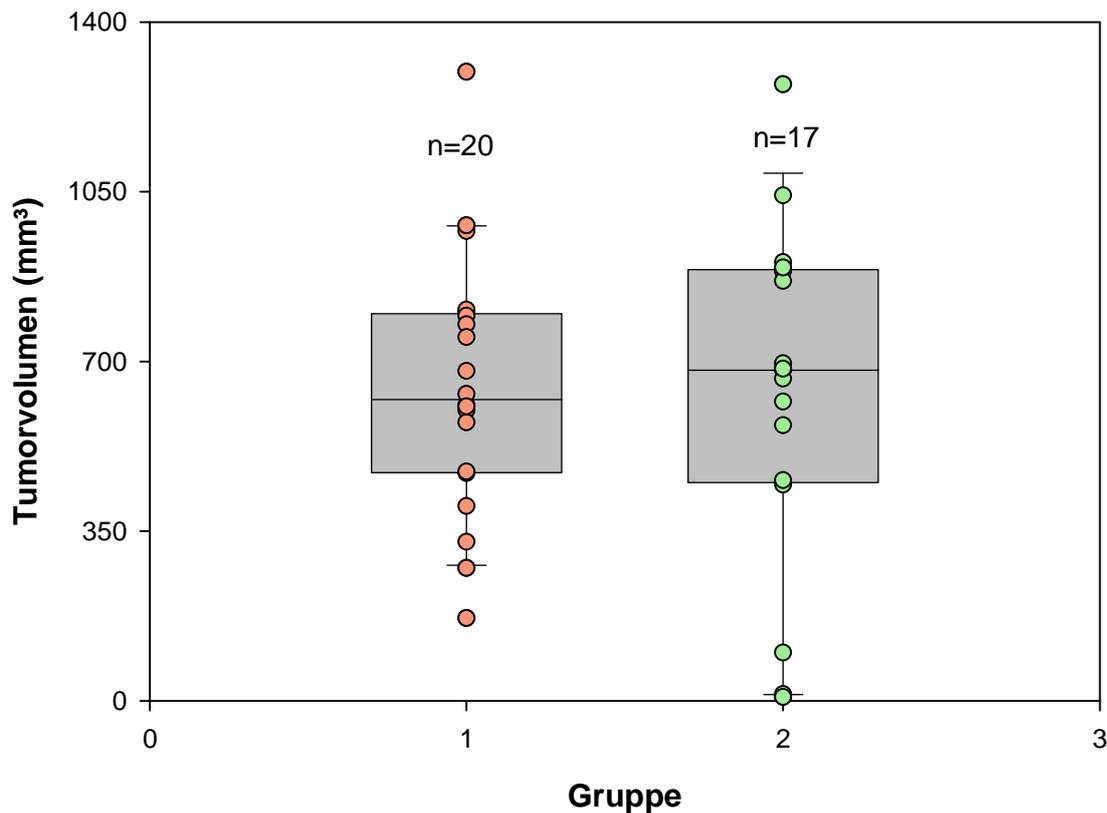
##### **4.4.2.1 Volumen der Pankreastumore**

Die Ergebnisse der stereologisch ermittelten Volumina der untersuchten experimentellen Pankreastumore sind im Anhang in Tabelle 18 aufgeführt. In Abbildung 35 sind die Tumorumfänge beider Tiergruppen graphisch dargestellt. Gruppe 1 (n=20) wurde mit dem Kontrastmittel AP39-TSC und die Gruppe 2 (n=17) mit dem Kontrastmittel TSC behandelt. Die Größen der Tumore der Gruppe 1 liegen zwischen 170,25 und 1296,90 mm<sup>3</sup>, wobei der Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) dieser Tumorgößen bei 649,57 $\pm$ 265,27 mm<sup>3</sup> liegt. Die Tumorgößen der Gruppe 2 liegen zwischen 7,84 und 1271,87 mm<sup>3</sup> und der Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) der TSC behandelten Tumore beträgt 635,14 $\pm$ 351,52 mm<sup>3</sup>. Die Mittelwerte der Tumorgößen beider Gruppen weichen nur gering voneinander ab und die Volumina beider Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die Tumore haben sich somit bezüglich ihrer Größe in beiden Gruppen ähnlich verhalten. (Die Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung der stereologischen Parameter sind zur Übersicht in Tabelle 10 dargestellt.)

## Ergebnisse

Parameter	Gruppe 1 (AP39-TSC) Mittelw.±St.abw.	Gruppe 2 (TSC) Mittelw.±St.abw.
Kontrast	6,56±2,21	1,21±0,56
Tumorzvolumen (mm <sup>3</sup> )	649,57±265,27	635,14±351,52.
nekrotisches Tumorzvolumen (mm <sup>3</sup> )	347,01±183,18	378,05±243,63
vitales Tumorzvolumen (mm <sup>3</sup> )	302,56±103,25	257,08±126,56
Blutgefäßlänge (m)	36,50±19,12	37,43±29,00
Diffusionsradius (µm)	53,51±7,88	49,67±9,51

**Tabelle 10:** In der Tabelle sind für die Gruppe 1 (AP39-TSC) und 2 (TSC) die Mittelwerte und jeweiligen Standardabweichungen sowohl der Kontrastwerte der optischen Bildgebung als auch der stereologischen Parameter dargestellt. Bei den stereologischen Parametern handelt es sich um das Tumorzvolumen, das nekrotische und vitale Tumorzvolumen, die Blutgefäßlänge und den Diffusionsradius.



**Abbildung 35:** Der Graph (Box Plot) zeigt die Gesamtvolumina der Tumore der Gruppe 1 (n=20) und 2 (n=17). Die Tumore der Gruppe 1 (rot) wurden mit dem Kontrastmittel AP39-TSC und die Tumore der Gruppe 2 (grün) mit dem Kontrastmittel TSC behandelt.

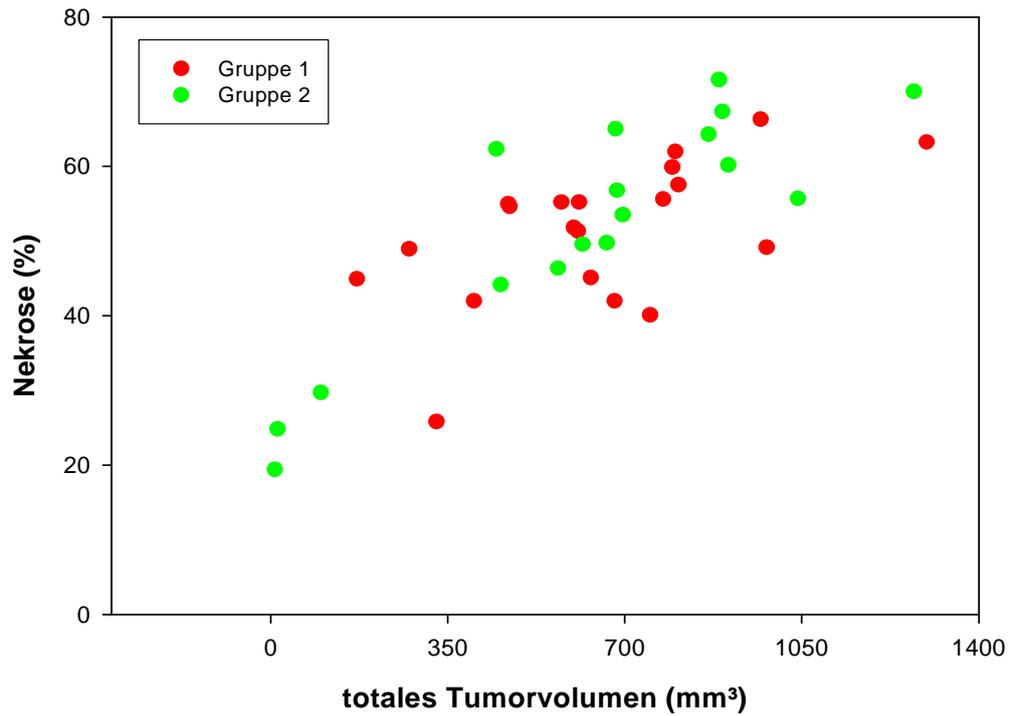
### 4.4.2.2 Nekrotische und vitale Tumorzvolumenanteile

Die Tumorzvolumen haben sich zwischen den beiden Tiergruppen nicht signifikant unterschieden (siehe Punkt 4.4.2.1). Wenn die nekrotischen oder intakten Tumorzvolumenanteile mit

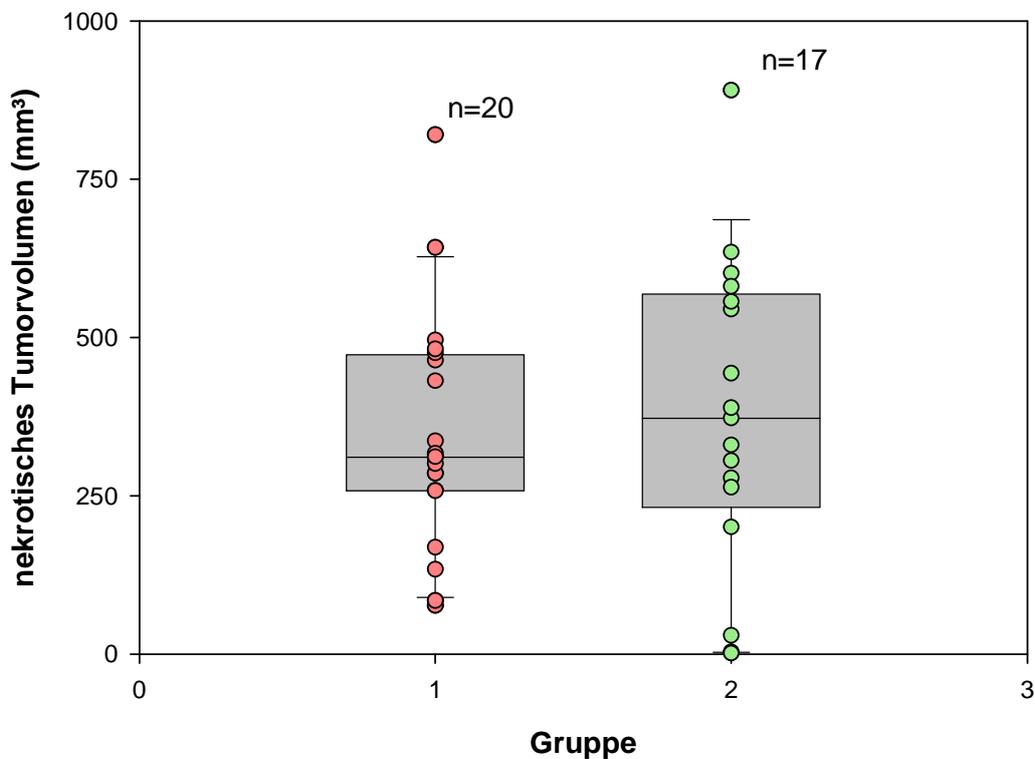
den Tumorgrößen im Zusammenhang stehen, müssten sich diese Gewebearten ebenfalls ähnlich zwischen den beiden Gruppen verhalten. Gruppe 1 (n=20) wurde mit dem Kontrastmittel AP39-TSC und die Gruppe 2 (n=17) mit dem Kontrastmittel TSC behandelt. In Abbildung 36 sind daher die totalen Tumorumfänge ( $\text{mm}^3$ ) und die nekrotischen Tumoranteile (%) der beiden Gruppen graphisch dargestellt. Es ist anhand des Streudiagramms, das mittels Computerprogramm SigmaPlot 8.0 erstellt wurde, erkennbar, dass je größer die Tumore sind, desto größer sind auch die nekrotischen Regionen innerhalb des jeweiligen Tumors. In Abbildung 37 sind die nekrotischen Tumorumfänge der beiden Gruppen nochmals separat mittels Boxplot dargestellt. Der t-Test zeigt, dass sich die nekrotischen Areale der Tumore zwischen den Gruppen nicht signifikant voneinander unterscheiden. Da die nekrotischen und die intakten Tumorregionen in einem logischen Zusammenhang miteinander stehen, wird auf eine graphische Darstellung bezüglich der intakten Gewebe verzichtet.

Die nekrotischen und vitalen Tumorumfänge, die mittels stereologischer Cavalieri Methodik ermittelt wurden, sind prozentual (%) und total ( $\text{mm}^3$ ) (ausgehend vom Gesamtvolumen) in Tabelle 18 im Anhang aufgeführt. Die Tumore der ersten Tiergruppe (AP39-TSC) weisen Nekrosen zwischen 25,80 und 66,32% auf, der zweiten Gruppe zwischen 19,38 und 71,63%. Das totale nekrotische Volumen liegt für die Gruppe 1 zwischen 76,50 und 820,46  $\text{mm}^3$ , für die Gruppe 2 zwischen 1,52 und 890,62  $\text{mm}^3$ . Für die Nekrosen der mit AP39-TSC behandelten Gruppe ergibt sich ein Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) von  $347,01 \pm 183,18 \text{ mm}^3$ , für das intakte Gewebe ein Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) von  $302,56 \pm 103,25 \text{ mm}^3$ . Der Mittelwert der nekrotischen Areale der mit TSC behandelten Gruppe liegt bei  $378,05 \pm 243,63 \text{ mm}^3$ , der der intakten Bereiche bei  $257,08 \pm 126,56 \text{ mm}^3$ . (Die Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung der stereologischen Parameter sind zur Übersicht in Tabelle 10 dargestellt.)

## Ergebnisse



**Abbildung 36:** Im Graphen sind die totalen Tumolvolumina und deren nekrotische Anteile der Gruppe 1 (AP39-TSC, rot) und 2 (TSC, grün) gegeneinander aufgetragen. Je größer die Tumore sind desto größer ist auch deren nekrotischer Anteil.



**Abbildung 37:** Im Graphen sind die nekrotischen totalen Tumolvolumina der Gruppe 1 (n=20, AP39-TSC) und Gruppe 2 (n=17, TSC) dargestellt.

#### 4.4.2.3 Fehlerkoeffizient CE und Variationskoeffizient CV für das gesamte und vitale Tumorumfängen

Die Fehlerkoeffizienten CE der einzelnen Tumore sind im Anhang in Tabelle 19 aufgeführt. (Die Werte, die zur Ermittlung des CE geführt haben bzw. die Zählungsergebnisse der einzelnen Schnitte eines Tumors sind im Anhang in Tabelle 20 und Tabelle 21 aufgeführt.) Der minimale CE Wert des totalen Tumorumfängens liegt bei 0,012, der maximale bei 0,045. Der Minimalwert des CE Werts des intakten Tumorumfängens lautet 0,020, der Maximalwert 0,055. Alle CE Werte des totalen Tumorumfängens liegen unter dem angestrebten Wert von 0,05 (5%). Für das intakte Tumorumfängen gibt es nur zwei Ausnahmen, die diesen angestrebten Wert überschreiten (Tumornr. 19 mit 0,055 und Nr. 36 mit 0,052).

Der Coefficient of variation CV liefert für die Berechnungen des intakten Tumorgewebes einen Wert von 0,409 und liegt deutlich über dem CE Wert 0,035 der gesamten Studie des intakten Tumorumfängens. Der quadrierte observed coefficient of variation  $OCV^2$  liegt somit bei 0,168 und wird von dem Variationskoeffizienten bestimmt und nicht von dem CE Wert. Die Division des quadrierten CE Wertes der Gesamtstudie und des  $OCV^2$  Resultates führt zum Ergebnis 0,007.

#### 4.4.2.4 Blutgefäßlänge und Diffusionsradius

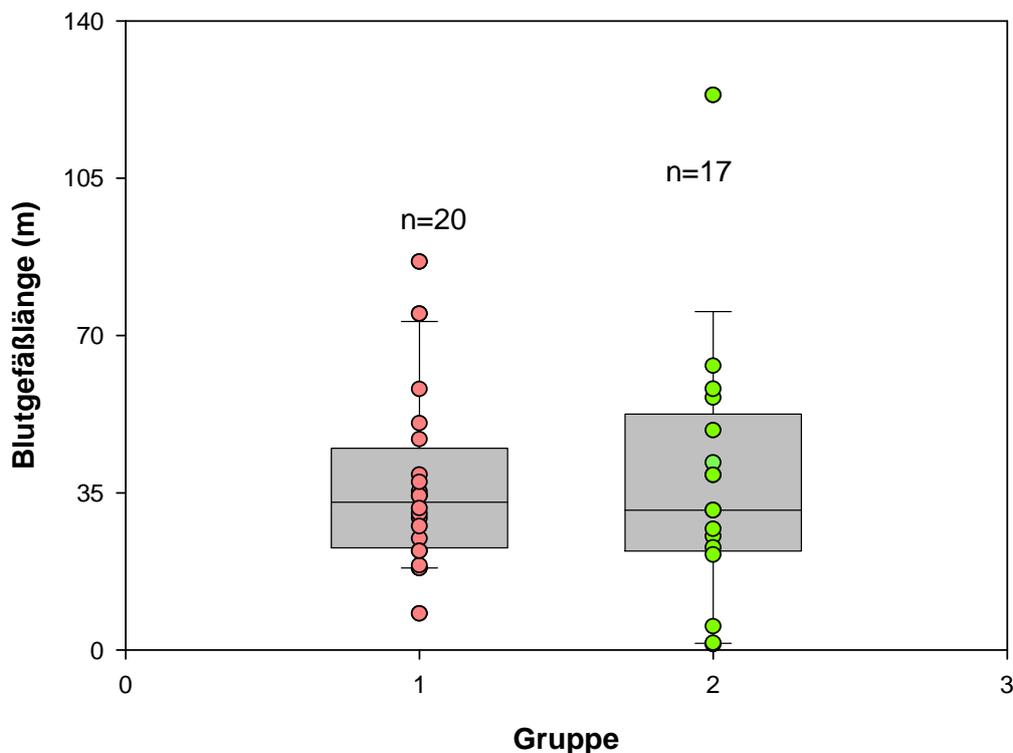
Neben den Tumorumfängen ist die Vaskularisation der Tumore beider Gruppen (AP39-TSC und TSC) quantifiziert worden. Hierfür wurde für jeden Tumor die Blutgefäßlänge und der Diffusionsradius ermittelt. Da sich die unterschiedlich großen Nekroseareale, in denen keine Blutgefäße vorzufinden sind, der einzelnen Tumore unterschiedlich stark auf die Berechnung der Blutgefäßlänge und des Diffusionsradius auswirken würden, wurde bei der Blutgefäßlängen- und Diffusionsradiusberechnung nur das Volumen des intakten Tumorgewebes berücksichtigt. Zunächst wurde also die Blutgefäßlängendichte  $L_v$  innerhalb des vitalen Tumorumfängens stereologisch bestimmt. Dann wurde die Blutgefäßlänge  $L$  und der Diffusionsradius  $r$  mittels stereologischer Methoden berechnet. Die einzelnen Ergebnisse ( $L$ ,  $r$ ) für jeden Tumor sind in Tabelle 22 im Anhang aufgeführt.

Da sich die intakten Tumorgewebeanteile in beiden Tiergruppen ähnlich verhalten haben, soll nun überprüft werden, ob sich die Vaskularisation der Tumore zwischen den Gruppen unterschieden hat. Hierfür wurden die Resultate der Blutgefäßlängen (m) (Abbildung 38) und der Diffusionsradien ( $\mu\text{m}$ ) (Abbildung 39) graphisch dargestellt. Die Tumore der ersten Tiergruppe (AP39-TSC) weisen Blutgefäßlängen zwischen 8,13 und 86,43 m auf, der zweiten Gruppe zwischen 1,27 und 123,53 m. Die Diffusionsradien liegen für die Gruppe 1 zwischen 35,94 und 63,08  $\mu\text{m}$ , für die Gruppe 2 zwischen 34,50 und 66,59  $\mu\text{m}$ . Für die

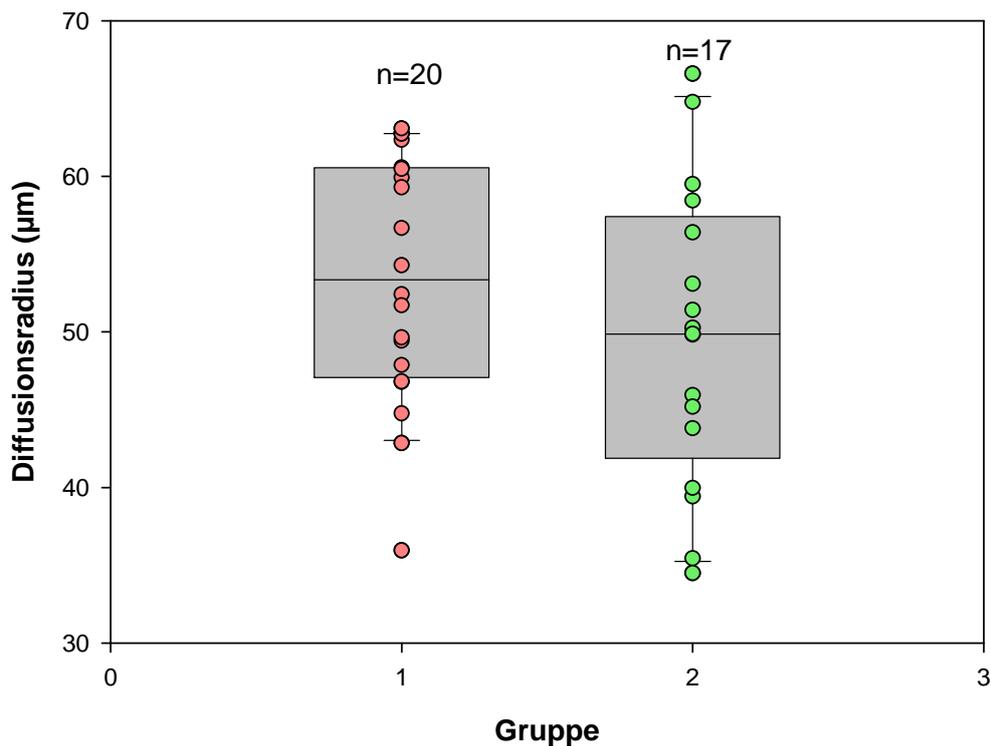
## Ergebnisse

Blutgefäßlängen der mit AP39-TSC behandelten Gruppe ergibt sich ein Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) von  $36,50 \pm 19,12$  m, für die Diffusionsradien ein Mittelwert von  $53,51 \pm 7,88$   $\mu\text{m}$ . Der Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) der Blutgefäßlängen der mit TSC behandelten Gruppe liegt bei  $37,43 \pm 29,00$  m, der der Diffusionsradien bei  $49,67 \pm 9,51$   $\mu\text{m}$ . (Die Mittelwerte und die jeweilige Standardabweichung der stereologischen Parameter sind zur Übersicht in Tabelle 10 dargestellt.)

