

3. Material und Methode

3.1. Patientenanzahl und Untersuchungszeitraum

Das Krankengut der Arbeit umfasst die im Zeitraum 1991 bis 1995 an der Universitätsklinik und Poliklinik für Urologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg nephrektomierten Patienten mit dem histologischen Nachweis eines lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms.

Nach der Fixierung der Präparate in vierprozentiger Formalinlösung wurden diese in Paraffin eingebettet. Alle Präparate wurden entsprechend dem aktuellen TNM-System der UICC von 2003 (Wittekind et. al. 2003) nachbefundet.

Das Patientenalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ergab sich aus dem Geburtsdatum und dem Operationsdatum. Zur Ermittlung der Überlebenszeit wurden die Daten des Follow-up verwendet.

Alle 70 Nierentumoren wurden unter Berücksichtigung des histologischen Zelltyps und des Kerngradings nach Fuhrmann (Fuhrman et. al. 1982) sowie der aktuell verbindlichen TNM-Stadieneinteilung (UICC 2003) nachklassifiziert. Um eine möglichst homogene Gruppe von Nierentumoren für die statistische Analyse zu haben, stützte sich die Auswertung auf die Gruppe der hellzelligen Tumoren (n=61).

3.2. Morphologie

Die Klassifizierung der Nierentumoren entsprechend den histologischen Eigenschaften erfolgt gegenwärtig nach Kriterien welche erstmals von Mostofi (Mostofi, Davis 1981) aufgestellt und dann durch Thoenes und Störkel (Thoenes et.al.1986, Störkel, Jakobi 1989) weiterentwickelt wurden. Der vorliegenden Arbeit liegt die 2004 vom American Registry of Pathology (Murphy et. al. 2004) herausgegebene Einteilung der Nierentumoren zugrunde. Histologisch werden klarzellige, papilläre und chromophobe Nierenzellkarzinome unterschieden.

Tab.3: Histologisches Erscheinungsbild

Histologie	Schnittfläche	Zytoplasma	Kern	Charakteristika
klarzellig	Gelb bis grauweiß	hell, klar	klein	kompaktes Wachstumsmuster, selten zystisch
Papillär	Bunt	Typ1:basophil kleine Zellen Typ2:eosinophil große Zellen	Typ1: klein Typ2: groß	häufig Blutungen und Nekrosen, Makrophagen mit Lipideinlagerungen
Chromophob	Braun	opak, feinretikulär	voluminös, zentral	solides Wachstumsmuster, kräftige Hale'sche Reaktion

3.3. Grading

Bei der Beurteilung des Grading nach Fuhrman (Fuhrman et. al. 1982) wird der nukleäre Atypiegrad (leicht, mäßig, schwer) sowie der histologische Differenzierungsgrad bzw. der Verlust charakteristischer histologischer Merkmale beurteilt. Dabei werden Kerngrößen und -formen, Kern-Plasma-Relationen, Mitoseraten und Chromasiegrade beurteilt.

Tab.4.: Grading (Fuhrman)

Grad	Kerngröße	Kernform	Chromatin	Nukleolen
1	<10 µm	rund	dicht	unauffällig
2	15 µm	rund	fein granulär	klein
3	20 µm	rund/oval	grob granulär	prominent

3.4. TNM-Stadium

Die Festlegung des TNM-Stadiums erfolgte nach dem im Jahre 2003 aktualisierten TNM-System (UICC 2003). Dazu mussten alle Tumoren nachbefundet werden. Der wesentliche Unterschied zur Version von 1997 ist die Festlegung der Tumorgöße von bis zu 4 cm für das T1a-Stadium und 4-7 cm im Stadium T1b. Einige Autoren (Minervini et al.2005, Salama et al.2005) haben der neuen TNM-Version bereits eine signifikant bessere Korrelation zwischen Tumorstadium und Überlebenszeit bescheinigt.

