

1 Einleitung

"Die tragenden Säulen der Diagnostik des Morphologen sind Erfahrung und Kunst". Die Bewertung gestaltlicher Kriterien ist jedoch häufig subjektiven Einflüssen unterworfen, wodurch die Einführung objektiver Kriterien notwendig wird (SANDRITTER, 1973).

Die Unzulänglichkeit der subjektiven Beurteilung, hier allgemein formuliert, wird insbesondere hinsichtlich der Gradierung der Harnblasentumoren von mehreren Arbeitsgruppen als hinreichende Begründung für die Einführung morphometrischer Methoden in die Diagnostik herangezogen.

So betonte KOSS (1979), daß bei der Beurteilung zytologischer Präparate von Patienten mit Harnblasentumoren erhebliche individuelle und selbst intraindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Bewertung verschiedener Atypiegrade zu beobachten seien.

TRIBUKAIT et al. (1979) unterteilten Grad 2 Tumoren zytophotometrisch und histologisch in zwei Gruppen mit stärkerer und leichterer Atypie. Die Wiederholung der histologischen Untersuchung führte danach in lediglich 80 % der Fälle zu einer Übereinstimmung mit der ersten Diagnose.

Ungünstiger sieht das Ergebnis anderer Experimente aus (OOMS, 1981; OOMS et al, 1983a). Bei der Mehrfachuntersuchung einer Serie von 75 Harnblasentumoren gradierten die einzelnen Pathologen die Schnittpräparate in etwa

der Hälfte der Fälle abweichend von ihrer ersten Diagnose. Diese Inkonsistenz drohe jede Gradierung und subjektive Diagnostik zu entwerten, wie die Autoren vermerkten.

Die Erfahrung, deren Bedeutung SANDRITTER (1973) hervorhebt, muß angesichts einer zunehmenden Zahl von Klassifikationen neoplastischer und nicht neoplastischer Krankheiten in regelmäßiger Übung erworben und bewahrt werden.

Die Morphometrie ersetzt diese Erfahrung nicht. Sie bietet jedoch eine Abstützung der nach morphologischen Kriterien erstellten Beurteilung und hilft, den Wert oder Unwert dieser Kriterien zu ermitteln.

In diesem Sinne wird in der vorgelegten Arbeit versucht, morphologische Erscheinungen und morphometrische Parameter miteinander zu verknüpfen.

Ziel der Arbeit ist es, die formale Pathogenese des Blasenkarzinoms im experimentellen Ansatz darzustellen. Insbesondere die Frühveränderungen des experimentellen Blasenkarzinoms sollen konventionell licht- und elektronenmikroskopisch sowie DNS-zytometrisch und karyometrisch erfaßt und beschrieben werden.

Die Formenvielfalt des menschlichen Harnblasenkarzinoms gilt es, mit den gleichen Methoden darzustellen.

Auf der Grundlage vergleichbarer Meßwerte wird sodann der Versuch unternommen, Parallelen zwischen experimen-

tellem Modell und menschlicher Krankheit aufzuzeigen, und so Erfahrungen der Humanpathologie auf das Experiment zu übertragen sowie andererseits aus dem Tiermodell das biologische Potential der morphologischen Veränderungen des Übergangsepithels der menschlichen Harnblase verstehen zu lernen.

2 Material und Methoden

2.1 Experimentelle Harnblasentumoren

2.1.1 Versuchstiere

28 männliche und 44 weibliche wistar-Ratten (Landeszuchtanstalt Hannover) werden im Tierversuch eingesetzt. Die Tiere wiegen bei Versuchsbeginn 180 - 200 g. Sie werden zu je 4 in Makrolon-Käfigen (Ehret) gehalten. Standardfutter (Herilan, Eggersmann) wird ad libitum verfüttert. Die Haltung erfolgt in klimatisierten Räumen mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 zu 12 Stunden.

2.1.2 Versuchsplan

Zur Tumorinduktion erhalten die Tiere N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl)nitrosamin (BBN) - Synthese: Prof. Dr. R. PREUSSMANN, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg - als 0,05 Vol.-%ige Lösung im Trinkwasser gleichfalls ad libitum aus 700 ml Trinkflaschen (Ehret). Die durchschnittliche Trinkmenge pro Tier betrug über die gesamte Versuchsdauer 21,0 ml pro Tag.

In Serie 1 erhalten die männlichen Tiere BBN bis zur maximal 12. Woche. Beginnend mit der 2. Woche werden jeweils 4 Tiere in zweiwöchigen Abständen getötet. Die Serie schließt 4 Kontrolltiere ein.