Die Blutgefäßlängen und die Diffusionsradien der beiden unterschiedlich behandelten Tumorguppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die Vaskularisation der Tumore ähnelt sich somit in beiden Gruppen.



**Abbildung 38:** Der Graph zeigt die totale Blutgefäßlänge (m) der Tumore der Gruppe 1 (n=20) und 2 (n=17). Die Tumore der Gruppe 1 (rot) wurden mit dem Kontrastmittel AP39-TSC und die Tumore der Gruppe 2 (grün) mit dem Kontrastmittel TSC behandelt.



**Abbildung 39:** Der Graph stellt die Diffusionsradien der ersten (n=20) und zweiten (n=17) Gruppe dar. Die erste Tumorgruppe wurde mit dem Kontrastmittel AP39-TSC (rot) und die zweite mit TSC (grün) behandelt.

#### 4.4.3 Korrelation zwischen den Kontrastwerten und den stereologischen Werten

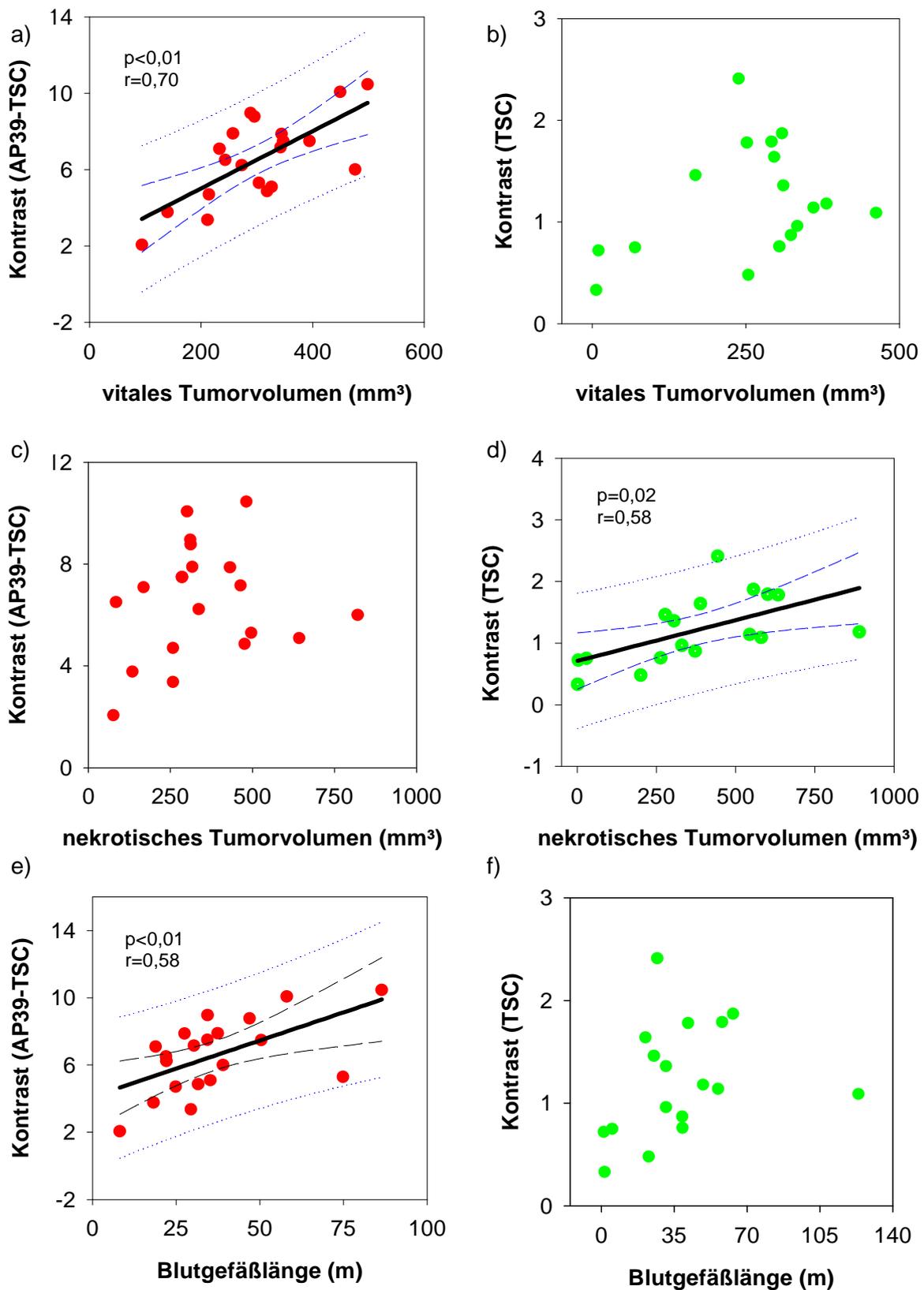
Die Kontrastwerte der optischen Bildgebung variieren zwischen den beiden Tumorgruppen (Gruppe 1 (n=20) und 2 (n=17)). Daher sollen diese Werte mit den stereologischen Daten (vitalen und nekrotisches Tumolvolumen, Blutgefäßlänge) korreliert werden, um zu überprüfen, ob sich die beiden verwendeten Kontrastmittel (AP39-TSC und TSC) in bestimmten tumoralen Regionen bevorzugt anreichern.

In Abbildung 40 a, c, e sind die Kontrastwerte des spezifischen Kontrastmittels AP39-TSC mit den vitalen (a) und nekrotischen Tumolvolumina (c) und den Blutgefäßlängen (e) jeweils in einem Graphen dargestellt. Es konnte eine signifikante ( $p < 0,01$ ) positive Korrelation ( $r = 0,70$ ) zwischen den laserinduzierten Tumorkontrastwerten des Kontrastmittels AP39-TSC (Gruppe 1) und der vitalen Volumina ( $\text{mm}^3$ ) der Tumore festgestellt werden (Abbildung 40 a), jedoch nicht für die nekrotischen Anteile (Abbildung 40 c). Zusätzlich korrelierte ( $r = 0,58$ ) die Blutgefäßlänge (m) innerhalb des intakten Tumorgewebes signifikant ( $p < 0,01$ ) mit den Kontrastwerten des spezifischen Kontrastmittels AP39-TSC (Abbildung 40 e). Je mehr

## Ergebnisse

vitales Tumorgewebe und Blutgefäße sich innerhalb des Tumors befinden, desto größer wird der Tumorkontrastwert.

In Abbildung 40 b, d, f sind die Kontrastwerte des unspezifischen Kontrastmittels TSC mit den stereologischen Parametern graphisch dargestellt (b: vitales Tumolvolumen, d: nekrotisches Tumolvolumen, f: Blutgefäßlänge). Für das Kontrastmittel TSC (Gruppe 2) konnte keine Korrelation zwischen den Kontrastwerten und den vitalen Tumorumina ( $\text{mm}^3$ ) ermittelt werden (Abbildung 40 b), sondern es bestand eine signifikante ( $P= 0,02$ ) Korrelation ( $r=0,58$ ) zwischen den Kontrastwerten und den nekrotischen Tumorumina (Abbildung 40 d). Die Blutgefäßlänge (m) innerhalb des intakten Tumorgewebes korrelierte jedoch nicht mit den Kontrastwerten des unspezifischen Farbstoffs TSC (Abbildung 40 f). Je mehr nekrotisches Gewebe innerhalb des Tumors vorliegt, desto größer wird auch der Tumorkontrastwert.



**Abbildung 40:** Die Abbildung stellt die Korrelation zwischen den Kontrastwerten des Kontrastmittels AP39-TSC (rot,  $n=20$ ) und TSC (grün,  $n=17$ ) und den stereologisch quantifizierten Parametern (vitales und nekrotisches Tumolvolumen und Blutgefäßlänge) dar. Die Abbildungen (a) und (e) zeigen die signifikante ( $p$ ) Korrelation ( $r$ ) zwischen den Kontrastwerten des spezifischen Kontrastmittels

## Ergebnisse

AP39-TSC und den vitalen Tumorumfängen (a) und den Blutgefäßlängen (e). Die Abbildung (c) demonstriert, dass keine Korrelation zwischen den Kontrastwerten (AP39-TSC) und den nekrotischen Tumorumfängen vorliegt. Im Gegensatz dazu zeigen die Abbildungen (b, d, f), dass die Kontrastwerte des unspezifischen Kontrastmittels TSC nicht mit den vitalen Tumorumfängen (b) und den Blutgefäßlängen (f) korrelieren, sondern mit den nekrotischen Tumorumfängen eine signifikante Korrelation aufweisen (d). Um die signifikante Korrelation zwischen den unabhängigen stereologischen Werten (x-Werte) und abhängigen Kontrastwerten (y-Werte) hervorzuheben, wurde in die jeweiligen Graphen eine Regressionsgerade mit Konfidenzband eingefügt (a, d, e).

## 5 DISKUSSION

Die pharmakologische Charakterisierung, Wirkung und Effizienz onkologischer Therapeutika und Diagnostika erfordern morphologische und pathologische Kenntnisse des jeweils untersuchten Tumors. Hierfür werden in der Regel am entnommenen Tumorgewebe (immun)histologische Untersuchungen durchgeführt. Die derzeitigen, histologischen Analysen intratumoraler Strukturen beruhen jedoch eher auf qualitativen oder semi-quantitativen Methoden. Die tumorale Angiogenese beispielsweise nimmt sowohl in der Klinik als auch in der Forschung einen sehr hohen Stellenwert in der Onkologie ein, so dass die Auswertung der tumoralen Blutgefäße in diesem Bereich im Fokus steht. Daher existieren für die Analyse der Tumovaskularisation mikroskopische Standardmethoden, die hauptsächlich aus der Auswertungsmethode nach Weidner bestehen, der sogenannten microvessel density (MVD), oder einer modifizierten Form (wie beispielsweise der Chalkley Methode). Da quantitative Daten intratumoraler Strukturen die Aussagekraft biologischer Effekte und den Wert der Studie stark erhöhen würden, wurden im Rahmen dieser Arbeit stereologische Methoden, die auf fundierten mathematischen und statistischen Daten beruhen, zur histologischen Analyse tumoraler Gewebe getestet und etabliert.

Im Zuge dessen wurden daher die herkömmliche Methode nach Weidner und eine stereologische Methode, die der Blutgefäßprofildichtenermittlung dient, auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft und anschließend miteinander verglichen. Da die Durchführung der stereologischen Methode der Blutgefäßauswertung von dem Richtungsverlauf dieser Strukturen abhängt, wurden die tumoralen Blutgefäße zunächst auf ihre Anisotropie bzw. Isotropie untersucht. Hierfür wurde erst an Modellen die Isotropie und Anisotropie von Strukturen simuliert und deren Bedeutung herausgearbeitet. Dann wurde der Blutgefäßverlauf für experimentelle, unbehandelte Tumore analysiert. Bevor beide Methoden (Weidner und Stereologie) untersucht worden sind, wurden zusätzlich noch Fehlerquellen nicht stereologischen Ursprungs analysiert. Hierbei wurde die histologische Aufarbeitung der Tumore hinsichtlich der Schrumpfung bzw. Deformation bei Gefrierschnitten untersucht. Anhand eines experimentellen Brusttumors wurde die Schrumpfung während des Schneide- und Färbeprozesses ermittelt.

Abschließend wurde eine präklinische, diagnostische Studie mit orthotopen Pankreastumoren durchgeführt, die mit der Durchführung einer stereologischen Auswertung endete. Hierfür wurden tumortragende Mäuse in zwei Gruppen eingeteilt, wobei die erste Gruppe (n=20) mit dem gefäßspezifischen Kontrastmittel AP39-TSC und die zweite Gruppe (n=17) mit dem unspezifischen Kontrastmittel TSC behandelt worden ist. Die

## Diskussion

Tumorkontrastwerte wurden mittels optischer Bildgebung bzw. NIR (Nah-Infrarot) Laserlicht ermittelt. Anschließend wurden die gesamte Tumorgefäßlänge, das Gesamtvolumen des Tumors und die Volumina der nekrotischen und intakten Tumorbereiche des jeweiligen Tumors mikroskopisch mittels stereologischer Methoden *in vitro* quantifiziert. Die stereologischen Resultate wurden zunächst zwischen den Gruppen verglichen und dann mit den *in vivo* Daten korreliert.

### 5.1 Die Bestimmung der Isotropie und Anisotropie von Strukturen

Der Richtungsverlauf von biologischen Strukturen kann durch die Isotropie (Strukturen verlaufen gleichermaßen in alle Richtungen) oder Anisotropie (Strukturen verlaufen in eine Hauptrichtung) charakterisiert werden. Die Kenntnis der Richtungsverläufe ist bei bestimmten stereologischen Methoden für „unbiased“ Resultate von hoher Bedeutung wie z. B. bei der Quantifizierung der Blutgefäßlänge oder der Gehirnrindenoberfläche. Bei der stereologischen Längen- und Oberflächenschätzung gilt, wenn die zu untersuchende Struktur nicht isotrop verläuft, müssen so genannte IUR-(isotropic uniform random) Schnitte (siehe Abschnitt 2.4.2.4) angefertigt werden. Da der Verlauf von Strukturen innerhalb biologischer und insbesondere pathologischer oder behandelter Gewebe oft unbekannt ist, werden in der Regel IUR-Schnitte angefertigt. Wenn die IUR-Schnitte jedoch nicht angefertigt worden sind bzw. werden können, z. B. durch technische Hindernisse, ist die Isotropie der Struktur abzuklären. (Denn wenn die zu analysierende Struktur isotrop ist, muss das Gewebe nicht isotrop eingebettet werden.) Beispielsweise kann das chaotische Wachstumsverhalten tumoraler Blutgefäße als isotrop deklariert werden; aber der Richtungsverlauf der Blutgefäße kann sich laut Jain [21] unter therapeutischen Maßnahmen durchaus ändern.

In dieser Arbeit wird eine Aufarbeitungs- und Untersuchungstechnik präsentiert mit der die Isotropie und Anisotropie von biologischen Strukturen ermittelt werden kann. Zunächst wurde die Analyse der Isotropie und Anisotropie von Strukturen anhand verschiedener experimenteller Modelle dargestellt (homogenes Plasikblockmodell, homogenes und heterogenes Nudel-Agar Modell). Dann wurde die Blutgefäßrichtung innerhalb unbehandelter, experimenteller Lungenkarzinome bestimmt.

Die wichtigsten Punkte für die Ermittlung der Isotropie bzw. Anisotropie einer Struktur sollen im folgenden kurz zusammengefasst werden. Das Untersuchungsobjekt wird aus drei Richtungen, die am weitesten voneinander entfernt liegen und rechtwinklig aufeinander treffen ( x-, y- und z- Achse) analysiert. Hierfür muss das Untersuchungsobjekt in drei repräsentative Proben eingeteilt werden (Details siehe Punkt 3.2.). Die erste Probe wird in x-,

die zweite in y- und die dritte in z-Richtung nach dem SURS (systematic uniform random sampling) Prinzip (siehe Punkt 2.4.2.3) aufgeschnitten. Die Dichte der zu untersuchenden Struktur wird dann für alle drei Proben bzw. Richtungen bestimmt. Sollten für alle drei Proben ähnliche Ergebnisse der Strukturichte resultieren, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sich die Struktur isotrop verhält. Liegt die Struktur in einer der drei Richtungen besonders dicht vor, dann ist die Struktur eher anisotrop.

Im folgenden soll auf die Ergebnisse für die drei experimentellen Modelle und die drei Lungenkarzinome näher eingegangen werden.

### **5.1.1 Anisotrope Modelle: Anisotropes homogenes Plastikblock-Modell und anisotropes heterogenes Nudel-Agar-Modell**

Das anisotrope Plastikblock-Modell und Nudel-Agar Modell unterscheiden sich hinsichtlich der Verteilung ihrer Strukturen. Die anisotropen Bohrlöcher sind homogen im Plastikblock verteilt, die anisotropen Nudeln im Agarblock dagegen heterogen. Daher wurden repräsentative Proben aus diesen beiden Modellen auf unterschiedlichem Wege hergestellt. Das anisotrope, homogene Plastikblock-Modell konnte einfach in drei Teile eingeteilt werden, um drei repräsentative Proben zu erhalten. Das heterogene anisotrope Nudel-Agar Modell dagegen musste erst in parallele Scheiben geschnitten werden, die dann so in drei Stapeln neu angeordnet wurden, dass drei repräsentative Proben entstehen konnten (Details siehe Punkt 3.2.1.2).

Die jeweils drei repräsentativen Proben der zwei anisotropen Modelle sind in drei unterschiedliche Richtungen (x-, y- und z-Richtung) nach einem SURS Prinzip aufgeschnitten worden.

Bei den Schneidprozessen musste stets auf eine ausreichende Dicke der Scheiben geachtet werden, da beispielsweise jeder Schneide- bzw. Sägeprozess am Plastikblock-Modell zu einer Materialeinbuße von 1mm führte. Zudem musste die Oberflächenbeschaffenheit der Scheiben beachtet werden, um Unregelmäßigkeiten und andere Artefakte zu vermeiden. Diese Veränderungen sind dann nämlich an den Rändern der einzelnen Scheiben der zusammengesetzten Schnitte wieder zu finden und für eine Auswertung unbrauchbar. (Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Modellen ist eine Elimination der Randbereiche nicht nötig gewesen, da die Kanten klar abgegrenzt waren und die Profile eindeutig identifiziert werden konnten.)

## Diskussion

Die Profildichte der Bohrlöcher bzw. der Nudeln ist dann für jede Probe ermittelt worden. Das anisotrope homogene Plastikblockmodell und das anisotrope heterogene Nudel-Agar Modell zeigten in einer Schnittrichtung im Gegensatz zu den anderen beiden Richtungen eine höhere Profildichte. Für das Plastikblock-Modell ergab sich eine 40 bzw. 53 mal, für das Nudel-Agar Modell eine 5 bzw. 11 mal höhere Profildichte für eine Richtung im Gegensatz zu den anderen beiden Richtungen. Bei beiden Modellen wiesen die beiden anderen Richtungen Ergebnisse nahe des Nullwerts auf. Die Strukturdichte dominiert also in einer Richtung und weist darauf hin, dass der Strukturverlauf einer Hauptrichtung folgt, sich die Struktur (Bohrlöcher und Nudeln) also anisotrop verhält.

Die Ergebnisse des anisotropen Nudel-Agar Modells beziehen sowohl die Richtung als auch die Form der Strukturen mit ein. Die Nudeln weisen im Gegensatz zu den Bohrlöchern des Plastik-Block Modells kleine Wellen auf und weichen in ihrer parallelen Ausrichtung geringgradig voneinander ab. Es entstehen somit mehr Anschnittstellen der Nudeln bzw. Profile als wenn die Nudeln gerade und rechtwinklig zur Scheibenschnittebene verlaufen und parallel zueinander ausgerichtet wären. Daher weichen die zwei niedrigeren Profildichtenergebnisse (0,04 Nudeln/cm<sup>2</sup>; 0,09 Nudeln/cm<sup>2</sup>) geringgradig vom Nullwert ab. Die Kriterien, für das Erreichen des Nullwertes in zwei Richtungen, müsste daher das anisotrope Plastikblockmodell erfüllen, was jedoch nicht der Fall ist, da bei der Auswertung der Bohrlochprofile kein Zählrahmen verwendet worden ist. Die zwei niedrigeren Ergebnisse für das Plastikblockmodell (0,087 Bohrlöcher/cm<sup>2</sup>, 0,117 Bohrlöcher/cm<sup>2</sup>) liegen daher nahe am Nullwert. In biologischem Material wird es kaum Strukturen geben, die sich wie die Bohrlöcher im Plastikblock verhalten, so dass stets Dichtenwerte zu erwarten sind, die über dem Nullwert liegen. Wie hoch die Abweichung vom Nullwert ist, hängt von der Form und dem Richtungsverlauf (zur Schnittebene) der Struktur ab.