T-Stadium(Primärtumorausdehnung)

- T1a Tumor ist im größten Durchmesser 4 cm oder weniger groß, begrenzt auf die Niere
- T1b Tumor ist im größten Durchmesser größer als 4 cm und kleiner als 7 cm, begrenzt auf die Niere
- T2 Tumor ist im größten Durchmesser mehr als 7 cm groß, begrenzt auf die Niere
- T3a Tumor infiltriert perirenales Gewebe oder die Nebenniere, aber nicht jenseits der Gerotaschen Faszie und makroskopisch nicht in Gefäße
- T3b Tumor breitet sich in die Vena renalis oder in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells aus
- T3c Tumor breitet sich in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells aus
- T4 Tumor wächst über die Gerotasche Faszie hinaus

N-Stadium (Lymphknotenbefall)

- N0 kein Befall regionärer Lymphknoten
- N1 Metastase in solitärem Lymphknoten, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- N2 Metastase in solitärem Lymphknoten mehr als 2cm aber weniger als 5 cm groß oder Metastasen in multiplen Lymphknoten, aber keine mehr als 5 cm groß
- N3 Metastase in Lymphknoten mehr als 5 cm in größter Ausdehnung

M-Stadium (Fernmetastasen)

- M0 keine Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen

3.5. Die Bestimmung der Mikrogefäßdichte

Die mit dem CD31-Antikörper (Clone JC-70A, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) immunhistochemisch angefärbten Präparate wurde zunächst mit Hilfe eines computergestützten Bildanalyseprogramms hinsichtlich ihrer Mikrogefäßdichte untersucht. In gleicher Sitzung erfolgte die manuelle Auszählung der Mikrogefäße im Tumor am Lichtmikroskop. Für die computergestützte Bildanalyse kam das Programm analySIS V 3.0 der Firma soft imaging system Münster, Deutschland zum Einsatz. Es wurde ein Standard-PC mit einer an ein Lichtmikroskop angeschlossenen Videokamera verwendet. Dasselbe Mikroskop wurde auch zur manuellen Auszählung eingesetzt.

Bei der computergestützten Bildanalyse wird das Abbild des immunhistochemisch gefärbten Präparates mit einer Videokamera in den Bildspeicher des Analyseprogramms übertragen. Der Untersucher wählt hier das zu messende Areal aus, das entsprechend den Kriterien von Weidner (1995) das Areal mit der höchsten Tumorgefäßdichte ist. Dieses wird dann in den Bildspeicher übernommen. Im ersten Meßabschritt erfolgt die Festlegung der Meßfeldgröße anhand der Vergrößerungsdaten am Mikroskop. Die Größe des Messfeldes betrug in der vorliegenden Arbeit 0,17 mm². Die Bildübertragung erfolgt in Realfarben, d.h. es tritt durch die Übertragung keine Veränderung von Farben oder Kontrasten auf.

Die immunhistochemische Reaktion der Endothelzellen mit dem CD31-Antikörper ergibt eine sehr kontrastreiche, intensiv rote Anfärbung der markierten Gefäße, so dass sich am Computerbildschirm gute Farbkontraste ergeben.

Vor der Analyse der einzelnen Mikrogefäße werden diese farblich detektiert. Dieses geschieht mit Hilfe eines Farbschwellwertfilters. Die farbige Detektierung der Mikrogefäße ist in Abb.1 (Seite 12) dargestellt. So können Schwellenwerte hinsichtlich der immunhistochemischen Positivität der Endothelstrukturen für jedes einzelne Präparat gesetzt werden.

Kontrastunterschiede zwischen den einzelnen Präparaten werden auf diese Weise ausgeglichen.

Die im Analyseprogramm zahlreich vorhandenen Funktionen zur Kontrastverbesserung (Lichtfilter, Raster, Trennschärferegler) wurden nicht eingesetzt, da sie nicht zu einer verbesserten Detektierung der Endothelstrukturen führten. Die Untersuchung erfolgte immer unter standardisierten Bedingungen.