In Serie 2 erhalten die weiblichen Tiere BBN bis zur 30. Woche. 36 Tiere erhalten BBN bis zur 18. Woche. Nach der 2. Woche und sodann in Abständen von 2 Wochen werden jeweils 4 Tiere getötet. Die 10. Gruppe von 4 Tieren erhält BBN über 30 Wochen. Auch in der Serie 2 werden 4

Kontrolltiere untersucht.

Nach einer Verfütterung von BBN über die Zeiträume zwischen 2 und 12 Wochen (Serie 1) bzw. 2 bis 18 Wochen und nach 30 Wochen (Serie 2) folgt jeweils ein kanzerogen-freies Intervall von 2 Wochen vor der Tötung.

2.1.3 Perfusionsfixierung

Die Harnblasen der männlichen Tiere (Serie 1) werden ausschließlich für die elektronenmikroskopische Untersuchung vorbereitet.

In tiefer Narkose durch Nembutal (Abbot) in Überdosierung intraperitoneal erfolgt die Perfusionsfixierung nach Eröffnung des Thorax über den Aortenbogen.

Vorspülung: Injektion von 1000 IE Heparin (Liquemin, Roche oder Thrombophob, Nordmark) in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2 bis zur weitgehenden Entblutung.

Fixierung: 2,5 % Glutaraldehyd (Merck) im gleichen Cacodylatpuffer.

Perfusionsdruck: 120 mmHg.

Perfusionsdauer: 5 - 7 min.

Gleichzeitig mit der Perfusionsfixierung erfolgt eine Instillation von 0,5 ml der Fixierlösung in die Harnblase über die Urethra.

Die Harnblasen werden nach Entnahme in Sagittalebene zerteilt und über 3 bis 4 Stunden nachfixiert.

Die Harnblasen je 3 der weiblichen Tiere (Serie 2) wer-

den kombiniert licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.

Zur optimalen Fixierung für die DNS- Zytometrie wird mit dem von MCDOWELL (1978) empfohlenen, gepufferten Formalin-Glutaraldehyd-Gemisch perfundiert.

Vorspülung: 0,1 N-Phosphatpuffer pH 7,2 und
1000 IE Heparin.

Perfusionsfixierung: 1 % Glutaraldehyd (Merck).
4 % Paraformaldehyd (Merck) in
0,1 M Natriumphosphatpuffer (monobasisch), pH 7,2.

Die fixierten Harnblasen werden nach Entnahme halbiert und in der Fixierlösung 3 - 4 Stunden nachfixiert.

2.1.4 Zytologie

Je ein weibliches Tier der zweiten Versuchsserie (2 - 30 Wochen BBN) wird zur Entblutung in Narkose mit 0,1 M Phosphatpuffer und 1000 IE Heparin perfundiert. Die Harnblase wird nach Entnahme zerteilt. Von jeder Hälfte wird das Epithel mittels einer Skalpellklinge abgelöst und auf entfettete Objektträger aufgebracht. Mit Hilfe eines zweiten Objektträgers werden Ausstriche nach Art der Blutausstriche hergestellt und feucht in einem Methanol-Formalin-Eisessig-Gemisch (BÖHM, 1968) fixiert.

2.2 Menschliche Tumoren

2.2.1 Lichtmikroskopie

Bei den morphometrisch untersuchten Präparaten handelt es sich um Gewebeproben, die zur histopathologischen

Untersuchung zur Abteilung Pathologie der RWTH Aachen und zum Institut für Pathologie (Prof. Dr. R. LINDENFELSER) in Bardenberg eingesandt worden sind. Die Gewebeproben werden üblicherweise in 4 %iger Formalinlösung fixiert und konventionell in Einbettungsautomaten in Paraffin eingelegt.

Von den ausgewählten Präparaten werden für die DNS-Zytophotometrie neue, 10 - 12 um dicke Schnittpräparate angefertigt sowie 4 - 6 um dicke Parallelschnitte für die Reklassifizierung.

2.2.2 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung von 18 Präparaten werden Gewebeproben von 1 - 2 mm Kantenlänge in dem beschriebenen Glutaraldehyd-Paraformaldehyd-Gemisch immersionsfixiert.

2.3 Morphologische Methoden

2.3.1 Transmissionselektronenmikroskopie

In der Serie 1 der männlichen Tiere werden aus den beiden Harnblasen jeder Gruppe (2 - 12 Wochen BBN) 5 - 10 Gewebesblöcke von 2 - 3 mm Kantenlänge für die Elektronenmikroskopie entnommen. Aus der Serie 2 der weiblichen Tiere (2 - 30 Wochen BBN) werden von einer weiteren Harnblase gleichfalls 5 - 10 Gewebesblöcke untersucht.