Die in dieser Studie verwendeten anisotropen Modelle sind derart in repräsentative Proben (Scheiben bzw. Stücke) geschnitten worden, dass die Strukturen (Löcher des Plastikblocks, Nudeln des Agarblocks) fast rechtwinklig zur Schnittebene verliefen. Innerhalb biologischer Gewebe ist dies nicht bestimmbar, da zum einen die Lokalisation der Strukturen und zum anderen deren Lage zur Schnittebene unbekannt ist. Da sich die Lage der anisotropen Strukturen zur Schnittebene auf die Dichtenergebnisse auswirken kann, wird dies im folgenden diskutiert. (Die Lage isotroper Strukturen zur Schnittebene wirkt sich nicht auf die Dichtenergebnisse aus.)

Weder ein senkrechter noch ein paralleler Verlauf der anisotropen Strukturen zur Scheibenschnittebene wirkt sich auf die drei Endergebnisse der Profildichten (x-, y- und z-

Richtung) aus. Folglich liegen die Winkel, die sich auf die Dichtenergebnisse auswirken, zwischen dem 0° und 90° Winkel. Aufgrund der Dreidimensionalität des zu untersuchenden Objekts bzw. Gewebes können drei Winkel die Ergebnisse der Profildichten beeinflussen. Es handelt sich dabei um die Winkel in den drei verschiedenen Ebenen, der x-y, y-z und der x-z Ebene. Je höher der Einfluss der drei Winkel ist, desto kleiner wird der Unterschied zwischen den drei Dichtenwerten der x-, y- und z-Richtung. Der ungünstigste Fall läge daher vor, wenn alle drei Ebenen einen 45° Winkel zur anisotropen Struktur aufweisen würden. Dann nämlich lägen alle drei Ergebnisse der Dichtenbestimmung (x-, y-, z-Richtung) so eng beieinander, dass eher eine Isotropie interpretiert werden würde anstatt einer Anisotropie der Strukturen. Anhand dieses Winkelproblems wird deutlich, dass es nötig ist, mehrere Objekte bzw. Gewebe auf die Strukturrichtung hin zu analysieren.

### **5.1.2 Isotropes heterogenes Nudel-Agar-Modell**

Das isotrope heterogene Nudel-Agar-Modell hat für alle drei Schnittrichtungen (x-, y-, z-Richtung) ähnliche Profildichten (1,00; 0,50; 0,82 Nudelprofile/cm<sup>2</sup>) geliefert. Die höchste Profildichte ist im Gegensatz zu den anderen beiden Ergebnissen nur 1,2 bzw. 2 mal größer. Die Profildichte ist in allen drei Richtungen ungefähr gleichermaßen vorhanden, so dass geschlussfolgert werden kann, dass die Struktur nicht anisotrop verläuft. Die Interpretation dieses Ergebnisses wäre, dass sich die Struktur mit hoher Wahrscheinlichkeit eher isotrop als anisotrop verhält.

Die Resultate der drei Profildichten des isotropen Nudel-Agar Modells beziehen die unvorhersehbaren Richtungsverläufe der Nudeln mit ein. Es sind Knäule von Nudeln in das flüssige Agarmedium gegeben worden, die bei der Aushärtung an ihrem Platz fixiert wurden. Es ist weder bekannt noch sichtbar gewesen, wie viele Nudeln in welche Richtung verliefen, aber es bestand für jede Nudel die Möglichkeit, sich in jede Richtung auszubreiten. Die Profildichten der drei Richtungen sind aber nicht (wie im Idealfall) identisch gewesen. Der höchste Wert war um das Zweifache höher als der kleinste Wert. Der Unterschied zwischen den drei Profilverwerten des isotropen Nudel-Agar Modells und somit die Verteilung der Nudeln kann auf die Viskosität des Agars, die Erdanziehungskraft und die manuelle Bearbeitung des Knäuels zurückgeführt werden.

### **5.1.3 Untersuchung der Verlaufsrichtung (Isotropie/Anisotropie) tumoraler Blutgefäße**

Die drei experimentellen Lungenkarzinome haben jeweils für alle drei Schnittrichtungen ähnliche Profildichtenergebnisse geliefert (siehe Seite 87, Tabelle 3). Die höchste Gefäßprofildichte war im Gegensatz zu der niedrigsten beim ersten und zweiten Tumor um

## **Diskussion**

1,3, beim dritten Tumor um 1,5 mal größer. Die Resultate der drei Lungenkarzinome lagen alle nahe genug beieinander, um die hohe Wahrscheinlichkeit eines nicht anisotropen Charakters belegen zu können. Die Blutgefäße verlaufen daher eher isotrop.

Die Blutgefäßprofilrichtungen innerhalb der Lungentumore waren nicht identisch für alle drei Richtungen. Innerhalb biologischer insbesondere pathologisch veränderter Gewebe werden sich Strukturen, die von den unterschiedlichsten Faktoren beeinflusst werden, nicht perfekt einheitlich in alle Richtungen verteilen. Daher werden biologische Gewebe aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften keine perfekten isotropen und anisotropen Formen und Richtungsverläufe aufweisen und somit keine perfekten Profildichtenwerte für die drei untersuchten Richtungen x, y, z liefern können. Zusätzlich ist zu unterstreichen, dass die Profildichten mittels stereologischer Werkzeuge ermittelt werden und daher Schätzwerte darstellen.

## **5.2 Relevanz systematischer Fehler nicht stereologischen Ursprungs in der histologischen Probenaufbereitung**

### **5.2.1 Schrumpfung und Deformation der Gewebes**

Die Schrumpfung und Deformation eines Gewebes während des histologischen Bearbeitungsprozess kann sich auf die quantitative Analyse unterschiedlich stark auswirken. Dieser Aspekt bleibt bei den histologischen Auswertungsmethoden in der Literatur (mit Ausnahme der stereologischen Methoden) jedoch oft unbeachtet. Insbesondere bei Vergleichsstudien ist es wichtig, die Gewebearbeitung zu standardisieren, um reproduzierbare Resultate zu erhalten. Ein in Paraffin eingebettetes und mittels Gefriertechnik fixiertes Gewebe von der gleichen Art wird beispielsweise bei einer Dichtenanalyse der gleichen Struktur keine vergleichbaren Ergebnisse liefern. Dies liegt daran, dass die Gewebeschrumpfung in Paraffin, die hauptsächlich auf der Hitzeeinwirkung beruht [72, 75], größer ist als bei der Gefriertechnik und somit höhere Dichtenwerte der Struktur liefern würde. Wird jedoch der Schrumpfungsfaktor der Gewebe bei der Berechnung berücksichtigt, werden die Resultate miteinander vergleichbarer. Es ist jedoch nicht nur das Einbettmedium, das die histologischen Schnitte und die Vergleichbarkeit bestimmt, sondern auch die technische Bearbeitung der Schnitte. Während sich Paraffinschnitte durch die Gewebeeinfiltration mit Paraffin beim Schneideprozess stabil verhalten und relativ glatt auf den Objektträger aufgezogen werden können, erfordern die empfindlicheren Gefrierschnitten mehr Vorsicht vor Gewebedeformationen durch physikalische Druckeinwirkungen und Faltenbildungen bei dem Aufziehen auf den Objektträger. Wenn sich der Gefrierschnitt erstmal auf dem Objektträger fest angehaftet hat, sind Faltenbildungen und ähnliche

Artefakte nicht mehr zu korrigieren. Der Gewebeschnitt kann sich daher nicht mehr in x- oder y- Richtung verändern [26, 100]. Die Schrumpfung in z-Richtung (Schnitthöhe) ist aber durch Dehydrierungsprozesse noch möglich, da nur die unteren Gewebe- bzw. Zellanteile direkt mit der Glasplatte verbunden sind. Die Schrumpfung in z-Richtung kann durch ein spezielles dehydrierungsverhinderndes Verfahren vermieden werden (Details siehe [100]).

In der vorliegenden Arbeit wurden Kryostatschnitte verwendet, deren Qualität überprüft wurde. Hierfür wurde zum einen der Vorschub des Kryostats mittels geeichter Messuhr überprüft, der für die Schnittdicke verantwortlich ist. (Diese Untersuchung wurde aus technischen Gründen ohne Gewebe- bzw. Schneidmaterial durchgeführt.) Der konstante Abstand zwischen den einzelnen Schnitten und somit auch die Schnittdicke ist bedeutsam für quantitative, histologische Methoden wie beispielsweise die stereologische Volumenbestimmung. Zum anderen wurde der Einfluss des Schneide- und Färbeprozess auf die Gefrierschnitte überprüft. Die dabei ermittelte Schrumpfung in x- und y-Richtung der Kryostatschnitte beruhte dabei eher auf Deformationen, die durch technische und physikalische Einflüsse hervorgerufen wurden. In dieser Arbeit wurde ein, im Einbettmedium tiefgefrorener experimenteller Brusttumor in den Kryostat eingespannt und die Schrumpfung bzw. Deformation des Schneide- und Färbeschritts untersucht.

### **5.2.1.1 Kalibrierung des Kryostats mittels einer Messuhr**

Bei der Anfertigung eines histologischen Schnittes wird der Gewebeblock im Mikrotom zunächst um eine bestimmte Strecke vorgeschoben (block advance), so dass die Schneideklinge im rechten Winkel zur Blockfläche die Gewebeprobe um die eingestellte Dicke des Schnittes reduziert. Um die Eingabe der gewünschten Schnittdicke mit dem tatsächlichen Gewebevorschub zu überprüfen, muss das Mikrotom kalibriert werden. Hierfür gibt es verschiedene Vorgehensweisen. Bei der Methode von Dorph-Petersen et al. [73] wird eine große Anzahl von Schnitten angefertigt und die Gefrierblockhöhe vor und nach dem Schneideprozess ausgemessen. Zunächst wird die Differenz aus der Blockhöhe vor und nach dem Schneideprozess errechnet und dann durch die Schnittanzahl dividiert, um den durchschnittlichen „block advance“ zu ermitteln. Diese Methode erwies sich für die vorliegende Arbeit als nicht praktikabel, da sie zum einen in einem platzlimitierten Mikrotom statt fand und sich zum anderen der tiefgefrorene Gewebeblock nicht genau ausmessen ließ. Selbst mit vorgekühlten Messinstrumenten kam es zu (wenn auch nur geringen) Schmelzprozessen am Gewebeblock. Unter Vermeidung der Berührung zwischen Messinstrument und Gewebeblock kam es trotz mehrfacher Ausmessungen nur selten zu reproduzierbaren Ergebnissen, so dass von dieser Methode für Kryostatschnitte Abstand genommen wurde.

## Diskussion

Eine andere Methode besteht laut Dorph-Petersen et al. [73] darin, eine große Anzahl von Schnitten anzufertigen und diese Anzahl dann durch die Vorschubstrecke des Kryostats zu teilen. Das in dieser Arbeit verwendete Gefrierschnittgerät bietet jedoch nicht die Möglichkeit, ein Messinstrument, das die Vorschubstrecke misst, zeitgleich mit einer Gefrierprobe einzuspannen. Daher wurde in dieser Arbeit der Vorschub des Gerätearms ohne Gewebeprobe bestimmt. Es wurde anstelle eines Gewebeblocks eine geeichte Messuhr, die die Vorschubstrecke genau bemessen konnte, am sich bewegenden Gerätearm befestigt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die ideale, errechnete Gerätevorschubstrecke bei den fünf durchgeführten Messungen (nach 100, 200, 300, 400 und 500 Schnitten) stets über den, mittels geeichter Messuhr bestimmten, Vorschubwegen des Kryostats lag. Dies bedeutet beispielsweise für die stereologische Berechnung des Volumens mittels Cavalieri Methode, dass das in die Formel einfließende, errechnete Intervall zwischen den Schnitten höher ist als der tatsächliche Abstand zwischen den Schnitten. (Das Intervall errechnet sich durch die Multiplikation der Schnittdicke mit der Schnittanzahl.) Es werden somit mehr Schnitte benötigt, um den Tumor komplett aufzuschneiden als im Idealfall. Es kommt dadurch zu einer Volumenüberschätzung. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kryostat liegt die mittlere Verkürzung der fünf ermittelten Strecken bei 0,57%. Bei beispielsweise 500 Schnittbewegungen lag eine Verkürzung der Strecke um 0,48% vor. Das bedeutet, dass bei 500 Schnitten, die jeweils eine Dicke von 5  $\mu\text{m}$  aufweisen, ca. zwei Schnitte zuviel angefertigt worden sind. Aufgrund der Größe der Tumore in dieser Studie werden sich zwei Schnitte bzw. 10  $\mu\text{m}$  kaum auf die stereologischen Endergebnisse auswirken, wie beispielsweise bei den Volumenschätzungen der Pankreastumore, so dass diese minimale Abweichung vernachlässigbar ist. Nach 200, 300 und 400 Schnittbewegungen konnte ebenfalls nur eine geringe Verkürzung ( $<0,5\%$ ) beobachtet werden. Nach 100 Schnittbewegungen lag eine Verkürzung der Strecke um 1,4% vor, aber selbst dieser Wert würde sich nicht merklich auf die stereologischen Ergebnisse bzw. Volumenschätzungen dieser Studie auswirken. Die mittlere Verkürzung der Strecken auf 99,43% befinden sich laut Techniker des Geräteherstellers im Toleranzbereich, da der Fehler des Kryostatvorschubs deutlich unter 1% liegt. Die Einstellung des Gerätes liegt somit im sehr guten Bereich und wirkt sich nicht auf die stereologischen Schätzwerte dieser Studie aus.

Die fünf Strecken (nach 100, 200, 300, 400 und 500 Schnitten) sind mittels Messuhr einmal ermittelt worden ( $n=1$ ). Wiederholte Messungen sind im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt worden, da zum einen die Vorbereitungen für die Messungen und die Messungen selbst von einem Fachmann der Gerätefirma durchgeführt worden sind. Zum

anderen war die weitere Untersuchung der Kalibrierung des Kryostats nicht Bestandteil dieser Arbeit.

#### **5.2.1.2 Bemessung der Fläche des Tumorschnitts vor und nach dem Schneide- und Färbeprozess**

Die Qualität der Kryostatschnitte hängt insbesondere von dem Schneideprozess und der technischen Anfertigung ab. Diese Faktoren beeinflussen die Deformation des Gefrierschnitts wie beispielsweise Stauchungen oder Faltenbildungen. Diese Veränderungen der Fläche des Schnitts werden als Schrumpfung in x- und y- Richtung bezeichnet. Diese Schrumpfung ist in dieser Arbeit anhand eines experimentellen Brustkarzinoms untersucht worden, indem die Gewebefläche vor und nach dem Schneideprozess ausgemessen wurde. Der auf dem Objektträger aufgezoogene Gefrierschnitt ist durch anschließende, histologische Bearbeitungsprozesse weiteren Deformations- und Schrumpfungsfaktoren ausgesetzt. Ob sich ein Färbeprozess auf die Schnittfläche (x- und y- Richtung) ausgewirkt, wurde in einer weiteren Untersuchung anhand der Schnitte der Brustkarzinome gezeigt. Die Schrumpfung der Gefrierschnittshöhe (z-Achse) wurde nicht analysiert, da diese für die stereologischen Methoden, die in dieser Arbeit verwendet worden sind, nicht bedeutsam ist. Für die stereologische Volumenbestimmung, die mit den neuroendokrinen Pankreastumoren (NET Zelllinie BON) durchgeführt wurde, muss die Höhe (z-Achse) des Schnitts nicht bekannt sein, da die originale, am Gerät eingestellte Schnittdicke und das Intervall zwischen den Schnitten bekannt ist.

Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Schrumpfung des Gewebeschnittes (x- und y- Richtung) um durchschnittlich 7,32% (n=5) kam, wenn die Gewebeoberfläche auf dem angeschnittenen Gefrierprobenblock mit der Fläche des auf den Objektträger befindlichen Tumorschnitts verglichen wurde. Die einzelnen Schrumpfungsfaktoren der fünf Schnitte lagen zwischen 1,89% und 11,56%. Diese Variationsbreite deutet darauf hin, dass die so genannte Schrumpfung der Schnitte eher von der technischen Anfertigung als beispielsweise von umgebungsbedingten Dehydratisierungsprozessen abhängt.

Als Ursache für die ermittelten Schrumpfungswerte der Gefrierschnittfläche kommen neben den Kompressionskräften, die entstehen, wenn die Schneideklinge auf den Gewebblock trifft, noch weitere technische Faktoren hinzu. Die glatte Gewebeoberfläche des dicken Probenblocks kann bei der Anfertigung eines 5 µm dünnen Schnittes nicht beibehalten werden. Der dünne Schnitt zieht sich zusammen und Wellen oder Fältelungen entstehen, die u. a. auch von der Umgebungstemperatur und Gewebebeschaffenheit abhängig sein können. Eine gewisse Streckung bzw. Glättung des Schnittes kann zwar durch den Einsatz

## Diskussion

eines Schnittstreckers oder eines Pinsels erreicht werden, ist jedoch aufgrund der Empfindlichkeit des Kryostatschnitts gegenüber Zerreißen nur begrenzt möglich. Die Zerreißungsgefahr des Schnittes hängt nicht nur von der Dicke, sondern auch von dem Gewebematerial ab. Stark nekrotische Tumore (z. B. die Pankreastumore (NET-Zelllinie BON)) sind im Gegensatz zu Tumoren mit intaktem Gewebe (z. B. die Mammakarzinome (MDA-MB Zelllinie)) schwieriger zu schneiden und zu glätten und zerreißen leichter. Es ist daher möglich, dass dieser technische Schritt für empfindlichere Gewebe (z. B. Nekrosen) einen höheren Deformations- bzw. Schrumpfungsfaktor birgt und stärker zur Reduktion der Gesamtfläche des Schnitts beitragen würde. Einen weiteren Deformationspunkt stellt das Aufziehen des Kryostatschnitts auf den Objektträger dar. Es werden dadurch nicht nur die Deformationen des Schnitts fixiert, sondern es kann beim Aufziehprozess zu weiteren Fältelungen kommen. Die Lage und Veränderung des Schnittes hängt von den Adhäsionskräften zwischen Schnitt und Objektträger ab und wie sie im Winkel aufeinander treffen. Je steiler der Winkel desto eher kann es zu einem Zusammenziehen des Schnittes kommen. Eine Korrektur ist nicht mehr möglich, sobald sich der Schnitt auf dem Objektträger befindet. Die Schnittdeformationen tragen daher zu einer Reduktion der Gesamtfläche bei, die unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Die technische Erfahrung kann die genannten Faktoren reduzieren.

In dieser Arbeit wurde zusätzlich noch der Einfluss des Färbeprozesses auf die Gewebeschnitte der Brustkarzinome überprüft. Die durchschnittliche Schrumpfung, die eintreten kann, wenn der Schnitt fixiert und gefärbt wird, liegt bei den fünf untersuchten Schnitten durchschnittlich bei 2,33% und ist somit geringer als die, die zwischen dem Gewebeblock und dem Nativschnitt ermittelt wurden. Die Schrumpfungsfaktoren der einzelnen Schnitte bewegen sich jedoch zwischen -1,56 und 6,83 Prozent, so dass sich die fünf Werte stark voneinander unterscheiden und daher kritisch zu beleuchten sind. Die größte Schrumpfung erfährt der Gefrierschnitt während der Dehydrierungsschritte der Lufttrocknung und der alkoholischen Einwirkung. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich der Schnitt jedoch schon auf dem Objektträger, so dass die Schrumpfung entlang der x- und y-Achse kaum möglich ist. Die Färbeschritte dürften sich also nicht auf die Gewebefläche (x-,y-Richtung) auswirken.

Die Variabilität der Schrumpfungswerte der einzelnen Schnitte hängt daher eher mit der Auswertungstechnik zusammen. Die fotografischen Abbildungen beinhalten einen kleinen Schatten der Hämalaun gefärbten Gewebe, der bei der Auszählung teilweise nicht eindeutig identifizierbar und somit nicht komplett ausgeschlossen werden konnte. Dies könnte die Erklärung für den einen negativen Schrumpfungswert sein (Schnittnummer 3) bei dem

Schattenteile mit einberechnet worden sind. Die Schnitte vier und fünf des Brusttumors weisen 4,3% und 6,8% Schrumpfung auf. Es ist möglich, dass in diesem Fall Gewebe als Schatten identifiziert worden ist. Es ist natürlich auch umgekehrt daran zu denken, dass der Nativschnitt nicht hinreichend auf dem grünen Untergrund abgrenzbar gewesen ist. Zusätzlich sind die Resultate der Zählgitterauszählung nach dem Cavalieri Prinzip weiterhin Schätzwerte, die geringgradig variieren dürfen.