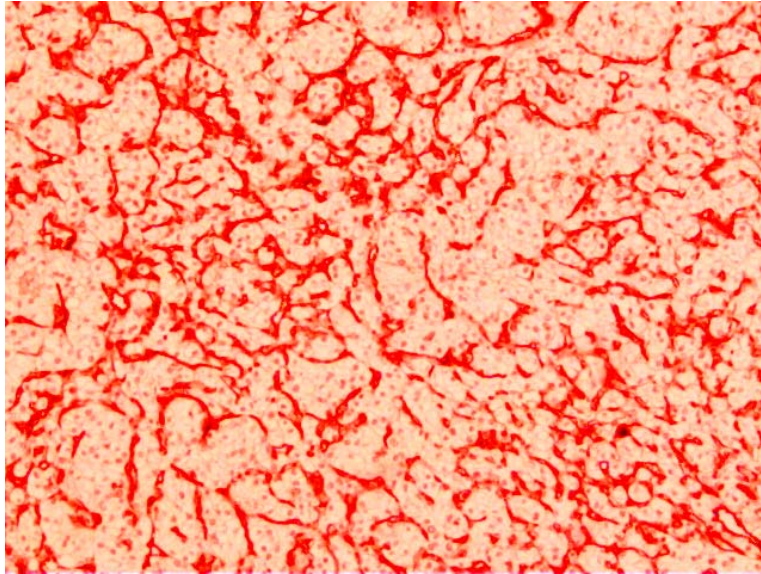


Abb. 1 : Die Abbildung zeigt ein Computerbild, nachdem die immunhistochemisch markierten Gefäße vom Analyseprogramm mit Hilfe eines Farbschwellwertfilters rot markiert sind. Ein rotes Areal wird bei der Messung als ein Tumorgefäß erkannt.

Ausgehend von der mittleren Größe einer Endothelzelle von $10\ \mu\text{m}$ wird ein Größenfilter gesetzt, welcher Artefakte (z.B. Zellkerne) ausschließen soll. Analog zum Messraster erfolgt die Detektierung von Kantenschnittpunkten nur an 2 der 4 Meßfensterkanten.

Nun werden die Meßgrößen nach folgenden Kriterien definiert: Anzahl der Partikel, Flächenanteil der Partikel, mittlere Fläche eines Partikels und mittlerer Durchmesser eines Partikels.

Nach Durchführung der Messung wird am selben Bildausschnitt die manuelle Messung durchgeführt. Die manuelle Auszählung erfolgt bei 200facher Vergrößerung (Objektiv 20x, Okular 10x) auf einer Meßfeldgröße von $0,25\ \text{mm}^2$. Diese Schritte wurden am jeweiligen Präparat zehn mal wiederholt. Bei einer Meßfeldgröße von $0,25\ \text{mm}^2$ waren 10 auswertbare, repräsentative Areale in allen Schnitten einstellbar. Deshalb wurde die Anzahl der Messungen pro Tumor auf 10 festgelegt. Schwankungen der Tumorgefäßdichte werden so ausgeglichen. Das Analyseprogramm bietet bereits die Möglichkeit der Mittelwertberechnung für jedes Präparat.

Die Bestimmung der Mikrogefäßdichte am immunhistochemisch gefärbten Präparat erfolgt in modifizierter Form nach den von Weidner (Weidner et al. 1991, 1993) inaugurierten Kriterien.

Die Einhaltung dieser Kriterien ist besonders für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wichtig. Die Kriterien von Weidner (1995) bedeuten im Einzelnen:

1. Alle histologischen Präparate eines Tumors werden untersucht, und ein Präparat mit einem repräsentativen Tumoranteil wird ausgewählt.
2. Vom Paraffinblock dieses Tumoranteils wird ein ca. 5µm dickes Präparat angefertigt, welches zur immunhistochemischen Aufarbeitung gelangt.
3. Das Präparat wird mit einem Endothelmarker (hier anti-CD 31, auch CD34, anti-Faktor VIII u.a.) immunhistochemisch angefärbt, um die Mikrogefäßdichte sichtbar zu machen. Der CD31-Antikörper hat sich wegen seiner hohen Sensitivität und guten Kontrastgebung bewährt. Nur Präparate, welche eine intensive Kontrastierung der Mikrogefäße zeigen werden in die Untersuchung einbezogen.

Deshalb wird ein hoher Qualitätsstandard beim Anfärben der Präparate gefordert.