Die Gewebeproben werden über Nacht in Puffer gespült. Es folgt eine Nachfixierung in gepufferter 2%iger Osmiumtetroxid-Lösung. Sodann Entwässerung in der aufsteigenden Äthanolreihe und Einbettung in Araldit (Merck).

Für die Gewebeproben der männlichen Tiere (Serie 1) erfolgt eine Stückkontrastierung (Uranylacetat und Phosphorwolframsäure in 70 % Alkohol).

Die Gewebeproben der menschlichen Tumoren werden in gleicher Weise für die Elektronenmikroskopie bearbeitet.

Ultramikrotom: OmU3 (Reichert).

Transmissionselektronenmikroskop: EM 10 A (Zeiss).

Färbung der Semidünnschnitte mit Methyleneblau-AzurII (RICHARDSON et al., 1960).

Kontrastierung der Dünnschnitte mit Bleizitrat und Uranylacetat.

2.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Im tierexperimentellen Teil wird je eine durch Sagittalschnitt gewonnene Hälfte der Harnblasen mit Nadeln auf Korkplättchen fixiert und über die aufsteigende Azetonreihe dehydriert. Kritische-Punkt-Trocknung über flüssige Kohlensäure (Critical-Point-Apparatus, Balzers). Aufbringen der getrockneten Präparate auf Aluminiumhalter mittels Klebeband und Leitsilber (Balzers). Sputter-Coating mit Gold-Palladium (Hummer II, Technics).

Rasterelektronenmikroskop: AMR 1000 A (Leitz).

2.3.3 Lichtmikroskopie

2.3.3.1 Histologie

Je eine Hälfte der Harnblasen aus der zweiten Serie des Tierexperiments (2 - 30 Wochen BBN) werden in 2 - 3 mm breite Streifen zerteilt und im Einbettungsautomaten in Paraplast eingelegt. 4 - 6 μ m dicke Schnitte (Schlittenmikrotom Hn 40, Jung) für die lichtmikroskopische Betrachtung und 10 - 12 μ m dicke Schnitte für die FEULGEN-Färbung werden hergestellt.

Einzelne der menschlichen sowie auch der experimentell erzeugten Tumoren werden in Technovit 7200 (Kulzer) eingebettet. Semidünnschnitte (Autocut 1140, Reichert) werden ebenso wie die Paraffinschnitte konventionell mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE).

2.3.3.2 Zytologie

Die Hälfte der Ausstriche des Tierexperiments wird nach PAPANICOLAOU und MAY-GRÜNWARD-GIEMSA gefärbt.

2.3.3.3 FEULGEN-Färbung

Die zytologischen Präparate werden vor der Hydrolyse in Aqua dest. gespült, die Paraffinschnitte über Xylol und Alkohol bis Wasser gebracht.

Hydrolyse der Schnitt- und Ausstrichpräparate in 4 N HCl bei 28 Grad über 45 Minuten (BÖHM, 1968).

Die optimale Hydrolysezeit wurde an Schnittserien eines Präparats ermittelt.

Färbung mit SCHIFFSchem Reagenz nach GRAUMANN (1953).
Nach Entwässerung über Alkohol werden die Präparate aus dem Intermedium Xylol in Öl (Cargille), Brechungsindex $n_D = 1,54$ (20 Grad C), eingedeckt.

2.3.4 Zytrophotometrie

Die DNS-zytrophotometrische Untersuchung erfolgt mit dem Scanning-Mikrodensitometer M 85a (Vickers Instruments).

Arbeitsweise des Mikrodensitometers:

Das histologische Präparat wird bei 500-facher Vergrößerung (Objektiv x 40) wie in einem konventionellen Lichtmikroskop betrachtet. Über einen Prismenmonochromator kann das Licht einer 50-W-Halogenlampe in eine beliebige Wellenlänge zwischen 400 nm und 700 nm zerlegt werden. Der erzeugte feine monochromatische Lichtstrahl, dessen Größe frei gewählt werden kann, wird durch das Objektiv des Mikroskops in die Ebene des Schnittpräparates projiziert. Dabei wird das Präparat rasterförmig überstrichen. Größe des Rasters und Dauer des Vorgangs sind ebenfalls frei wählbar.

Die Extinktion wird durch einen Photomultiplier gemessen, zu dem das nicht im Präparat absorbierte Licht über Kondensator, Apertur- und Feldblende des Mikroskops gelangt. Die Messung erfolgt lediglich in dem Areal des Präparats, das durch eine zusätzlich in das Blickfeld eingeblendete Maske ausgewählt ist. Die Einzelpunktmessungen des Rasters werden integriert und in Maschineneinheiten (arbitrary units) angegeben.