Es ist anzumerken, dass die Cavalieri Zählmethode genauere Flächenergebnisse der Gewebeschnitte liefert als wenn die Flächen per Lineal ausgemessen und berechnet worden wären. Die Begründung liegt darin, dass die eigentliche Form des Schnittes bei der Cavalieri Methode berücksichtigt wird. Dies konnte in einer Studie bestätigt werden, deren Ergebnisse in dieser Arbeit nicht gezeigt worden sind.

### **5.2.2 Qualität der immunhistochemischen Färbung**

Neben der Gewebeschrumpfung und -deformation, wirkt sich auch die Qualität der histologischen Färbung eines Gewebes unterschiedlich stark auf die quantitative Analyse aus. Um zu vergleichbaren Ergebnissen der quantitativen Auswertungen zu gelangen, ist eine kritische Überprüfung des angewendeten Färbeprotokolls unter Berücksichtigung der Fragestellung und des zu untersuchenden Gewebes daher unumgänglich. Da alle histologischen FärbeprozEDUREN sowohl Vor- als auch Nachteile aufweisen, müssen diese vorsichtig gegeneinander abgewogen werden [101]. Neben der Wahl des Antikörpers und des Färbeprotokolls muss zusätzlich die Wahl des Einbettmediums, der Fixierlösung und die technischen Möglichkeiten der einzelnen Labore beachtet werden. Gefrierschnitte zeichnen sich im Gegensatz zu Paraffinschnitten beispielsweise durch den besseren Erhalt der Antigene im Gewebe aus, besitzen jedoch den Nachteil die Gewebemorphologie schlechter zu erhalten. Weiterhin ist die Art, Beschaffenheit und Zusammensetzung des zu analysierenden Gewebes zu berücksichtigen.

In dieser Studie ist der Endothelzellmarker CD31 für die Darstellung tumoraler Blutgefäße anhand von Gefrier- und Paraffinschnitten verwendet worden. Das Antigen CD31 ist auf der ganzen Endothelzelloberfläche nachzuweisen, jedoch nicht direkt im Zell-Zellkontaktbereich [102]. Der anti-CD31 Antikörper stellt mit gleich hoher Intensität sowohl kleine als auch große Blutgefäße in normalen und tumoralen Geweben dar [103, 104]. Der Nachteil, den der spezifische Endothelzellmarker mit sich bringt, ist die unspezifische Anfärbung von Entzündungszellen, die anhand ihrer Morphologie aber leicht von Endothelien differenziert werden können [54].

## Diskussion

Trotz der selben Antikörperwahl können sich die Färbeergebnisse unterscheiden, da sich Faktoren wie z. B. die Verdünnung der Antikörper, die Art der Gewebefixierung, der Einbettung, des Waschpuffers und gegebenenfalls der Antigen-Demaskierung auf die Resultate auswirken können. Zusätzlich ist die Wahl des Antikörpers auch eine Frage der Verfügbarkeit. Nicht alle Antikörper sind für alle Spezies gleichermaßen kommerziell erhältlich. Zudem ist es möglich, dass ein Antikörper für eine Spezies oder ein Organ erfolgreich eingesetzt worden ist, dieser Antikörper jedoch für eine andere Spezies bzw. ein anderes Gewebe nicht die gleiche Qualität erzielt. Kuzu et al. [103] stellten beispielsweise fest, dass bei der Blutgefäßfärbung mittels anti-CD31 Antikörper von den Sinusoiden der Leber und der Milz im Gegensatz zu allen anderen Organen schwächere Anfärbeintensitäten zu beobachten waren.

In dieser Arbeit wurden zum einen Paraffinschnitte von in Zinklösung fixierten Lungenkarzinomen untersucht. Die Antigendemaskierung wurde mit Trypsin durchgeführt, was im Endergebnis zu einer kräftigen Färbung CD31 positiver endothelialer Strukturen führte. Zum anderen wurden Gefrierschnitte von verschiedenen Tumortypen erfolgreich mittels direkter und indirekter Methode gefärbt. Da sich die Blutgefäße innerhalb der intakten Tumorbereiche befanden, blieb deren Morphologie trotz der Gefrierschnitttechnik gut erhalten.

Bei der histologischen Quantifizierung von immunhistochemisch gefärbten tumoralen Blutgefäßen müssen weitere Kriterien berücksichtigt werden. Zum einen sagt ein immunhistochemisch gefärbtes tumorales Gefäß eines histologischen Schnittes nichts darüber aus, ob dieses Gefäß auch tatsächlich am Blutfluss beteiligt gewesen ist [22]. Zum anderen zeigten Kuzu et al. [103] mittels monoklonaler Antikörper in ihrer Studie die Verteilung des von Willebrand Faktors, von CD31, CD34 und CD36 in normalen und tumoralen humanen vaskulären Geweben. Sie konnten eine antigenetische Heterogenität im vaskulären Endothel feststellen. Tumore exprimieren unreguliert verschiedenste Substanzen und somit auch die der Endothelzellmarkierung dienenden Antigene. Die farblich dargestellten Gefäße müssen daher nicht der tatsächlichen Anzahl entsprechen. Diese Problematik kann anhand von Studien über die Mosaikstruktur von tumoralen Blutgefäßen verdeutlicht werden. Chang et al. [105] untersuchten in einer Studie die Immunreaktivität von Endothelzellen der Blutgefäße von Xenografts humaner Kolonkarzinome u. a. gegenüber dem Endothelzellmarker PECAM-1 (CD31). Sie konnten für ca. 4% der totalen vaskulären Oberfläche der Karzinome keine Immunreaktivität für den Endothelzellmarker CD31 beobachten. Diese negative Reaktion erklärten Chang et al. durch Tumorzellen, die sich partiell anstelle der Endothelzellen im Gefäßlumen befanden. Diese sogenannte

Mosaikstruktur der Blutgefäße ist auf die Abtragung oder unzureichende Proliferation der Endothelzellen oder Migration der Tumorzellen zurückzuführen. Tumorzellen könnten jedoch auch in die Blutgefäßwand eingewandert sein und Endothelzellen verdrängt haben. Chang et al. hielten es auch für möglich, dass Endothelzellen den gebräuchlichen Endothelzellmarker CD31 nicht hinreichend exprimieren könnten [105].

Es ist also möglich, dass in dieser Arbeit aufgrund der abnormalen Bedingungen innerhalb eines Tumors mittels immunhistochemischer Färbung einige Endothelzellen nicht entdeckt und somit nicht quantifiziert wurden.

### **5.3 Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge und deren Übereinstimmung**

#### **5.3.1 Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner**

Die Blutgefässdichtenbestimmung nach der MVD Methode nach Weidner beinhaltet den bzw. die am stärksten durchbluteten Bereiche (hot spots) des Tumors anhand eines histologischen Schnittes, der repräsentativ für den gesamten Tumor erscheinen soll, herauszusuchen und auszuzählen. Die microvessel density reflektiert somit die höchste Blutgefäßprofildichte für den Tumor.

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der MVD nach Weidner wurden anhand elf experimenteller Tumore zwei modifizierte Auswertungsmethoden (W3mean und W3max) nach Weidner verwendet. Zum einen wurde der Mittelwert (W3mean) und zum anderen der Maximalwert (W3max) aus drei hot spots eines histologischen Tumorschnitts zweimal ermittelt. Es wurde festgestellt, dass weder die wiederholte Auswertung der W3max noch der W3mean Werte eine Übereinstimmung von 100% besaß. Der Mittelwert (der Differenzen) der lg W3max Resultate wich jedoch mit 94,62% weniger vom 100% Wert ab als der lg W3mean Wert mit 112,5%. Die lg W3max Werte stimmten somit durchschnittlich in höherem Maße überein als die lg W3mean Werte. Der Schwankungsbereich von den lg W3max Resultaten erwies sich jedoch im Gegensatz zu den lg W3mean Werten als gering gradig höher. Dies demonstriert die Schwankungsbreite (Grenzen der Übereinstimmung), die für die lg W3max Werte zwischen 69,2% und 144,5%, für die lg W3mean Ergebnisse zwischen 69,7% und 143,5% lag. Bei beiden Methoden sind die Schwankungsbereiche aber sehr hoch, da die Werte stark variieren.

## Diskussion

Die Übereinstimmung der  $W3_{max}$  (Maximalwert aus drei hot spots) ist im Gegensatz zu den  $W3_{mean}$  (Mittelwert aus drei hot spots) Werten durchschnittlich höher. Dies könnte daran liegen, dass bei wiederholter hotspot Auswahl innerhalb des selben Schnittes die Wahrscheinlichkeit einen gleichen (oder ähnlichen) hot spot aus drei möglichen hotspots wieder auszuwählen größer gewesen ist, als drei gleiche hot spots. Die geringere Schwankungsbreite der  $W3_{mean}$  Werte im Gegensatz zu den  $W3_{max}$  Werten ist damit zu begründen, dass der Mittelwert aus drei Ergebnissen stets dem wahren Wert näher kommt als ein einzelner Wert.

Ein weiteres Ergebnis dieser hot spot Untersuchung ist, dass der erste gewählte hotspot nicht immer der mit der höchsten Blutgefäßsdichte war. In sechs von elf Fällen enthielten der zweite oder der dritte hotspot höhere MVD-Werte als der erste. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es weitere Regionen innerhalb des Schnittes mit höherer MVD geben könnte. Die Möglichkeiten, die die Auswahl des hot spots und des Gesichtsfelds innerhalb des hot spots beeinflussen könnten, sollen im folgenden erläutert werden.

Ein in höchstem Maße angefärbter Bereich vermittelt den Eindruck einer besonders hohen Vaskularisation, jedoch muss das nicht mit der höchsten Blutgefäßsdichte einhergehen. Eine erhöhte Gefäßfärbung kann z. B. durch intensivere Farbgebung in bestimmten Gewebebereichen vorgetäuscht werden. Längs angeschnittene, durchgehende Blutgefäße weisen ebenfalls eine hohe Anfärbung von Endothelzellen bzw. -haufen auf. Hierbei ist hervorzuheben, dass die Blutgefäßprofilanzahl eines längs angeschnittenen Blutgefäßes im Gegensatz zu mehreren quer angeschnittenen Regionen dieses Gefäßes kleiner ist. Eine weitere Schwierigkeit stellen unterschiedliche Tumortypen mit unterschiedlich starker Vaskularisation dar. Wenn beispielsweise die Gefäßverteilung eines Tumorgewebeschnitts weitestgehend homogen in Erscheinung tritt, so sind die hot spot Regionen kaum voneinander abgrenzbar. Dieser Aspekt kam in dieser Arbeit bei der Untersuchung der Schnitte der sechs stark vaskularisierten Mammakarzinome zum Tragen, die sich im Gegensatz zu den anderen Tumortypen durch eine scheinbar homogenere Blutgefäßverteilung auszeichneten. Die Auswahl eines hot spots innerhalb eines stark vaskularisierten Tumors stellte sich im Gegensatz zu einem schwach vaskularisierten (Lungen-, Prostatakarzinom) schwieriger dar, da sich die hot spots optisch schwieriger erfassen ließen. Dies führte dazu, dass je höher die durchschnittlichen MVD-Werte waren desto variabler waren auch die erhobenen (wiederholten) Einzelergebnisse für den betreffenden Tumor.

Ein weiterer zu beachtender Aspekt bei der hot spot Auszählung stellt die methodische Vorgehensweise dar. Im ersten Schritt wird der hot spot in einer geringen Vergrößerung identifiziert und anschließend in einer 200fachen Vergrößerung ausgezählt. Das MVD-Endergebnis hängt somit davon ab, in welchem Bereich der Untersucher innerhalb des heterogenen hot spots ausgezählt hat. Die Auswahl des gleichen hotspots muss somit nicht automatisch zum selben Ergebnis führen, da es sehr unwahrscheinlich ist, die gleiche Region innerhalb des hotspots zu analysieren. Die Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner wird neben der subjektiven Auswahl des hot spots auch durch die subjektive Auswahl der Region innerhalb des hot spots beeinträchtigt.

In der Literatur wird die Problematik der hot spot Auswahl ebenfalls beschrieben. Axelsson et al. führten eine Studie durch, bei der zwei voneinander unabhängige Untersucher innerhalb eines Tumorschnittes den am repräsentativsten erscheinenden hot spot auswählen und auszählen sollten [31]. Anschließend sollten zwei weitere hot spots im Schnitt gesucht und ausgezählt werden. Bei beiden Untersuchern stellte der erste hot spot zu 37% bzw. zu 45% nicht den mit der höchsten Blutgefäßszählung dar. Die Ursache dieser Resultate liegt laut Axelsson et al. in der Heterogenität des Tumorgewebes bzw. des Gewebeschnitts. Hansen et al. [106] beschäftigten sich ebenfalls mit der hot spot Auswahl und stellten fest, dass die Auszählung innerhalb vordefinierter mikroskopischer Auswertungsfelder geringer variierte als die Auswahl des hot spots selbst. Hansen et al. begründeten ihre Beobachtungen damit, dass oft mehrere hot spots innerhalb eines Tumorschnittes zu finden sind oder die Gefäße relativ homogen verteilt liegen, so dass es schwer ist, hot spots zu identifizieren. Vermeulen et al. [62] untersuchten in ihrer Studie den Einfluss der Erfahrung des Untersuchers auf die hot spot Auswahl. Sie stellten fest, dass die hot spot Auswahl bei Untersuchern mit weniger Erfahrung stärker variierte als bei erfahrenen Untersuchern. Die Ergebnisse der Auszählung eines vordefinierten hot spots hingegen variierten zwischen den einzelnen Untersuchern weniger.

Es ist festzuhalten, dass auch wenn sich die Zählung innerhalb eines definierten hot spots reproduzieren lässt, die Auswahl des hot spots eine stark subjektiv geprägte Variable bleibt, die bei der Methode nach Weidner nicht ausgeschlossen werden kann. Die in dieser Arbeit untersuchte Reproduzierbarkeit der MVD nach Weidner anhand elf experimenteller Tumore hat gezeigt, dass die subjektive Auswahl des hot spots und der auszuzählenden Region innerhalb des hot spots die Reproduzierbarkeit der Methode stark beeinflussen.

Aufgrund der 200fachen Vergrößerungsvorgabe laut der Methode nach Weidner konnten bei den schwach vaskularisierten Lungen- und Prostatakarzinomen die hot spot Regionen

## Diskussion

leichter identifiziert und ausgezählt werden als bei den stärker durchbluteten Brustkarzinomen. Daher wurde für jede Tumorauswertung das mikroskopische Bild auf einen Bildschirm übertragen, um jede gezählte Struktur mit Hilfe des stereologischen Programms zu markieren, um eine Unter- und Überschätzung zu vermeiden. Vermeulen et al [62] behelfen sich ebenfalls mithilfe eines Gitterokulars, um die Zählprozedur zu erleichtern, indem sie Feld für Feld ausgezählt haben.

Die MVD-Auswertung in dieser Arbeit wurde nicht in einer anderen Vergrößerung als 200x durchgeführt, da Weidner einige Studien [27], die keine positive Korrelation zwischen Prognose und der MVD finden konnten, aufgrund der Unterschreitung des mikroskopischen Feldes von 0,74 mm<sup>2</sup> kritisierte. In der vorliegenden Arbeit ist das von Weidner vorgegebene Feld nicht unterschritten worden, indem eine Feldgröße pro hot spot von 0,88 mm<sup>2</sup> analysiert worden ist. Obwohl Vermeulen et al. [62] in ihrer Studie keine Beeinträchtigung für die prognostische Aussage bei verschiedenen Gesichtsfeldgrößen feststellten, beurteilten sie eine höhere Vergrößerung aufgrund der größeren Detailerkennung als vorteilhafter. Eine geringe Vergrößerung würde laut Vermeulen et al. stets mit Informationsverlust einhergehen.

Die von Weidner vorgegebene mikroskopische Feldgröße bzw. Vergrößerung ist also kritisch zu betrachten, da der Detailverlust oder die Unübersichtlichkeit sich auf die Endergebnisse auswirken können.

Bei der Methode nach Weidner fließt neben der hot spot- und Gesichtsfeldauswahl auch noch die subjektive Auswahl des Schnittes in das MVD Ergebnis mit ein. Es wird nämlich nur ein einziger Schnitt des heterogenen Tumors ausgewählt und die Wahrscheinlichkeit, dass genau auf diesem Schnitt die höchste MVD anzutreffen ist, erscheint gering. Dieser Aspekt kann durch die erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit untermauert werden. Die Auszählung eines einzelnen hot spots von drei verschiedenen Schnitten, die alle für den Tumor repräsentativ erschienen, zeigte eine hohe Variationsbreite. Die Heterogenität des gesamten Tumorgewebes wirkte sich auf die Ergebnisse aus.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die drei hot spots, die von drei unterschiedlichen Schnitten eines Tumors ermittelt wurden, keine 100%ige Übereinstimmung aufwiesen. Der Mittelwert (der Differenzen) der jeweils drei (logarithmierten) Werte pro Tumor entsprach einem Prozentwert von 105,44%, wobei der Schwankungsbereich zwischen 38,1% und 262,4% lag. Die subjektive Schnittauswahl erhöht neben der hot spot- und Gesichtsfeldauswahl die Variabilität der Ergebnisse erheblich, so dass eine zuverlässige

Aussage über die Gefäßdichte innerhalb eines Tumors mittels Weidnersche Methode nicht mehr möglich erscheint.

### 5.3.2 Reproduzierbarkeit der Methode mittels stereologischer Werkzeuge

In dieser Arbeit wurde von elf experimentellen Tumoren die Blutgefäßprofildichte mittels stereologischer Werkzeuge quantifiziert. Bei dieser Blutgefäßdichtenbestimmung wurden im Gegensatz zur Methode nach Weidner mehrere Schnitte des jeweiligen Tumors, die nach einem einheitlichen, systematischen Zufallsprinzip ausgewählt worden sind, untersucht. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Blutgefäßprofildichte wurde das jeweilige Schnittset eines Tumors zweimal ausgewertet. Innerhalb eines jeden Schnitts des jeweiligen Tumorschnittsets wurden mehrere Gesichtsfelder analysiert. Diese Auswertungsfelder wurden ohne Einfluss des Untersuchers ausgewählt, da sie vom stereologischen Gerät vorgegeben worden sind. Das Gerät bewirkt eine zufällige, aber systematische Verteilung der Gesichtsfelder auf dem heterogenen Tumorgewebeschnitt. Bei der stereologischen Untersuchung erfolgt also weder eine subjektive Auswahl der Schnitte, noch eine subjektive Auswahl der auszuwertenden Gesichtsfelder.

Bei der wiederholten Auswertung der Schnitte ist es sehr unwahrscheinlich, dass die gleichen Gesichtsfelder wieder ausgewertet werden, da diese zufällig vom stereologischen System vorgegeben werden. Das Endergebnis der stereologischen Methode stellt aber einen Schätzwert der durchschnittlichen Blutgefäßprofildichte des Tumors dar, so dass die Übereinstimmung zweier Durchschnittswerte betrachtet wird.

Bei der Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode mittels stereologischer Werkzeuge fällt wie bei der Methode nach Weidner auf, dass je höher die Ergebnisse sind, diese desto eher variieren, wobei bei der Methode nach Weidner die Variation höher liegt als bei den stereologischen Werten. Dieser Punkt kann damit zusammenhängen, dass die stark durchbluteten Brusttumore zwar in ihrer Vaskularität homogener erschienen, jedoch mehr heterogene Blutgefäßprofilformen aufweisen konnten als die weniger durchbluteten Tumore. Ein längs angeschnittenes Profil kann beispielsweise größer sein als wenn es quer angeschnitten wäre, jedoch würden beide Profile nur als jeweils ein Ereignis gezählt werden.

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass keine vollständige (100%ige) Übereinstimmung der beiden wiederholten stereologischen Ergebnisse vorlag, aber der Mittelwert (der Differenzen) der (logarithmierten) stereologischen Resultate mit 102,09% nur gering vom 100% Wert abwich. Der Variations- bzw. Schwankungsbereich der stereologischen Ergebnisse liegt zwischen 74,6% und 134%. Die stereologisch bestimmten

## Diskussion

Blutgefäßprofil dichten weisen somit eine hohe Übereinstimmung bzw. Reproduzierbarkeit auf. Die geringe Abweichung der stereologischen Ergebnisse hängt damit zusammen, dass es sich um durchschnittliche Schätzwerte handelt, die kaum identische Ergebnisse liefern werden und daher in geringem Maße voneinander abweichen dürfen. Die stereologischen Werte variieren also minimal, sind reproduzierbar und daher aussagekräftig.