4. Das immunhistochemische Präparat wird zunächst bei niedriger Vergrößerung (ca. 40fach) durchgemustert und jeweils das Tumoreal mit der höchsten Mikrogefäßdichte (sog. „hot-spot“) bestimmt. Es sollten möglichst keine Degenerations- oder Sklerosezonen, Nekrosen oder Blutungen im Untersuchungsfeld enthalten sein. Nicht tumortragendes Nierengewebe kann zur Beurteilung der Färbequalität herangezogen werden.
5. Alle Mikrogefäße innerhalb des „hot-spots“ werden bei 200facher Vergrößerung und somit auf einer Fläche von mindestens 0,74 mm² bestimmt. Jede rot kontrastierte Endothelzelle und jedes Endothelzell-„Nest“, welches klar von anderen Endothelstrukturen abgrenzbar war, wurde als einzelnes Mikrogefäß gezählt. Ein Gefäßlumen war für die Bestimmung nicht erforderlich.

3.6. Statistische Methoden

Es kamen insgesamt die Daten von 70 Patienten mit lokal begrenztem Nierenzellkarzinom zur Auswertung. Für die bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde jedoch die Gruppe der 61 klarzelligen Karzinome ausgewählt. Die Patientendaten wurden EDV-gerecht verschlüsselt, erfasst und an einem PC mit dem Statistikprogramm SPSS Version 11.0 bearbeitet. Bei der Analyse der untersuchten Parameter entstanden meist sehr kleine Gruppen. Deshalb erfolgte die Beurteilung der Daten mit den Mitteln der deskriptiven Statistik. Auf eine statistische Bewertung im Sinne einer Signifikanz wurde weitgehend verzichtet.

Zur Beschreibung der Verteilung der quantitativen Merkmale wurden statistische Messzahlen berechnet:

- der arithmetische Mittelwert
- die Standardabweichung
- Minimal- und Maximalwert zur Charakterisierung der Streuung
- Konfidenzintervalle der Mittelwerte
- Graphische Darstellung mit Boxplots

Für die qualitativen Merkmale wurden die Häufigkeiten der Werte in Histogrammen dargestellt.

Die qualitativen Merkmale wurden mit der Kontingenztafelmethode und dem parameterfreien Chi²-Test ausgewertet. Die Nullhypothese H_0 geht von der Gleichverteilung der Merkmale in den einzelnen Gruppen aus. Bei Überschreitung des Tafelwertes durch den errechneten Chi²-Wert muss die Nullhypothese abgelehnt werden, es bestehen signifikante Unterschiede in den Häufigkeitsverteilungen zwischen den Gruppen. Für alle Berechnungen wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit alpha mit 5 % festgelegt. Die Freiheitsgrade berechnen sich zu $FG(k-1)(m-1)$, wobei k die Anzahl der Spalten und m die Anzahl der Zeilen der Kontingenztafel sind. Im Falle der Ablehnung der Nullhypothese gibt der Kontingenzkoeffizient Hinweise auf die Stärke des Zusammenhangs.

Zum Vergleich der Mittelwerte von Messwerten für einzelne Gruppen wurden zunächst mit dem F-Test geprüft, ob die Varianzen gleich sind. War dies der Fall, so wurden Mittelwertvergleiche mit dem t-Test nach Student durchgeführt. Bei Inhomogenität der Varianzen wurden die Mittelwerte mit dem t-Test nach Welch verglichen. Beide Tests setzen die Normverteilung der Messwerte voraus, die ggf. überprüft werden muss. Die Nullhypothese bedeutet in beiden Fällen die Gleichheit der Mittelwerte. Bei Überschreitung des Grenzwertes durch die Prüfgröße wird die Nullhypothese abgelehnt, es bestehen signifikante Unterschiede. Zur Untersuchung der Vergleichbarkeit der beiden verwendeten Meßmethoden wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt (Sachs 1992).

Ziel der Arbeit war zusätzlich die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen den klinischen und histologischen Daten der Patienten und der Überlebenszeit. Für diese Aufgabenstellung wurde die Life-Table-Analyse verwendet. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode geschätzt. Die statistische Bewertung erfolgte mit dem log-rank Test.