Stereologische Verfahren geben keine feste Vergrößerung vor. Vielmehr sollte die mikroskopische Vergrößerung stets auf die Bedürfnisse des Untersuchers eingestellt werden, so dass gewährleistet werden kann, dass alle Ereignisse sicher identifiziert und gezählt werden können. Die Vergrößerung wird stets bei der Berechnung der Endresultate berücksichtigt. Sowohl die Mammakarzinome als auch die anderen beiden Tumortypen (Lungen-, Prostatakarzinome) sind mit Hilfe stereologischer Werkzeuge in dieser Arbeit in einer 400fachen Vergrößerung ausgewertet worden, um jedes Profil sicher zu identifizieren und eine Übersichtlichkeit bei der Auswertung einzelner Gesichtsfelder zu gewähren.

Die Auswahl der Schnitte, die der Auswertung dienen, werden nach einem einheitlichen, systematischen, zufälligen Probenziehungsprozess gewählt, so dass der Untersucher auf die Wahl der Schnitte keinen Einfluss ausübt. Jedes Schnittset soll insgesamt eine repräsentative Probe des heterogenen Tumors darstellen. In dieser Studie sind basierend auf diesem speziellen Probenziehungsverfahren drei Schnittsets (in zwei Fällen nur zwei) pro Tumor zur Auswertung herangezogen worden, um den Einfluss auf die Ergebnisse zu untersuchen, wenn anstelle des gewählten Schnittsets ein anderes ausgewählt worden wäre. (Das bedeutet, wenn der Anfangsschnittpunkt innerhalb des ersten Intervalls ein anderer gewesen wäre.) Zusätzlich fließt in diese Auswertung wieder die Auswahl der Gesichtsfelder, die zu analysieren sind und vom Untersucher nicht beeinflusst werden können, mit ein. Es sind jeweils zwei Schnittsets pro Tumor zur Blutgefäßprofilbestimmung miteinander verglichen worden. Dabei konnte ein Mittelwert (der Differenzen) der (logarithmierten) Werte von 91,62% und eine Schwankungsbreite von 68,4% bis 146,2% festgestellt werden. Die durchschnittlichen, stereologischen Schätzwerte sind aufgrund des Probenziehungsverfahrens beständig. Zusätzlich wird die Heterogenität des biologischen Gewebes durch das Probenziehungsverfahren in der Stereologie berücksichtigt, so dass sich dieser Faktor nicht fehlerhaft auf die Endergebnisse auswirken kann.

### 5.3.3 Übereinstimmung der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge

Zur Überprüfung der Übereinstimmung der modifizierten Methoden nach Weidner (Maximalwert aus drei hot spots ( $W3_{max}$ ) und Mittelwerte aus drei hot spots ( $W3_{mean}$ ) und

der Methode mittels stereologischer Werkzeuge wurden zum einen die Ergebnisse der Reproduzierbarkeit beider Methoden miteinander verglichen. Zum anderen wurden jeweils die ersten Ergebnisse der jeweiligen Auswertungen herangezogen und mittels Bland Altman Analyse miteinander verglichen.

Die Blutgefäßprofildichte mittels stereologischer Werkzeuge weist im Gegensatz zur MVD Bestimmung nach der Methode nach Weidner eine höhere Reproduzierbarkeit auf. Dies konnte in dieser Arbeit erstens durch den Mittelwert (der Differenzen) der Weidnerschen (lg W3mean: 112,46%, lg W3max: 105,68%) und stereologischen Ergebnisse (102,09%) gezeigt werden. Zweitens variierten die stereologischen Ergebnisse (74,6% - 134%) geringer als die der beiden Weidnerschen Methoden (lg W3max : 69,2% - 144,5%; lg W3mean: 69,7% - 143,5%).

Die bessere Reproduzierbarkeit der stereologischen Ergebnisse gegenüber den Weidnerschen wird nochmals deutlich, wenn der Aspekt der Schnittauswahl beachtet wird. Bei der stereologischen Blutgefäßprofilanzählung von jeweils zwei unterschiedlichen Schnittsets konnte ein Mittelwert (der Differenzen) der (logarithmierten) Werte von 91,62% und eine Schwankungsbreite von 68,4% bis 146,2% festgestellt werden. Bei der hot spot Auszählung von jeweils drei Tumorschnitten konnte dagegen ein Mittelwert (der Differenzen) von 105,44% festgestellt werden, wobei der Schwankungsbereich zwischen 38,1% und 262,4% lag. Die stereologischen Resultate variierten deutlich geringer im Gegensatz zu der MVD Methode. Die durchschnittlichen, stereologischen Schätzwerte sind aufgrund des Probenziehungsverfahrens bzw. der Schnittauswahl beständiger als die subjektiv beeinflussten Höchstwerte nach Weidner, die anhand eines einzelnen Schnittes ermittelt werden.

Die stereologischen Werte variieren also in geringerem Maße als die Weidnerschen Resultate, sind reproduzierbarer, aussagekräftiger und den MVD Ergebnissen zu bevorzugen.

Die Weidnerschen Ergebnisse sollten die höchste Blutgefäßdichte für den Tumor wider spiegeln, die stereologischen Resultate hingegen den Durchschnittswert der Blutgefäßprofile des Tumors. Folglich müssten die nach Weidner erhobenen Resultate stets höher als die stereologischen Ergebnisse liegen. Dies konnte bei dem Methodenvergleich, der der Überprüfung der Übereinstimmung beider Methoden diente, jedoch nicht bestätigt werden. Die MVD Werte lagen teilweise unter den stereologisch ermittelten Blutgefäßprofilen. Der Mittelwert (der Differenzen) der Weidnerschen Resultate lg W3mean (Mittelwert aus drei hot

## Diskussion

spots) und der stereologischen Ergebnisse (I<sub>g</sub> Set1) ergab einen Wert von 0,008. Der Mittelwert der Differenzen der I<sub>g</sub> W3 max und I<sub>g</sub> Set1 Resultate ergab dagegen ein Resultat von 0,080. Die beiden Mittelwerte weisen zwar darauf hin, dass die Weidnerschen Resultate durchschnittlich höher als die stereologischen lagen, die Verschiebung zugunsten der Weidnerschen Resultate jedoch sehr gering ausfällt. Die Schwankungsbereiche lagen für die I<sub>g</sub> W3mean und I<sub>g</sub> Set 1 Werte zwischen 58,2% und 171,8%, für die I<sub>g</sub> W3max und I<sub>g</sub> Set 1 Ergebnisse zwischen 55,0% und 182,0%. Die Übereinstimmung der Methoden nach Weidner mit der stereologischen Methode scheint daher sehr gering zu sein. Dieses Ergebnis ist nach Betrachtung der Reproduzierbarkeit beider Methoden zum einen damit zu begründen, dass die Weidnerschen Resultate eine höhere Variabilität aufweisen als die stereologischen. Die Gründe liegen in der subjektiven Auswahl des Schnittes und des hot spots bei der Weidnerschen Methode. Zusätzlich führt die geringe Vergrößerung, in der ausgewertet wird, zum Detailverlust und somit zu einer Unterschätzung der MVD. Die W3max-Werte (Maximalwert aus drei hot spots) wichen stärker von den stereologisch erhobenen Daten ab, als die W3mean-Werte (Mittelwert aus drei hot spots). Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass stereologische Werte stets einen durchschnittlichen Schätzwert als Resultat abliefern und die W3max und W3mean Resultate zwar Höchstwerte der Blutgefäßdichte wider spiegeln sollen, aber der Mittelwert aus drei hot spots einem Durchschnittswert näher kommt als der Maximalwert aus drei hot spots.

Die Blutgefäße sind stets von einer Untersucherin (S. A. Müller) ausgezählt worden, so dass die Inter-Untersucher Diskrepanz ausgeschlossen werden kann.

Die von Subjektivität geprägte und sich auf eine bestimmte Stelle des heterogenen Tumors fokussierende Methode nach Weidner weist einen höheren Grad an Variabilitätsmöglichkeiten auf als die stark objektiv beeinflusste stereologisch angelehnte Methode. Infolgedessen sind die stereologischen Schätzwerte nicht nur objektiver und reproduzierbarer, sondern auch aussagekräftiger als die Ergebnisse nach Weidner.

Aufgrund der Reproduzierbarkeit sind im Rahmen dieser Arbeit stereologische Methoden zur Quantifizierung tumoraler Blutgefäße verwendet worden. Zusätzlich bieten stereologische Methoden im Gegensatz zu der Methode nach Weidner einen größeren Anwendungsbereich. Die MVD wird oft von Untersuchern fälschlicherweise für die Bestimmung des vaskulären Grades eines Tumors herangezogen, obwohl die MVD lediglich als prognostischer Faktor dienen soll [63]. Hlatky et al. diskutierten diese Problematik und hoben hervor, dass die MVD nicht für die Effizienz oder als Leitfaden einer antiangiogenen Therapie aussagekräftig sei. Sie verdeutlichten, dass sich die hot spot Methoden nur auf ein

kleines Anwendungsspektrum der Prognose hinsichtlich der Krankheitsstufe, der Metastasen, der Überlebens- und Rezidivrate unbehandelter Tumore beziehen. Die angiogene Aktivität und Abhängigkeit des Tumors variiert mit jedem Tumortyp und wird durch die MVD nicht reflektiert, da sie lediglich die interkapilläre Distanz wider spiegelt. Weiterhin variiert die MVD im Gegensatz zu proangiogenen Faktoren (z.B. VEGF) nicht und kann mit diesen somit nicht korreliert werden. Es können zudem keine Rückschlüsse auf die Versorgung des Tumors geschlossen werden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die MVD nicht mit der Wachstumsrate des Tumors zusammenhängt, das heißt bei schnell wachsenden Tumoren nimmt zwar die Gesamtvaskularisation zu, jedoch muss die MVD nicht zunehmen. Vartanian et. Weidner unterstreichen diese Aussage in ihrer Studie, bei der sie herausgefunden haben, dass die MVD weder mit der Endothelzell- noch mit der Tumorzellproliferation zusammen hängt [64]. Es ist zu betonen, dass das kleine Anwendungsfenster der Prognose der MVD kritisch zu betrachten ist. Es existieren zahlreiche Tumorstudien, die die Methode nach Weidner oder deren modifizierte Form wie beispielsweise die Chalkley Methode oder digitalisierte Methoden benutzt haben und eine positive Korrelation zwischen prognostischen Faktoren und der microvessel density ermitteln konnten [35, 36, 41, 44, 55-58]. Jedoch gibt es wiederum viele andere Studien, die dies nicht bestätigen [29-31, 37-40, 45, 46, 59, 60]. Diese Diskrepanz wurde für die MVD nach Weidner bereits 1999 im College of American Pathologists Consensus Statement aufgegriffen, in dem prognostische Faktoren bezüglich des Brustkrebs aufgrund ihrer publizierten Beweiskraft kategorisiert worden sind [23]. Die MVD wurde in die letzte Kategorie eingestuft.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die MVD Ergebnisse nach Weidner und deren modifizierte Formen sehr umstritten sind. Auch wenn sie teilweise prognostisches Potential aufweisen konnten, reichen sie nicht aus, um den funktionellen oder angiogenen Status der Tumervaskularisation zu erklären.

### **5.4 Molekulare diagnostische Studie**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden tumortragende Mäuse mit zwei unterschiedlichen Kontrastmitteln behandelt, von denen sich das eine spezifisch in den tumoralen Blutgefäßen anlagert, das andere unspezifisch im Tumorgewebe anreichert. Nachdem sich die Kontrastmittel in den Zielgeweben angereichert hatten, wurde die optische Bildgebung mit einem Nah-Infrarotlaser durchgeführt. Anschließend wurden die Tumorkontrastwerte ermittelt. Nach Entnahme der Tumore sind diese mittels stereologischer Methoden mikroskopisch quantifiziert worden. Hierbei wurden die Volumina der Tumore, die Volumina der intakten und nekrotischen Tumorbereiche, die Blutgefäßlängen und die Diffusionsradien bestimmt. Nachdem die beiden Tier- bzw. Tumorguppen anhand der stereologischen

## **Diskussion**

Parameter auf ihre Ähnlichkeit hin überprüft worden sind, wurden die Tumorkontrastwerte der optischen Bildgebung mit den stereologischen Werten korreliert.

### **5.4.1 Optische Bildgebung**

In dieser Arbeit wurden experimentelle Pankreaskarzinome der NET Zelllinie BON mittels optischer Bildgebung unter Verwendung von Kontrastmitteln dargestellt. Diese Tumorzellen wurden aufgrund des hohen Aufklärungsbedarf bezüglich des Bauchspeicheldrüsenkarzinoms verwendet. Der Bauchspeicheldrüsenkrebs macht zwar nur 3% aller Krebserkrankungen aus, ist aber für 6,1% aller Krebstodesfälle verantwortlich [107]. Die hohe Todesrate kann insbesondere durch die fehlenden diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten im Bereich der Bauchspeicheldrüsenkrebserkrankung erklärt werden. Aufgrund der hohen Todesrate dieser aggressiven Krebsform besteht daher dringender Bedarf, den Fortschritt der Forschung in diesem speziellen Gebiet weiter voran zu treiben.

In dieser Arbeit wurden zwei Gruppen von Nacktmäusen verwendet, die orthotop ein experimentelles Pankreaskarzinom trugen. Die erste Gruppe (n=20) wurde mit einem gefäßspezifischen Kontrastmittel (AP39-TSC), die zweite (n=17) mit einem unspezifischen Kontrastmittel (TSC) behandelt. Die Zielstruktur des AP39 Antikörpers stellt das ED-B-Fibronectin dar, das hauptsächlich in tumoralen Blutgefäßen vorkommt. Die optische Bildgebung mittels Nah-Infrarot Lasertechnologie wurde 24 Stunden nach Substanzapplikation durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die höchste Kontrastmittelakkumulation im Tumorgewebe herrscht. (Dieser Zeitpunkt wurde in einer anderen Studie ermittelt und ist nicht Bestandteil dieser Arbeit.) Die Tumorsignalintensitäten wurden durch ein Bildanalyseprogramm als Kontrastwerte ermittelt.

#### **5.4.1.1 Kontrastschwankungen**

Die Laser-induzierten Fluoreszenz-Abbildungen der tumortragenden Mäuse nach Kontrastmittelapplikation führen zu einer Darstellung der experimentellen Tumore. Die Mäuse, die mit dem unspezifischen Kontrastmittel TSC behandelt worden sind, weisen im Gegensatz zu den Mäusen, in die das spezifische Kontrastmittel AP39-TSC appliziert worden ist, stets einen geringeren Tumorkontrastwert auf. Es ist jedoch innerhalb beider Gruppen eine Variabilität der Kontrastwerte zwischen den einzelnen Tieren zu vermerken und eine heterogene, unterschiedlich stark ausgeprägte Grauabstufung innerhalb einer jeden Tumorbildung. Diese Unterschiede zwischen den Versuchstieren und innerhalb eines Tumors können auf technische, praktische und biologische Besonderheiten zurückgeführt werden.

In den Abbildungen der Versuchstiere treten nach Kontrastmittelapplikation einige Organe wie die Leber, die Blase, die Nieren, die Harnleiter und die Gebärmutter durch Helligkeit hervor. Der hepatobiliäre und renale Kreislauf tragen zur Kontrastmittelentfernung aus dem Körper bei. Die daran beteiligten Organe sind daher mit fluoreszierenden Stoffen angereichert und senden Signale aus. Zunächst sind Aufnahmen im Lasersystem von den Tieren bei geschlossener Körperhöhle in vivo angefertigt worden, nachdem sich die Kontrastmittelsubstanzen hinreichend angereichert haben. Es stellte sich jedoch schnell heraus, dass die Leber derart stark fluoreszierte, dass der sich im Pankreas befindliche Tumor auf der Kamera-Abbildung nicht hinreichend von der Leber abgrenzbar war. Um die Tumorregion anhand der Abbildung genau identifizieren zu können, musste die Körperhöhle des Tieres eröffnet werden, um den Tumor so vorlagern zu können, dass er sich von der Leber abgrenzen ließ. Die Kontrollregion wurde so gewählt, dass sie möglichst nicht von den Fluoreszenzsignalen der anderen Organe beeinflusst wurde.

Zum Ausschluß von Artefakten durch Reflexionen wurden die Tiere für die Bildaufnahme zum einen auf eine dunkle, matte Gummiunterlage gelegt und anschließend in einer dunklen, schwarzen Kammer platziert, die mit einer Kamera und dem Laser ausgestattet war. Die Lichtreflexion der Umgebung konnte somit von Anfang an ausgeschlossen werden. Zur Vermeidung möglicher Reflexionen durch feuchte Organe, die durch die Eröffnung der Körperhöhle in Erscheinung treten könnten, wurde auf die Positionierung des Tieres geachtet. Gegebenenfalls musste die Oberfläche zusätzlich durch einen sterilen Gaze-Tupfer leicht abgetupft werden.

Die Fluoreszenzschwankungen innerhalb der Tumorregionen können zum einen auf die heterogene Verteilung des Kontrastmittels innerhalb des entarteten Gewebes zurückzuführen sein. Zum anderen stellt sich die dreidimensionale Anreicherung im Tumor nur zweidimensional im Bild dar, so dass sich die übereinander liegenden Gewebeschichten unterschiedlich stark beeinflussen können. Die dreidimensionale Kontrastmittelanreicherung wird also in einem zweidimensionalen Bild reflektiert.

Der Zeitpunkt der Bildaufnahme spielt für die Stärke des Fluoreszenzsignals eine wesentliche Rolle. Die höchste Anreicherung des Fluoreszenzfarbstoffs wurde nach 24 Stunden bestimmt. Der 24 Stunden Zeitpunkt wurde in Vorversuchen (nicht Bestandteil dieser Arbeit) unter Berücksichtigung dieses Krankheitsbildes ermittelt. Zusätzlich wurde die applizierte Kontrastmittelsubstanz genau auf das Gewicht jeder einzelnen Maus abgestimmt,

## **Diskussion**

so dass die verabreichte Kontrastmittelkonzentration pro Körpergewicht konstant gewesen ist.

Die Heterogenität der Kontrastwerte des spezifischen (AP39-TSC) und unspezifischen (TSC) Kontrastmittels innerhalb der Tiergruppen und des jeweiligen Tumors kann auf einer heterogenen Verteilung des jeweiligen Kontrastmittels beruhen, die von der biologischen Eigenschaft des Zielorgans oder der Zielstruktur abhängt. Die Zielstruktur des spezifischen Kontrastmittels AP39-TSC stellt das ED-B-Fibronektin dar, das insbesondere in angiogenen Bereichen vorzufinden ist. Das unspezifische Kontrastmittel TSC dagegen ist nicht spezifisch gegen ein bestimmtes target gerichtet, führt jedoch ebenfalls zu heterogenen Kontrastwerten innerhalb der Tiergruppe und des jeweiligen Tumors. Um abzuklären, ob intratumorale Strukturen für die Heterogenität der Kontrastwerte beider Kontrastmittel verantwortlich sind, wurden die experimentellen Pankreastumore mikroskopisch bzw. histologisch quantifiziert. Hierfür wurden stereologische Methoden verwendet. Da die Zielstruktur ED-B-Fibronektin des AP39-TSC Kontrastmittels insbesondere im angiogenen Bereich vorkommt, wurden die Tumorblutgefäße histologisch quantifiziert. Zusätzlich wurden die intakten Bereiche des Tumors quantifiziert, da diese Regionen vaskularisiert sind. Neben den intakten wurden auch die nekrotischen Bereiche des Tumors quantifiziert, um insbesondere für das TSC eine Aussage zu erhalten, ob es sich eher in vitalen oder untergegangenen Geweberegionen anreichert. Die Kontrastschwankungen innerhalb der Gruppen (AP39-TSC und TSC) konnten dann mit den intratumoralen histologischen Strukturen korreliert werden.

### **5.4.2 Quantifizierung mikroskopischer Strukturen und deren Korrelation mit den Kontrastwerten der optischen Bildgebung**

Die Korrelation der Kontrastwerte der optischen Bildgebung und der intratumoralen Strukturen führten zu den folgenden Ergebnissen. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Kontrastwert des spezifischen Kontrastmittels AP39-TSC sowohl mit der Blutgefäßlänge als auch mit dem intakten Tumolvolumen festgestellt werden. Die Korrelation zwischen Kontrast und Blutgefäßlänge lässt darauf schliessen, dass sich das Kontrastmittel AP39-TSC in den Blutgefäßen angereichert hat und das angestrebte, molekulare target (ED-B-Fibronektin) erreicht hat. Da sich die Blutgefäße innerhalb der intakten Tumorbereiche befinden, korrelieren die Kontrastwerte ebenfalls mit den vitalen Geweberegionen des jeweiligen Tumors. Zusätzlich konnte keine Korrelation zwischen dem Kontrastwert des AP39-TSC und den nekrotischen Tumorregionen beobachtet werden. Dies unterstreicht nochmals die spezifische Anlagerung des AP39-TSC innerhalb der vitalen Tumorregionen bzw. der Blutgefäße. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich das Kontrastmittel AP39-TSC spezifisch an ED-B Fibronektin und somit innerhalb tumoraler Blutgefäße anreichert, so

dass das laserinduzierte Fluoreszenzsignal des Tumors mit der Vaskularisation des Tumors zusammenhängt. Da tumorale Blutgefäße stets heterogen im Gewebe vorliegen, wird sich folglich auch das Kontrastmittel heterogen im Tumor anreichern. Dadurch würden sich die Kontrastschwankungen innerhalb der Gruppen bzw. des Tumors erklären lassen. Eine stärker vaskularisierte Region wird also eine höhere Konzentration an Kontrastmittel AP39-TSC vorweisen als eine geringer durchblutete bzw. sollte sich in Nekrosen kein Kontrastmittel anreichern. Die Kontrastwertschwankungen zwischen den einzelnen Tieren innerhalb der Gruppe, die mit dem spezifischen Kontrastmittel behandelt worden sind, können auf die individuelle, unterschiedlich stark ausgeprägte, heterogene Durchblutung der jeweiligen Tumore zurückgeführt werden.

Im Gegensatz zum spezifischen Kontrastmittel AP39-TSC konnte für das unspezifische Kontrastmittel TSC eine signifikante Korrelation zwischen dem Kontrastwert und den nekrotischen Tumorumfängen festgestellt werden. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen diesen Kontrastwerten und der Blutgefäßlänge sowie dem intakten Tumorumfang beobachtet werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die gemessenen Fluoreszenzsignale im Tumor durch eine unspezifische Anreicherung in nekrotischen Anteilen herrühren. Das Fluoreszenzsignal verstärkt sich also, je höher der Anteil an untergegangenem Gewebe ist. Die Anreicherung innerhalb intakter und angiogener Tumorbereiche ist zwar nicht vollständig auszuschließen, ist aber viel geringer als in nekrotischen Regionen. Die Nekrosen sind bei jedem Tumor der Gruppe unterschiedlich stark und individuell ausgeprägt. Die mikroskopischen Beobachtungen dieser Studie zeigten, dass die Pankreastumore neben einem schmalen intakten Tumorumfang, eine heterogene Verteilung der nekrotischen Bereiche im Tumor aufwiesen. Das morphologische Erscheinungsbild bestand sehr oft aus vielen intakten Gewebeinseln unterschiedlichster Größe, die heterogen innerhalb nekrotischer Tumorumfänge lagen. Die Kontrastwertschwankungen innerhalb der Tumore und der Gruppe sind also auf die nekrotischen Bereiche dieser Pankreastumore zurückzuführen.

Anhand der erhobenen stereologischen Daten zur Ermittlung der Blutgefäßlänge konnte der durchschnittliche Diffusionsradius errechnet werden. Diese Größe spiegelt die Entfernung wider, die durchschnittlich zwischen zwei Blutgefäßen existiert. In der vorliegenden Arbeit liegt der ermittelte Diffusionsradius für alle Pankreastumore zwischen 34,50  $\mu\text{m}$  und 66,59  $\mu\text{m}$ . Der Diffusionsradius reflektiert die Dichte der Blutgefäße innerhalb des intakten Gewebes in den experimentellen Tumoren.

## **Diskussion**

Um die Kontrastwerte der beiden Tiergruppen (AP39-TSC und TSC) mit den stereologischen Resultaten korrelieren zu können, mussten die Tumore beider Gruppen auf ihre Ähnlichkeit hin überprüft werden. Dafür wurden folgende stereologische Parameter zwischen den Tiergruppen mittels Boxplots miteinander verglichen: a) das Tumolvolumen, b) das nekrotische Tumolvolumen, d) die Blutgefäßlänge und e) der Diffusionsradius. In der Tabelle 10 sind zur Übersicht die Mittelwerte und deren jeweilige Standardabweichung dieser stereologischen Parameter und des intakten Tumolvolumens dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den stereologischen Parametern der AP39-TSC und TSC behandelten Tiergruppen ermittelt werden. Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen der Größe der Nekrose und des Tumors mittels graphischer Darstellung verdeutlicht. Je größer der Tumor war, desto größer war auch der jeweilige nekrotische Tumoranteil. Die Tumore der beiden Gruppen ähnelten sich somit sehr stark und konnten für einen Vergleich bezüglich der Kontrastwerte der optischen Bildgebung herangezogen werden.

Es ist anzumerken, dass die Kontrastmittelstudie anhand von Mäusen durchgeführt worden ist. Die Gewebevolumen dieser Versuchstiere sind nicht mit den menschlichen Volumina vergleichbar, so dass die Emissionssignale, die in dieser Studie erreicht worden sind, sich im menschlichen Gewebe aufgrund der anatomischen Gegebenheiten unterscheiden werden. Die hohe Eindringtiefe des Laserlichts, die bei den kleinen Tierorganen erreicht worden ist, wird beim Menschen nicht ausreichen, tiefer liegende Tumore hinreichend detektieren und darstellen zu können. Die optische Bildgebung ist daher limitiert, oberflächliche Krankheitsbilder bzw. Gewebe zu identifizieren. Dafür ist eine unterstützende Kontrastmittelgabe nötig, durch die eine deutlichere und aussagekräftigere bildgebende Darstellung auf molekularer Ebene möglich wird.

### **5.4.3 Tierschutz**

Trotz großer Fortschritte bei der Entwicklung von Ergänzungsmethoden ist es bisher nicht möglich, auf den Einsatz von Versuchstieren gänzlich zu verzichten, ohne den biomedizinischen Fortschritt zu gefährden. Nach sehr genauem Abwägen des wissenschaftlichen Nutzens des Tierversuchs in Anbetracht des Wohlbefindens und des Lebens der Versuchstiere und unter Beachtung der tierschutzrelevanten Gesetze, ist ein Tierversuch stets mit hohem Verantwortungsbewusstsein dem Lebewesen gegenüber durchzuführen. Im Zusammenhang mit Tierversuchen sollte auch stets das 3R-Konzept (replacement, reduction, refinement) nach Russel und Brunch (1959) beachtet werden. Dies besagt u. a., dass stets angestrebt werden soll, einen Tierversuch, wenn möglich durch Alternativmethoden zu ersetzen, die Tierversuchszahlen zu reduzieren und Tierversuche

kontinuierlich zu verbessern. Beim letzten Punkt soll insbesondere das Wohlbefinden der Tiere in höchstem Maße Berücksichtigung finden.

Die Kleintierbildgebung liefert hinsichtlich der genannten Aspekte tierschutzrelevante Beiträge. Denn die Kleintierbildgebungs-Verfahren stellen nicht nur eine schonende und nicht-invasive Untersuchungsmethode der Versuchstiere dar, sondern ermöglichen auch die Mehrfachanwendung an den selben Tieren über längere Zeiträume. Aufgrund dieser Eigenschaften kann die Anzahl benötigter Versuchstiere signifikant reduziert werden [108]. Dies bedeutet beispielsweise, dass ein Wirkstoff, dessen Effekt zu unterschiedlichen Zeitpunkten ausgewertet werden soll, anhand nur einer Versuchstiergruppe untersucht werden kann. Eine solche Effektanalyse würde üblicherweise ohne die Kleintierbildgebung nur anhand labordiagnostischer Verfahren durchgeführt werden. Dies bringt die Tötung der Tiere nach jedem Versuchsabschnitt mit sich, so dass mehrere Versuchstiergruppen eingesetzt werden müssten. Durch die Kleintierbildgebung werden jedoch nicht nur Versuchstiere eingespart, sondern auch die Qualität der Datenerhebung deutlich verbessert, da der Wirkstoffeffekt oder der Krankheitsverlauf an einem Lebewesen kontinuierlich beobachtet werden kann und auch die Zeitpunkte flexibler gestaltet werden können [108]. Das NIR-Laser Bildgebungssystem, das in dieser Arbeit verwendet worden ist, wird erfolgreich in der Präklinik in der Kleintierbildgebung eingesetzt.

Nach der Tötung der Tiere sollten die labordiagnostischen *in vitro* Untersuchungen, die für den jeweiligen Versuch sinnvoll angewendet werden können, im höchsten Maße ausgeschöpft werden, um den Wert, die Aussagekraft und die Qualität des Tierversuchs zu steigern. Die histologische Auswertung der im Fokus der Untersuchung stehenden Gewebe steuert einen hohen Beitrag zur Versuchsauswertung bei und kann die *in vivo* Daten wertvoll ergänzen oder sogar charakterisieren. Daher ist es umso wichtiger, aussagekräftige, objektive und verlässliche quantitative histologische Daten zu erhalten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass stereologische Methoden diesen Ansprüchen gerecht werden und in der Histologie zur Quantifizierung von Gewebe bestens geeignet sind, um den Informationsgehalt zu optimieren.

Neben diesen Aspekten findet sich das 3R Konzept in dieser Arbeit auch in anderen Bereichen wieder.

In dieser Arbeit sind insgesamt 15 experimentelle Tumore verwendet und analysiert worden (Isotropie Untersuchungsmethoden  $n=3$ , Methodenvergleich  $n=11$ , Schrumpfstudie  $n=1$ ), die zum einen aus Restbeständen abgeschlossener Versuche der Bayer Schering

## Diskussion

Pharma AG und zum anderen aus einem Versuch der radiologischen Abteilung der Universität Münster stammten. Die Fragestellungen dieser Arbeit konnten mit diesen Geweben hinreichend beantwortet werden. Es mussten somit keine Versuchstiere verwendet werden, um neue Tumore anzuzüchten und restliches Gewebematerial konnte noch sinnvoll verwendet werden.

Die Studie, in der experimentelle, neuroendokrine Tumore der NET Zelllinie BON verwendet worden sind, verlief in Kooperation mit der Gastroenterologischen Abteilung der Charite. Für diese Studie konnten ebenfalls Versuchstiere eingespart werden, indem ein geplanter Versuch mit Nacktmäusen ausgebaut worden ist, so dass die Korrelation von bildgebenden Daten mit stereologischen Daten ein Zusatzprojekt innerhalb dieses Versuches darstellte. Dies erforderte zwar zusätzliche, organisatorische Maßnahmen und einen sowohl zeitlichen als auch arbeitstechnischen Mehraufwand, lohnte sich aber hinsichtlich des Aspekts, keine zusätzliche Studie mit neuen Versuchstieren durchführen zu müssen. Es konnten jedoch nicht nur Versuchstiere eingespart werden, sondern die stereologische Analyse hat zur weiteren Charakterisierung der Tumore beigetragen und lieferte aussagekräftige Daten, die auch für andere Fragestellungen im Rahmen des gesamten Versuchs verwendet werden konnten. Das allgemeine Befinden und der Zustand der Nacktmäuse wurde regelmäßig überprüft. Die mit Filtern ausgestatteten Käfige und die keimarme Tierhaltungsanlage wurden den Anforderungen der T-Zelldefizienten Mäuse gerecht. Die Berührung zwischen Maus und Mensch fand zusätzlich nur unter bestimmten hygienischen Bedingungen (Kittel, Handschuhe etc.) statt, um die Gesundheit der Tiere nicht zu gefährden. Das Wohlbefinden der Tiere wurde durch möglichst lange Gruppenhaltung, die bis zur Kontrastmittelgabe erfüllt werden konnte und durch die Käfigausstattung mit roten Plastikhäuschen unterstützt. Die Käfigsäuberung und die Futter- und Wasserversorgung erfolgte regelmäßig.

Die Pankreastumore sind den Nacktmäusen orthotop in die Bauchspeicheldrüse implantiert worden, so dass dafür eine Operation mit Eröffnung der Bauchhöhle unumgänglich gewesen ist. Dieser Eingriff bedeutet für das Tier Stress, Schmerz und Belastung zum einen durch die Narkose und zum anderen durch den Wundheilungsprozess. Eine Inokulation von Krebszellen unter die Haut (subkutan) hätte durch manuelle Fixation und einen Nadeleinstich weniger Stress und Schmerzen bei dem Tier verursacht und die Überprüfung des Tumorwachstums wäre leichter gewesen als bei Tumoren, die sich in der Körperhöhle befinden. Alves et al. [14] konnte jedoch in einer Studie zeigen, dass eine orthotope Inokulation von humanen pankreatischen Tumorzellen in die Bauchspeicheldrüse von immundefizienten Mäusen im Gegensatz zur subkutanen Transplantation zu einem extensiven lokalen Tumorwachstum führt, das sich invasiv in die benachbarten Organe

ausbreiten kann [14]. Zusätzlich besitzt dieser orthotope experimentelle Tumor ein Metastasierungspotential, das bei den subkutanen Pankreastumoren nicht zu beobachten war [14]. Da ein Aspekt des Gesamtversuchs auf das Metastasierungspotential abzielte (nicht Bestandteil dieser Arbeit), wurde die erfolgversprechendere orthotope Inokulation gegenüber der subkutanen bevorzugt. Jedoch hat auch der Aspekt der Kontrastmittelstudie zur orthotopen Inokulation beigetragen. Da onkologische Versuche oft darauf abzielen, diagnostische oder therapeutische Verfahren zu entwickeln, die später am Menschen angewendet werden sollen, erweist es sich als vorteilhaft, wenn der experimentelle Tumor den menschlichen Pankreastumor so gut wie möglich in seinem Verhalten und seiner Lokalisation imitiert. Ein weiterer Vorteil der orthotopen Inokulation von pankreatischen Tumorzellen liegt darin, dass diese innerhalb der Bauchspeicheldrüse ihre eigentlichen bzw. ursprünglichen Bedingungen wieder finden. Die Inokulationslokalität kann sich zusätzlich auch auf die Tumorgefäße auswirken, was in einer Studie von di Tomaso et al. [109] gezeigt werden konnte. Diese beschreibt für orthotope Kolonkarzinome, dass die Mosaikstruktur der Blutgefäße für orthotope Kolonkarzinom Xenografts zu ca. 92% mit einer undetektierten CD31/CD105 Expression erklärt werden konnte, bei Kolonkarzinomen, die ektop implantiert worden waren, konnte hingegen festgestellt werden, dass zu 30% Öffnungen im Endothel bzw. das Fehlen von Endothelzellen die Ursache der immunhistochemisch negativ reagierenden Stellen waren. Insgesamt waren ca. 11% der Blutgefäße der orthotopen Tumore und 24% der ektopen Tumore von diesen Expressionsdefekten betroffen [109]. Da in dieser Arbeit die tumoralen Blutgefäße histologisch ausgewertet worden sind, erwies sich die orthotope Lage der Tumore im Gegensatz zur subkutanen Lokalisation als aussagekräftiger.

## **6 SCHLUSSFOLGERUNG**

Die quantitative Mikroskopie unter Verwendung stereologischer Methoden liefert aussagekräftige, objektive und reproduzierbare Resultate dreidimensionaler tumoraler Strukturen. Sie bietet daher neue Möglichkeiten zur pharmakologischen Charakterisierung diagnostischer und therapeutischer Substanzen in der Onkologie. Die stereologischen Methoden ermöglichen eine vielfältige, quantitative, histologische Analyse der jeweiligen Tumore und steigern dadurch den Informationsgehalt und den Wert der Studie. Dies führt zu einer Einsparung von Versuchstieren, da aus einer Studie bereits hochwertige Daten erhoben werden können. Weitere Tierversuche können somit reduziert werden oder wegfallen.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden stereologische Methoden zur mikroskopischen Quantifizierung dreidimensionaler Strukturen von Tumoren getestet und etabliert.

Hierfür wurde zunächst der Richtungsverlauf tumoraler Blutgefäße untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass experimentelle, unbehandelte Tumore ein isotropes Blutgefäßnetz besitzen. Dies bedeutete für die stereologische Untersuchung dieser tumoralen Blutgefäße, dass auf die Anfertigung sogenannter *isotropic uniform random* Schnitte verzichtet werden konnte.

Anschließend wurde der Einfluss der histologischen Aufarbeitung der Tumore auf deren Schrumpfung bzw. Deformation, die die quantitative mikroskopische Analyse in dieser Arbeit beeinflussen könnte, untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Deformation der Gefrierschnittfläche hauptsächlich auf mechanischen, technischen und praktischen Einflüssen beruhte. Die Schrumpfungsprozesse der Tumorgefrierschnitte wirkten sich jedoch nur minimal auf die stereologischen Ergebnisse in dieser Arbeit aus, so dass diese in ihrer Aussagekraft nicht beeinträchtigt wurden.

Dann wurde anhand der tumoralen Blutgefäßquantifizierung die Reproduzierbarkeit der stereologischen Methode und der klassischen MVD (microvessel density) Methode nach Weidner ermittelt und beide Methoden miteinander verglichen. Die stereologische Methode lieferte deutlich reproduzierbarere Ergebnisse.

Abschließend wurden histomorphologische Strukturen (intaktes und nekrotisches Tumolvolumen, tumorale Blutgefäßlänge) in experimentellen Pankreaskarzinomen mittels stereologischer Methoden *in vitro* ausgewertet. Diese Resultate wurden mit vorher erhobenen *in vivo* Daten korreliert. Hierfür wurden tumortragende Mäuse in zwei Gruppen eingeteilt, wobei die erste Gruppe mit dem unspezifischen Kontrastmittel TSC und die zweite Gruppe mit dem gefäßspezifischen Kontrastmittel AP39-TSC behandelt wurde. Die Tumorsignalintensitäten wurden mittels NIR (Nah-Infrarot) Laser ermittelt. Anschließend wurden die gesamte Tumorgefäßlänge und die Volumina der nekrotischen und intakten Tumorbereiche jedes Tumors mikroskopisch mittels stereologischer Methoden *in vitro* quantifiziert. Die histologischen Resultate wurden dann mit den *in vivo* Daten korreliert. Die Laser-induzierte Fluoreszenzsignalintensität war stärker nach der AP39-TSC- (Ø Tumorkontrast 6,5) als nach der TSC-Kontrastmittelgabe (Ø Tumorkontrast 1,1). Es konnte für das spezifische Kontrastmittel (AP39-TSC) eine signifikante, positive Korrelation

## Zusammenfassung

zwischen den Tumorkontrastwerten und den stereologischen Werten des intakten Tumorumfanges und der Blutgefäßlänge ermittelt werden. Es bestand aber keine Korrelation zwischen den nekrotischen Tumorregionen und diesen Kontrastwerten. Die Kontrastwerte des unspezifischen Kontrastmittels (TSC) korrelierten weder mit den intakten Tumorumfängen noch mit den tumoralen Blutgefäßlängen. Es konnte jedoch eine signifikante, positive Korrelation zwischen den unspezifischen Kontrastwerten und den nekrotischen Tumorumfängen festgestellt werden. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass sich das Kontrastmittel AP39-TSC spezifisch in den tumoralen Blutgefäßen anreicherte, das Kontrastmittel TSC dagegen nicht. Das unspezifische TSC reichte sich bevorzugt in den nekrotischen Bereichen der Tumore an.

Die quantitative Mikroskopie unter der Verwendung stereologischer Methoden bietet aussagekräftige, objektive und reproduzierbare Daten über dreidimensionale tumorale Strukturen und bietet daher neue Möglichkeiten zur pharmakologischen Charakterisierung diagnostischer und therapeutischer Substanzen.

## 8 SUMMARY

### Testing and establishment of stereological methods for the histomorphological quantitation of structures of experimental tumors

In this doctoral thesis, stereological methods were tested and established for the microscopic quantitation of three-dimensional tumoral structures.

First, the orientation of tumoral blood vessels was analyzed. The result was that experimental, untreated tumors have isotropic blood vessels. That means for the stereological investigations that so called isotropic uniform random sections do not have to be produced.

Second, the deformation and shrinkage of histological cryostat sections of tumors during the histological process were proofed, because these factors can contribute to systematic errors in stereological results. The deformation and shrinkage of the sections were mainly based on mechanical, technical and practical manipulation. However, the deformation and shrinkage of the tumor sections were so little, that they will not influence the significance of the stereological results in this study.

Third, the reproducibility of a stereological method was proofed and compared to a classical method. Therefore tumoral blood vessels were quantified by using stereological tools and by using the classical microvessel density (MVD) method of Weidner. The stereological method provided more objective and reproducible results compared to the MVD method.

Finally, histomorphological structures (intact and necrotic tumor volume, tumoral blood vessel length) of experimental pancreatic carcinoma were analyzed via stereological methods. Those results were compared to *in vivo* data, which were established before. For the *in vivo* study, the human pancreatic NET-cell line BON was implanted orthotopically into immune deficient mice. The specific NIR-dye was intravenously administered to the first group of tumor bearing rodents (n=22), the unspecific NIR-dye to the second group (n=17). The laser induced fluorescence signal intensity was stronger after application of the specific NIR-dye ( $\emptyset$  tumor contrast 6.5) compared to the unspecific dye ( $\emptyset$  tumor contrast 1.1). For the specific NIR-dye a significant correlation between the tumor signal intensity and both the total volume of vital tissue and the total blood vessel length of each tumor could be demonstrated. No correlation between the tumor signal intensity of the specific dye and the

## Summary

volume of necrotic tumor masses was found. In contrast, a significant correlation between the tumor signal intensity induced by the unspecific dye and the volume of necrotic tumor masses was detected. These tumor fluorescence intensities did neither correlate with the volume of vital tumor tissue nor with the total blood vessel length. This study demonstrated that the contrast agent AP39-TSC accumulated specifically within the tumoral blood vessels. In contrast, the unspecific TSC accumulated mainly in the necrotic tumor regions.

Quantitative microscopy using stereological methods provides meaningful and objective estimations of three-dimensional structures and offers new possibilities for the pharmacological characterization of diagnostic and therapeutic substances in different indications.

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Robert Koch Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, eds. *Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends*. 5 ed. 2006, Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Saarbrücken. 1-108.
2. Trautwein, G., *Tumorwachstum*, in *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin*, H. Stünzi and E. Weiss, Editors. 1990, Paul Parey: Berlin. p. 377-412.
3. Deutsche Krebsgesellschaft, ed. *Fatigue: Wenn Müdigkeit quälend wird*. 4 ed. 2003, Deutsche Krebsgesellschaft eV: Frankfurt/Main. 1-21.
4. Folkman, J., *Angiogenesis*. *Annu Rev Med*, 2006. 57: p. 1-18.
5. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. *N Engl J Med*, 1971. 285(21): p. 1182-6.
6. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. *Nature*, 2000. 407(6801): p. 249-57.
7. Schirner, M., et al., *Molecular imaging of tumor angiogenesis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1014: p. 67-75.
8. Bremer, C., V. Ntziachristos, and R. Weissleder, *Optical-based molecular imaging: contrast agents and potential medical applications*. *Eur Radiol*, 2003. 13(2): p. 231-43.
9. Kim, Y.K.R., *The Mouse in Science: Cancer Research*. 1996, University of California Center for Animal Alternatives,: Davis.
10. Köpf-Maier, A.W. and B. Micheel, *Immunodeficient Animals- Still Important Tolls for Caner Research*, in *Immunodeficient Animals: Models for Cancer Research*, W. Arnold, P. Köpf-Maier, and B. Micheel, Editors. 1996, Karger: Basel. p. IX-XIII.
11. Mossmann, H., *The scid Mouse: Description, Husbandry and Experimental Use*, in *Immunodeficient Mice in Oncology*, H.H. Fiebig and D.P. Berger, Editors. 1992, Karger: Basel. p. 287-293.
12. Kung, A.L., *Practices and pitfalls of mouse cancer models in drug discovery*. *Adv Cancer Res*, 2007. 96: p. 191-212.
13. Fortmeyer, H.P., *Die nu/nu Maus im Versuch*, in *Thymusaplastische Maus (nu/nu) Thymusaplastische Ratte (rnu/rnu) Haltung, Zucht, Versuchsmodelle*, M. Merckenschlager and K. Gärtner, Editors. 1981, Verlag Paul Parey: Berlin, Hamburg. p. 45-62.
14. Alves, F., et al., *An orthotopic model of ductal adenocarcinoma of the pancreas in severe combined immunodeficient mice representing all steps of the metastatic cascade*. *Pancreas*, 2001. 23(3): p. 227-35.

## Literaturverzeichnis

15. Papetti, M. and I.M. Herman, *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. 282(5): p. C947-70.
16. Folkman, J., *Fundamental concepts of the angiogenic process*. Curr Mol Med, 2003. 3(7): p. 643-51.
17. Yancopoulos, G.D., et al., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. 407(6801): p. 242-8.
18. McDonald, D.M. and P. Baluk, *Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture*. Chest, 2005. 128(6 Suppl): p. 602S-608S.
19. Folkman, J., *The role of angiogenesis in tumor growth*. Semin Cancer Biol, 1992. 3(2): p. 65-71.
20. Jain, R.K., *Barriers to drug delivery in solid tumors*. Sci Am, 1994. 271(1): p. 58-65.
21. Jain, R.K., *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*. Science, 2005. 307(5706): p. 58-62.
22. McDonald, D.M. and P.L. Choyke, *Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic*. Nat Med, 2003. 9(6): p. 713-25.
23. Fitzgibbons, P.L., et al., *Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999*. Arch Pathol Lab Med, 2000. 124(7): p. 966-78.
24. Jensen, O.M., *Gross examination of musculoskeletal sarcomas. Estimation of tumour volume and sampling for unbiased morphometry*. Apmis, 1991. 99(11): p. 1031-7.
25. Ladekarl, M., V. Jensen, and B. Nielsen, *Stereologic estimation of breast tumor size*. Anal Quant Cytol Histol, 1996. 18(2): p. 151-7.
26. Nielsen, B.S., et al., *A precise and efficient stereological method for determining murine lung metastasis volumes*. Am J Pathol, 2001. 158(6): p. 1997-2003.
27. Weidner, N., *Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors*. Breast Cancer Res Treat, 1995. 36(2): p. 169-80.
28. Weidner, N., et al., *Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma*. N Engl J Med, 1991. 324(1): p. 1-8.
29. Foote, R.L., et al., *Evaluation of tumor angiogenesis measured with microvessel density (MVD) as a prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma: results of RTOG 9505*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. 61(3): p. 745-53.
30. Busam, K.J., et al., *Tumor vascularity is not a prognostic factor for malignant melanoma of the skin*. Am J Pathol, 1995. 147(4): p. 1049-56.
31. Axelsson, K., et al., *Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1995. 87(13): p. 997-1008.

32. Kato, T., et al., *The methodology of quantitation of microvessel density and prognostic value of neovascularization associated with long-term survival in Japanese patients with breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1999. 53(1): p. 19-31.
33. Weidner, N., et al., *Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1992. 84(24): p. 1875-87.
34. Weidner, N., *Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer*. Am J Pathol, 1995. 147(1): p. 9-19.
35. Canoglu, A., et al., *Microvessel density as a prognostic marker in bladder carcinoma: correlation with tumor grade, stage and prognosis*. Int Urol Nephrol, 2004. 36(3): p. 401-5.
36. Bosari, S., et al., *Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma*. Hum Pathol, 1992. 23(7): p. 755-61.
37. Fridman, V., et al., *Assessment of tumor angiogenesis in invasive breast carcinomas: absence of correlation with prognosis and pathological factors*. Virchows Arch, 2000. 437(6): p. 611-7.
38. Reiher, F., et al., *p53 and microvessel density in primary resection specimens of superficial bladder cancer*. J Urol, 2002. 167(3): p. 1469-74.
39. Marrogi, A.J., et al., *Nitric oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma*. Clin Cancer Res, 2000. 6(12): p. 4739-44.
40. Millanta, F., et al., *Correlation of vascular endothelial growth factor expression to overall survival in feline invasive mammary carcinomas*. Vet Pathol, 2002. 39(6): p. 690-6.
41. Vermeulen, P.B., et al., *Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer*. Br J Cancer, 1999. 79(2): p. 316-22.
42. Fox, S.B., et al., *Tumor angiogenesis in node-negative breast carcinomas--relationship with epidermal growth factor receptor, estrogen receptor, and survival*. Breast Cancer Res Treat, 1994. 29(1): p. 109-16.
43. Fox, S.B., et al., *Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis*. J Pathol, 1995. 177(3): p. 275-83.
44. Fox, S.B., et al., *The prognostic value of quantitative angiogenesis in breast cancer and role of adhesion molecule expression in tumor endothelium*. Breast Cancer Res Treat, 1995. 36(2): p. 219-26.
45. Decaussin, M., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival*. J Pathol, 1999. 188(4): p. 369-77.

## Literaturverzeichnis

46. West, C.C., et al., *Microvessel density does not predict outcome in high grade soft tissue sarcoma*. Eur J Surg Oncol, 2005. 31(10): p. 1198-205.
47. Vermeulen, P.B., et al., *Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours*. Eur J Cancer, 2002. 38(12): p. 1564-79.
48. Offersen, B.V., M. Borre, and J. Overgaard, *Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density*. Eur J Cancer, 2003. 39(7): p. 881-90.
49. Chantrain, C.F., et al., *Computerized quantification of tissue vascularization using high-resolution slide scanning of whole tumor sections*. J Histochem Cytochem, 2003. 51(2): p. 151-8.
50. Kim, N.T., et al., *An original approach for quantification of blood vessels on the whole tumour section*. Anal Cell Pathol, 2003. 25(2): p. 63-75.
51. Ronan, F., et al., *Optimal resolution for automatic quantification of blood vessels on digitized images of the whole cancer section*. Image Anal Stereol, 2005. 24: p. 59-67.
52. Erovic, B.M., et al., *Quantitation of microvessel density in squamous cell carcinoma of the head and neck by computer-aided image analysis*. Wien Klin Wochenschr, 2005. 117(1-2): p. 53-7.
53. Srivastava, A., et al., *The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study*. Am J Pathol, 1988. 133(2): p. 419-23.
54. Hasan, J., R. Byers, and G.C. Jayson, *Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours*. Br J Cancer, 2002. 86(10): p. 1566-77.
55. Bochner, B.H., et al., *Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis*. J Natl Cancer Inst, 1995. 87(21): p. 1603-12.
56. Gasparini, G., et al., *Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma*. Int J Cancer, 1993. 55(5): p. 739-44.
57. Hansen, S., et al., *The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2000. 6(1): p. 139-46.
58. Offersen, B.V., M. Borre, and J. Overgaard, *Immunohistochemical determination of tumor angiogenesis measured by the maximal microvessel density in human prostate cancer*. Apmis, 1998. 106(4): p. 463-9.
59. Jones, A., et al., *Angiogenesis and lymphangiogenesis in stage 1 germ cell tumours of the testis*. BJU Int, 2000. 86(1): p. 80-6.

60. Larsen, K.K., et al., *Vascularity in thyroid neoplasms: a methodological investigation with a view to diagnostics*. *Apmis*, 2006. 114(11): p. 749-56.
61. Hammond, M.E., et al., *College of American Pathologists Conference XXXV: solid tumor prognostic factors-which, how and so what? Summary document and recommendations for implementation*. *Cancer Committee and Conference Participants*. *Arch Pathol Lab Med*, 2000. 124(7): p. 958-65.
62. Vermeulen, P.B., et al., *Influence of investigator experience and microscopic field size on microvessel density in node-negative breast carcinoma*. *Breast Cancer Res Treat*, 1997. 42(2): p. 165-72.
63. Hlatky, L., P. Hahnfeldt, and J. Folkman, *Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us*. *J Natl Cancer Inst*, 2002. 94(12): p. 883-93.
64. Vartanian, R.K. and N. Weidner, *Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma*. *Am J Pathol*, 1994. 144(6): p. 1188-94.
65. Carpenter, A.M., *Stereology. Definition and historic background*. *J Histochem Cytochem*, 1979. 27(11): p. 1535.
66. Mouton, P.R., *History of modern stereology*. 2005, IBRO website.
67. Howard, C.V. and M.G. Reed, *Concepts*, in *Unbiased Stereology - Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. 1998, Springer Verlag: New York. p. 1-18.
68. Gundersen, H.J., et al., *Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis*. *Apmis*, 1988. 96(5): p. 379-94.
69. Nyengaard, J.R., *Stereologic methods and their application in kidney research*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. 10(5): p. 1100-23.
70. Nyengaard, J.R., *Illustrated Glossary*, in *Electron Microscopy and Stereology laboratory and MIND Center*. 2004, University of Aarhus: Aarhus. p. 9.
71. Baak, J.P., E. Noteboom, and J.J. Koevoets, *The influence of fixatives and other variations in tissue processing on nuclear morphometric features*. *Anal Quant Cytol Histol*, 1989. 11(4): p. 219-24.
72. Winckler, J., *[The application of histological and histochemical techniques to freeze-dried cryostat sections]*. *Histochemie*, 1970. 24(2): p. 168-86.
73. Dorph-Petersen, K.A., J.R. Nyengaard, and H.J. Gundersen, *Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size*. *J Microsc*, 2001. 204(Pt 3): p. 232-46.
74. Ladekarl, M., *The influence of tissue processing on quantitative histopathology in breast cancer*. *J Microsc*, 1994. 174(Pt 2): p. 93-100.

## Literaturverzeichnis

75. Iwadare, T., et al., *Dimensional changes of tissues in the course of processing*. J Microsc, 1984. 136(Pt 3): p. 323-7.
76. Braendgaard, H. and H.J. Gundersen, *The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system*. J Neurosci Methods, 1986. 18(1-2): p. 39-78.
77. Howard, C.V. and M.G. Reed, *Random sampling and random geometry*, in *Unbiased Stereology - Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. 1998, Springer Verlag: New York. p. 19-37.
78. Gundersen, H.J. and E.B. Jensen, *The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction*. J Microsc, 1987. 147(Pt 3): p. 229-63.
79. Mattfeldt, T., et al., *Estimation of surface area and length with the orientator*. J Microsc, 1990. 159(Pt 3): p. 301-17.
80. Nyengaard, J.R. and H.J. Gundersen, *The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens*. Journal of Microscopy, 1992. 165: p. 427-431.
81. Howard, C.V. and M.G. Reed, *Length estimation*, in *Unbiased Stereology Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. 1998, Springer Verlag: New York. p. 125-132.
82. Nyengaard, J.R., et al., *A Stereological Approach to Capillary Networks*, in *Morphometry: Applications to medical sciences*, M.I. Ltd, Editor. 1996: New Delhi, India. p. 217-231.
83. wikipedia. *Bonaventura Cavalieri*. [http://de.wikipedia.org/wiki/Bonaventura\\_Cavalieri](http://de.wikipedia.org/wiki/Bonaventura_Cavalieri) [cited].
84. Howard, C.V. and M.G. Reed, *Estimation of reference volume using the Cavalieri method*, in *Unbiased Stereology - Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. 1998, Springer Verlag: New York. p. 39-53.
85. Hyde, D., et al. *Volume estimation*. in *Stereology Course*. 2006. Castle of Rauschholzhausen, Germany.
86. Gundersen, H.J., *Estimators of the number of objects per area unbiased by edge effects*. Microsc Acta, 1978. 81(2): p. 107-17.
87. Roggan, v.A., et al., *Wirkungsmechanismen von Laserstrahlung im biologischen Gewebe*, in *Angewandte Lasermedizin, Lehr- und Handbuch für Praxis und Klinik*, H.-P. Berlien and G. Müller, Editors. 2000, Laser- und Medizin-Technologie Berlin: Berlin
88. Wunder, A., J. Klohs, and C. Bremer, *Molekulare Bildgebung mit optischen Methoden-Möglichkeiten und Grenzen*. Health Academy, Molecular Imaging, ed. W. Niederlag and U. Lemke. 2006, Dresden: Health Academy.
89. Licha, K., *Contrast Agents for Optical Imaging*. Topics in Current Chemistry. Vol. 222. 2002, Berlin-Heidelberg: Springer Verlag.
90. Perlitz, C., et al., *Comparison of two tricarboyanine-based dyes for fluorescence optical imaging*. J Fluoresc, 2005. 15(3): p. 443-54.

91. Sevick-Muraca, E.M., et al., *Near-infrared Imaging with Fluorescent Contrast Agents*.
92. Witjes, J.A. and J. Douglass, *The role of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy in bladder cancer*. Nat Clin Pract Urol, 2007. 4(10): p. 542-9.
93. Slakter, J.S., et al., *Indocyanine-green angiography*. Curr Opin Ophthalmol, 1995. 6(3): p. 25-32.
94. Licha, K., et al., *Hydrophilic cyanine dyes as contrast agents for near-infrared tumor imaging: synthesis, photophysical properties and spectroscopic in vivo characterization*. Photochem Photobiol, 2000. 72(3): p. 392-8.
95. Menrad, A. and H.D. Menssen, *ED-B fibronectin as a target for antibody-based cancer treatments*. Expert Opin Ther Targets, 2005. 9(3): p. 491-500.
96. Berndorff, D., et al., *Imaging of tumor angiogenesis using 99mTc-labeled human recombinant anti-ED-B fibronectin antibody fragments*. J Nucl Med, 2006. 47(10): p. 1707-16.
97. Gundersen, H.J., et al., *The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered*. J Microsc, 1999. 193(Pt 3): p. 199-211.
98. Bland, J.M. and D.G. Altman, *Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement*. Lancet, 1986. 1(8476): p. 307-10.
99. Weiß, H., *Boxplots*, in *Biometrie-Unterlagen für die Pflichtveranstaltung Biometrie am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, 4. Auflage*, H. Weiß, Editor. 1999, Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin: Berlin. p. 44-45.
100. Bonthuis, D.J., et al., *Use of frozen sections to determine neuronal number in the murine hippocampus and neocortex using the optical disector and optical fractionator*. Brain Res Brain Res Protoc, 2004. 14(1): p. 45-57.
101. Gardella, D., et al., *Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections*. J Neurosci Methods, 2003. 124(1): p. 45-59.
102. Feng, D., et al., *Ultrastructural localization of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, CD31) in vascular endothelium*. J Histochem Cytochem, 2004. 52(1): p. 87-101.
103. Kuzu, I., et al., *Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours*. J Clin Pathol, 1992. 45(2): p. 143-8.
104. Page, C., et al., *Antigenic heterogeneity of vascular endothelium*. Am J Pathol, 1992. 141(3): p. 673-83.
105. Chang, Y.S., et al., *Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(26): p. 14608-13.

## Literaturverzeichnis

106. Hansen, S., et al., *Angiogenesis in breast cancer: a comparative study of the observer variability of methods for determining microvessel density*. Lab Invest, 1998. 78(12): p. 1563-73.
107. GEKID and RKI, eds. *Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends*. 5 ed. 2006: Saarbrücken. 1-108.
108. Hauff, P. *Die Bedeutung der Kleintierbildgebung für die Erforschung und Entwicklung neuer Arzneimittel*. in *17. VETPHARM-Symposium*. 2007. Freie Universität Berlin.
109. di Tomaso, E., et al., *Mosaic tumor vessels: cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers*. Cancer Res, 2005. 65(13): p. 5740-9.

## 10 ANHANG

### Material und Methoden

Substanz/Material	Produktname	Katalognr.	Firma	Land der Herstellung
Alkohol	Ethanol	1.00983.2500	Merck	Deutschland
Antikörperlösung	antibodydiluent	S2022	Dako-Cytomation	Deutschland
Avidin/Biotin	Biotin Blockierungsreagenz, Lsg. 1 und 2	X0590	Dako-Cytomation	Deutschland
Azeton	Aceton	8002	J.T.Baker	Niederlande
DAB Lösung	Liquid DAB Substrat-Chromogen-System	K3468	Dako-Cytomation	Deutschland
Eindeckmedium	Eukitt	03989	Fluka BioChemica	Deutschland
Eosin Pulver	Eosin Y cerified	E4382	Sigma	Deutschland
Extravidin-Peroxidase-Konjugat	Extravidin-Peroxidase-Konjugat	E2886	Sigma	Deutschland
Färbeautomat	DakoAutostainer	E172566	Dako-Cytomation	Deutschland
Fettstift	DakoCytomation Pen	S2002	Dako-Cytomation	Dänemark
Hämalaun	Mayers Hämalaunlösung	1.09249.0500	Merck	Deutschland
Isotyp (Negativ)kontrolle	IgG2 biotinyliert	553928	BD Pharmingen	Deutschland
Kaninchen-Serum	Normal Rabbit Serum	NS01L	Calbiochem	USA
PBS-Puffer	phosphate buffered saline, 001M, pH 7,4	P-3813	Sigma	Deutschland
Peroxidase Blockierungsreagenz	Peroxidase Blockierungsreagenz	S2001	Dako-Cytomation	Deutschland
Primärantikörper, Ratte-anti-Maus CD31 Antikörper	Pecam-1, purified anti mouse CD31	550274	BD Biosciences Pharmingen	USA
Primärantikörper, biotinylierter Ratte-anti-Maus CD31 Antikörper	Pecam-1	553371	BD Biosciences Pharmingen	USA
Sekundärantikörper, biotinylierter Ziege-anti-Ratte Antikörper	Biotin polyclonal anti rat Ig	559286	BD Biosciences Pharmingen	USA

## Anhang

Substanz/Material	Produktname	Katalognr.	Firma	Land der Herstellung
Sekundär-Antikörper, biotinylierter Kaninchen-anti-Ratte Antikörper	Biotin-SP-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Rat IgG	312-065-008	Jackson Immuno-Research Laboratories	USA
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase	Streptavidin-Horseradish-Peroxidase Pre-diluted	550946	BD Biosciences Pharmingen	USA
TBS Puffer	wash buffer, 10x	S3006	Dako-Cytomation	Deutschland
Toluidin	Toluidinblau O Certistain	1.15930	Merck	Deutschland
Trypsin	Trypsin-Konzentrat	00-3008	Zymed Laboratories	USA
Xylol	Xylol	8.08697.100	Merck	Deutschland
Ziegenserum	Normal Goat Serum	S-1000	Vector-Laboratories Inc.	USA

**Tabelle 11:** Material- und Substanzliste

## Stereologische Bestimmung des Tumorumens und des umliegenden Gewebes

KM	Tumor Nr.	Intervall ( $\mu\text{m}$ )	Schnitt (n)	dx-dy ( $\mu\text{m}^2$ )
AP39-TSC	7	2200	6	9000000
	3	2000	6	9000000
	1	750	8	16000000
	9	1600	6	9000000
	11	1500	6	9000000
	15	890	8	20250000
	17	1600	8	16000000
	19	2175	6	25000000
	14	1450	8	16000000
	26	1870	6	16000000
	28	1730	6	16000000
	37	1430	6	16000000
	31	1830	6	16000000
	34	1330	6	9000000
	29	1680	7	16000000
	41	2100	6	9000000
	46	1480	7	9000000
	39	2500	5	9000000
	38	2700	5	9000000
	42	1700	6	9000000
TSC	6	2100	6	9000000
	13	960	6	9000000
	5	1700	6	9000000
	2	1900	6	9000000
	12	1900	6	9000000
	22	375	7	3240000
	21	2000	7	25000000
	16	1500	7	25000000
	25	1050	8	20250000
	36	300	8	3240000
	30	1530	6	9000000
	33	1260	7	25000000
	27	1280	8	20250000
	32	600	10	9000000
	40	1700	6	9000000
44	1335	8	9000000	
45	2220	6	9000000	

**Tabelle 12:** Die Tabelle stellt Werte für die Berechnung des Tumorumens dar. Für jeden Pankreastumor (Tumornr.) ist der Abstand zwischen den einzelnen Schnitten ( $\mu\text{m}$ ), die Anzahl (n) der Schnitte und Abstand zwischen den Auswertungsfeldern (dx-dy) angegeben. (Zur besseren Übersicht sind in der Tabelle die Kontrastmittel (KM) aufgeführt mit denen die Tiere bzw. Tumore behandelt worden sind.)

## Anhang

### Berechnung der Blutgefäßlänge

KM	Tumornr.	Q	P
AP39-TSC	3	186	212
	11	78	189
	7	72	247
	1	80	259
	9	94	190
	15	116	250
	17	143	453
	19	85	221
	14	128	302
	26	97	337
	28	136	439
	37	70	243
	31	157	445
	34	137	425
	29	137	481
	42	151	267
	38	132	287
	46	219	423
	39	105	203
	41	100	162
TSC	2	310	425
	5	114	193
	13	109	203
	6	121	218
	12	74	184
	22	157	350
	21	137	300
	16	196	457
	25	206	578
	36	259	287
	32	84	311
	30	180	395
	33	97	303
	27	154	464
	45	178	187
44	69	270	
	40	83	117

**Tabelle 13:** Die Tabelle stellt die gezählten Blutgefäßprofile (Q) dar und die Anzahl der Marker (P), die gesetzt worden sind, wenn die Zählrahmenecke intaktes Tumorgewebe geschnitten hat. Beide Werte fließen in die Berechnung der Längendichte  $L_v$  für die erste Auswertung aller Pankreastumore mit ein. (Zur besseren Übersicht sind in der Tabelle die Kontrastmittel (KM) aufgeführt mit denen die Tiere bzw. Tumore behandelt worden sind.)

## Ergebnisteil

## Einfluss der technischen Bearbeitung auf die Schrumpfung des Schnittes

## Bemessung der Fläche des Tumorschnittes vor und nach dem Schneide- und Färbeprozess

Tumor	B		N		S	
	1:x (cm)	P (Nr.)	1:x (cm)	P (Nr.)	1:x (cm)	P (Nr.)
1	1,8	153	1,5	96	1,8	137
2	1,5	106	1,8	135	1,9	149
3	1,5	107	1,7	128	1,7	130
4	1,7	132	1,65	122	1,95	163
5	1,5	107	1,6	114	1,85	142

**Tabelle 14:** Um die Oberflächen des Probenblocks (B), des Nativschnitts (N) und des gefärbten Schnitts (S) auf den Abbildungen mittels Zählgitter ermitteln zu können, mussten der Maßstab der Abbildungen (1:x) und die gezählten Gitterpunkte (P) in die Berechnung einfließen.

## Reproduzierbarkeit der Methode nach Weidner und der Methode mittels stereologischer Werkzeuge

## Ergebnisse der wiederholten Auswertung eines Tumorschnittes nach den Kriterien von Weidner

Tumor Nr.	Arithmetischer Mittelwert der Endresultate der 1. und 2. Auswertung		Differenz der Endresultate der 1. und 2. Auswertung	
	W3mean	W3max	W3mean	W3max
1	67,9	77,3	-19,2	-21,4
2	79,4	90,9	-6,0	3,4
3	188,1	211,1	-45,9	-45,1
4	71,3	107,8	-10,9	3,4
5	137,3	145,6	-28,6	-29,3
6	311,1	334,1	-82,0	-85,8
7	401,2	469,5	108,0	140,0
8	282,2	321,1	-17,3	-14,7
9	415,0	506,8	-39,9	76,7
10	660,8	900,7	93,7	45,1
11	468,8	546,3	-149,7	-101,6

**Tabelle 15:** Der arithmetische Mittelwert und die Differenzen der ersten und zweiten Endergebnisse der W3mean- und W3max-Werte (Blutgefäßanschnitte pro 1 mm<sup>2</sup>) sind aufgeführt und dienen für die Bland Altman Darstellung.

## Ergebnisse der wiederholten Auswertung eines Schnittsets mittels stereologischer Werkzeuge

Zweifache Auswertung des stereologischen Sets 1		
Tumor Nr.	Mittelwert 1 mm <sup>2</sup>	Differenz 1 mm <sup>2</sup>
1	77,9	12,5
2	61,0	-13,6
3	115,8	14,5
4	66,2	20,6
5	104,7	-3,8
6	412,6	-61,3
7	447,5	-23,1
8	401,3	22,9
9	454,3	-28,9
10	531,2	34,6
11	366,3	7,6

**Tabelle 16:** Der Mittelwert und die Differenz wurde für jeden Tumor aus den Werten der ersten und zweiten Auswertung (Blutgefäßprofile pro 1 mm<sup>2</sup>) für die Bland Altman Darstellung errechnet.

## Anhang

### Quantifizierung pathomorphologischer Strukturen in experimentellen Pankreas-tumoren mittels stereologischer Methoden

a) Gruppe 1

KM	Mausnr.	Tumorkontrast
AP39-TSC	7	6,00
	3	5,30
	1	2,06
	9	3,36
	11	4,70
	15	3,77
	17	7,16
	19	5,09
	14	8,96
	26	6,23
	28	7,49
	37	7,09
	31	4,86
	34	6,51
	29	7,87
	41	10,46
	46	7,89
	39	7,48
	38	10,07
42	8,77	
<b>Mittelw.±St.abw.</b>		<b>6,56±2,21</b>

b) Gruppe 2

KM	Mausnr.	Tumorkontrast
TSC	6	1,14
	13	1,46
	5	1,78
	2	1,87
	12	2,41
	22	0,72
	21	1,18
	16	0,87
	25	1,36
	36	0,33
	30	0,76
	33	0,48
	27	0,96
	32	0,75
	40	1,79
	44	1,64
45	1,09	
<b>Mittelw.±St.abw.</b>		<b>1,21±0,56</b>

**Tabelle 17:** Tabelle a zeigt die Tumorkontrastwerte des spezifischen Kontrastmittels (KM) AP39-TSC, Tabelle b die des unspezifischen KM TSC. In beiden Tabellen sind die Mittelwerte (Mittelw.) und die Standardabweichungen (Stabw.) der Kontrastwerte aufgeführt.

KM	Tumor	relatives Volumen (%)		totales Volumen (mm <sup>3</sup> )		
Gruppe	Nr.	Nekrose	Vital	Tumor	Nekrose	Vital
AP39-TSC	7	63,26	36,74	1296,90	820,46	476,44
	3	62,03	37,97	799,87	496,12	303,75
	1	44,93	55,07	170,25	76,50	93,75
	9	54,98	45,02	469,80	258,30	211,50
	11	54,64	45,36	472,50	258,19	214,31
	15	48,97	51,03	273,72	134,04	139,67
	17	57,54	42,46	806,40	464,00	342,40
	19	66,32	33,68	968,55	642,30	326,25
	14	51,82	48,18	598,85	310,30	288,55
	26	55,21	44,79	609,62	336,60	273,02
	28	41,98	58,02	679,89	285,45	394,44
	37	41,99	58,01	401,83	168,74	233,09
	31	59,91	40,09	794,22	475,80	318,42
	34	25,80	74,20	327,68	84,54	243,14
	29	55,63	44,37	776,16	431,76	344,40
	41	49,16	50,84	980,44	481,95	498,49
	46	55,22	44,78	574,42	317,18	257,24
	39	45,11	54,89	632,81	285,47	347,34
	38	40,08	59,92	750,26	300,71	449,55
	42	51,34	48,66	607,22	311,74	295,48
TSC	6	60,18	39,82	904,84	544,56	360,28
	13	62,35	37,65	446,04	278,10	167,94
	5	71,63	28,37	886,44	634,95	251,49
	2	64,32	35,68	865,69	556,82	308,87
	12	65,05	34,95	681,86	443,53	238,33
	22	24,86	75,14	13,44	3,34	10,10
	21	70,02	29,98	1271,87	890,62	381,25
	16	53,54	46,46	696,09	372,66	323,44
	25	49,57	50,43	616,61	305,65	310,96
	36	19,38	80,62	7,84	1,52	6,32
	30	46,36	53,64	568,01	263,35	304,66
	33	44,16	55,84	454,78	200,81	253,97
	27	49,76	50,24	664,20	330,48	333,72
	32	29,69	70,31	98,89	29,36	69,52
	40	67,34	32,66	893,14	601,48	291,66
	44	56,80	43,20	684,85	388,99	295,87
	45	55,69	44,31	1042,71	580,67	462,04

**Tabelle 18:** In der Tabelle sind die stereologisch ermittelten Volumina der Gruppe 1 (AP39-TSC) und der Gruppe 2 (TSC) aufgeführt. Zum einen wird das totale Volumen des gesamten Tumors und der nekrotischen und intakten Bereiche für jeden Tumor aufgeführt. Zum anderen wird das relative Volumen der nekrotischen und intakten Tumorbereiche des jeweiligen Tumors prozentual angegeben.

## Anhang

### Fehlerkoeffizient CE und Variationskoeffizient CV für das gesamte und vitale Tumolvolumen

Die Gesamtsumme der Auszählungen pro Tumorschnitt erhält man aus der Summe der intakten und nekrotischen Zählungen. In dieser Studie wurde die Gesamtsumme pro Schnitt pro Tumor benötigt, um den CE Wert für das Gesamtvolumen des Tumors zu bestimmen. Zusätzlich wird die Gesamtpunktzahl zur Berechnung des Gesamtvolumens des Tumors benötigt.

KM	Tumornr.	Fehlerkoeffizient CE	
	Nr.	totales Volumen	intaktes Volumen
AP39-TSC	7	0,013	0,023
	3	0,015	0,026
	1	0,033	0,050
	9	0,029	0,033
	11	0,025	0,034
	15	0,028	0,046
	17	0,017	0,032
	19	0,027	0,055
	14	0,020	0,033
	26	0,024	0,040
	28	0,021	0,029
	37	0,025	0,036
	31	0,020	0,037
	34	0,022	0,025
	29	0,030	0,042
	41	0,013	0,020
	46	0,015	0,024
	39	0,029	0,032
	38	0,021	0,024
	42	0,015	0,024
TSC	6	0,014	0,023
	13	0,015	0,024
	5	0,013	0,026
	2	0,013	0,025
	12	0,018	0,033
	22	0,035	0,044
	21	0,020	0,050
	16	0,024	0,042
	25	0,019	0,031
	36	0,045	0,052
	30	0,016	0,023
	33	0,030	0,046
	27	0,022	0,037
	32	0,026	0,033
	40	0,026	0,035
44	0,012	0,022	
45	0,014	0,026	

**Tabelle 19:** Die Fehlerkoeffizienten CE der einzelnen Tumore der beiden Gruppen (AP39-TSC und TSC) sind für das totale Tumolvolumen und für das intakte Tumolvolumen aufgeführt.

KM Gruppe	Tumor Nr.	Anzahl der Punktzählungen für intaktes Tumorgewebe pro Schnitt										Summe intakt
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
AP39- TSC	7	53	70	93	69	78	22					385
	3	36	52	74	65	38	5					270
	1	0	17	33	16	28	11	8	12			125
	9	48	54	34	16	48	35					235
	11	51	67	53	41	4	38					254
	15	10	11	25	26	20	20	9	3			124
	17	12	22	41	60	34	32	13	0			214
	19	3	25	17	25	20	6					96
	14	10	42	46	35	33	21	8	4			199
	26	28	52	41	19	6	0					146
	28	38	62	57	47	21	3					228
	37	22	33	47	40	21	0					163
	31	11	51	39	44	22	7					174
	34	28	92	77	81	42	5					325
	29	1	22	45	70	21	45	1				205
	41	43	61	109	108	64	37					422
	46	2	44	78	76	65	41	3				309
	39	12	76	89	68	2						247
	38	34	72	96	75	19						296
	42	30	52	47	73	65	42					309
TSC	6	16	57	79	82	56	15					305
	13	24	47	65	91	70	14					311
	5	40	62	65	54	34	8					263
	2	15	52	78	62	59	23					289
	12	15	34	39	36	43	56					223
	22	1	25	35	20	22	21	9				133
	21	9	27	16	36	18	16	0				122
	16	20	21	27	22	17	18	13				138
	25	12	40	29	38	40	47	28	0			234
	36	2	4	13	23	21	16	16	9			104
	30	56	66	63	62	70	37					354
	33	19	23	15	24	23	24	1				129
	27	43	35	46	22	25	18	5	12			206
	32	9	19	25	26	29	28	21	23	19	7	206
	40	73	34	77	79	23	19					305
44	37	58	104	96	51	35	3	10			394	
45	21	35	126	99	57	32					370	

**Tabelle 20:** Die Tabelle stellt die Einzelergebnisse der Schnitte pro Tumor beider Gruppen (AP39-TSC und TSC) dar. Die Summe der gezählten Punkte für das intakte Gewebe setzt sich aus den Ergebnissen der einzelnen ausgezählten Tumorgewebeschnitte zusammen. Die insgesamt ausgewertete Schnittanzahl pro Tumor liegt zwischen 5-10 Schnitten. Die Einzelergebnisse werden zur Ermittlung des CE (coefficient of error) benötigt und für die Bestimmung des Tumolvolumens des intakten Gewebes.

## Anhang

KM	Tumor	Anzahl der Punktzählungen für nekrotisches Tumorgewebe pro Schnitt										Summe
Gruppe	Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Nekrose
AP39-TSC	7	19	74	162	208	152	48					663
	3	32	92	116	115	78	8					441
	1	0	21	19	21	22	7	8	4			102
	9	75	54	28	9	74	47					287
	11	54	86	79	50	4	33					306
	15	4	8	17	31	23	15	15	6			119
	17	24	46	52	50	59	42	17	0			290
	19	0	22	53	73	31	10					189
	14	31	44	46	47	28	16	0	2			214
	26	7	36	47	52	38	0					180
	28	32	36	39	39	18	1					165
	37	10	35	33	31	9	0					118
	31	7	47	84	72	43	7					260
	34	5	27	30	33	17	1					113
	29	1	62	66	42	28	58	0				257
	41	9	59	63	103	127	47					408
	46	12	58	67	94	75	62	13				381
	39	8	85	58	50	2						203
	38	19	41	79	56	3						198
42	14	59	81	82	63	27					326	
TSC	6	61	106	113	116	58	7					461
	13	24	137	135	117	82	20					515
	5	60	118	179	155	128	24					664
	2	65	117	132	120	72	15					521
	12	3	51	80	95	109	77					415
	22	0	6	6	16	9	3	4				44
	21	33	36	51	64	66	29	6				285
	16	7	28	36	37	32	12	7				159
	25	16	31	42	40	52	34	15	0			230
	36	0	1	7	2	5	6	4	0			25
	30	44	60	69	80	42	11					306
	33	10	17	16	26	23	9	1				102
	27	12	31	42	51	37	27	0	4			204
	32	8	13	9	19	14	12	8	2	1	1	87
	40	164	82	119	142	88	34					629
	44	55	79	94	88	99	67	35	1			518
45	37	69	102	118	97	42					465	

**Tabelle 21:** Die Tabelle stellt die Einzelergebnisse der Schnitte pro Tumor beider Gruppen (AP39-TSC und TSC) dar. Die Summe der gezählten Punkte für das nekrotische Gewebe setzt sich aus den Ergebnissen der einzelnen ausgezählten Tumorgewebeschnitte zusammen. Die insgesamt ausgewertete Schnittanzahl pro Tumor liegt zwischen 5-10 Schnitten. Die Punktzahl wird zur Berechnung des nekrotischen Tumolvolumens benötigt.

KM	Maus	Blutgefäße innerhalb des vitalen Tumorgewebes	
Gruppe	Nr.	Länge $L$ (m)	Diffusionsradius $r$ ( $\mu\text{m}$ )
AP39-TSC	3	74,85	35,94
	11	24,84	52,40
	7	39,01	62,35
	1	8,13	60,57
	9	29,39	47,86
	15	18,20	49,42
	17	30,36	59,92
	19	35,24	54,28
	14	34,35	51,71
	26	22,07	62,75
	28	34,32	60,48
	37	18,86	62,72
	31	31,55	56,68
	34	22,01	59,29
	29	27,55	63,08
	42	46,94	44,76
	38	58,08	49,64
	46	37,41	46,79
	39	50,46	46,81
	41	86,43	42,85
TSC	2	63,28	39,42
	5	41,72	43,80
	13	25,33	45,94
	6	56,17	45,19
	12	26,92	53,08
	22	1,27	50,26
	21	48,90	49,82
	16	38,96	51,40
	25	31,13	56,39
	36	1,60	35,44
	32	5,27	64,77
	30	39,00	49,87
	33	22,84	59,50
	27	31,11	58,43
	45	123,53	34,50
	44	21,24	66,59
40	58,11	39,97	

**Tabelle 22:** Die Tabelle zeigt die stereologisch ermittelte, Blutgefäßlänge  $L$  und den Diffusionsradius der Gefäße  $r$  innerhalb des vitalen Tumorgewebes für jeden der pankreatischen Tumore beider Gruppen (AP39-TSC und TSC).

## Danksagung

### Ich möchte mich ganz herzlich bedanken bei:

**Herrn Dr. Peter Hauff** für seine hervorragende Betreuung, wissenschaftliche Anleitung und Förderung sowie dafür, dass er immer Zeit für mich gefunden hat;

**Herrn Prof. Dr. Jens Randel Nyengaard** für seine exzellente Betreuung und wissenschaftliche Anleitung sowie für seine kostbaren Anregungen;

**Herrn Prof. Dr. Hans-Jorgen Gundersen** für die fruchtbaren und wertvollen Diskussionen;

**Frau PD Dr. Anja Sterner-Kock, Herrn Prof. Dr. Matthias Bräutigam** und **Herrn Univ.-Prof. Dr. Karl Dietrich Weyrauch** für die Begutachtung dieser Arbeit;

**Frau Nicole Müller** für ihre praktische Unterstützung bei den *in vitro* Versuchen;

**Frau Helene Andersen** und **Herrn John Svane Jensen** für die motivierte praktische Unterstützung bei der Umsetzung der Isotropie Theorie;

**Frau Dr. Sonja Vollmer, Herrn Robert Ivkic, Fr. Annett Rexin, Herrn Dr. Arne Scholz** für die Kooperationsbereitschaft und praktische Unterstützung bezüglich des *in vivo* Versuchs;

**Herrn Hannes-Friedrich Ulbrich** und **Frau Dr. Gisela Arndt** für die statistische Beratung;

**Frau Sabina Bassow** und **Frau Dr. Anna-Lena Frisk** für die fachlichen Ratschläge und die Benutzung des Färbeautomaten;

**Frau Sabine Mofina, Frau Christine Morgenroth, Herrn Stefan Wisniewski, Herrn Dr. Frank Scholle** und **Herrn Jens Jeschke**, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen;

**Herrn Dr. Holger Hess-Stumpff** und **Herrn Dr. Alexander Wall** für die Tumorproben;

**Herrn Dr. Jens Hoffmann** für sein Verständnis und seine Unterstützung

Allen **Mitarbeitern** der ehemaligen **Abteilung Optical Imaging and New Modalities Research der Bayer Schering Pharma AG** und dem **Forschungslabor für Stereologie und Elektronenmikroskopie und MIND Center der Universität Arhus** für die Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Freundlichkeit, die mir stets entgegengebracht worden ist.

Der **Schering Stiftung** und der **Marie Curie Fellowship Association** für die Stipendien.

Mein großer Dank privater Natur geht an **Hildegard, Bernd, Karin, Dietmar, Susi, Pia** und **Pawel**, die bei der Betreuung meines Hundes mitgeholfen haben; **Natalie** und **Eva**, die mühevoll diese Arbeit Korrektur gelesen haben; **Familie Norgaard**, die mir während meines Auslandsaufenthalts eine Familie und ein zu Hause gegeben hat, und **Susanne** und **Liza** für ihre motivierende Unterstützung.

Mein besonderer und liebevoller Dank geht an **Manu** für sein unermüdliches Verständnis, seine grenzenlose Unterstützung und dafür, dass er immer für mich da war.

### **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 4. 11. 2008

Silke Anja Müller