

Aus dem Institut für Pathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Irene Esposito

# **Verbesserung der Messpräzision der diagnostischen DNA-Bildzytometrie**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Birte Berger-Fröhlig  
2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Alfred Böcking

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

## Zusammenfassung

Die Messpräzision der DNA-Bildzytometrie determiniert die diagnostische Treffsicherheit des jeweiligen Verfahrens. Ziel der vorliegenden Arbeit war der Vergleich zweier PC-gestützter Bildanalysesysteme, der AutoCyte-Quick-DNA-Workstation und der MotiCyte-DNA-Workstation. Hierzu wurde von zwei gesunden Ratten der DNA-Gehalt der Hepatozyten (2c-, 4c- und 8c-Zellkerne) und der Lymphozyten als Referenzzellen gemessen und mit den von der *European Society for Analytical Cellular Pathology* (ESACP) festgelegten Standards zur Qualität der Messpräzision und untereinander verglichen. Anhand der von der ESACP festgelegten Standards wurden Präparation der Rattenleber-Abtupfpräparate, automatische Feulgenfärbungen und interaktive Zellkern-DNA-Messungen analysiert. Zusätzlich wurden an der MotiCyte-DNA-Workstation die Sichtfeldabhängigkeit und die Fokusabhängigkeit der gemessenen DNA-Gehalte überprüft. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die geforderten Grenzwerte (<5%) der ESACP für die Variationskoeffizienten (CV) der integrierten optischen Dichte (IOD) von jedem 2c-, 4c- und 8c-Peak und der Referenzzellen in jedem 4x4 Imprint, d.h. bezogen auf eine Messreihe bei beiden Systemen durchgehend eingehalten wurden (3. Messparameter). Dagegen konnten die ESACP-Standards für die CV-Werte jeder Zellfraktion (<5%) (2. Messparameter), die Korrelationskoeffizienten der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkernpeak (2c, 4c, 8c) (<0,4) (4. Messparameter), die CV-Werte der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp (2c-, 4c- und 8c-Hepatozyten) innerhalb eines 4x4-Imprints (<3%) (5. Messparameter), die CV-Werte der Verhältnisse der Mittelwerte der Peaks von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4-Imprint (<2%) (6. Messparameter) und die CV-Werte der Verhältnisse der Mittelwerte der Peaks von tetraploiden zu diploiden Zellkernen von jedem 4x4-Imprint (<1%) (7. Messparameter) von beiden Systemen nicht durchgehend eingehalten werden. Im direkten Vergleich der MotiCyte-DNA-Workstation zur AutoCyte-Quick-DNA-Workstation zeigte erstere durchgehend deutlich bessere Ergebnisse. Dies ist durch die softwareseitig implementierte Korrektur von Messfehlern in der MotiCyte-DNA-Workstation zu erklären und belegt die größere Präzision der DNA-Bildzytometrie durch die Einführung neuer Algorithmen zur bildanalytischen Korrektur des Streulicht- und Beugungsfehlers. Zudem lassen sich die von den ESACP-Standards abweichenden Werte des zweiten und vierten Messparameters der MotiCyte-DNA-Workstation in unseren Daten durch eine defekte Färbeküvette erklären; es ist anzunehmen, dass bei optimaler Färbung der Präparate die geforderten Mindeststandards der ESACP mit der MotiCyte-DNA-Workstation einzuhalten sind. Die festgelegten Standards für die Parameter fünf bis sieben sollten weiter überprüft werden, da auch in der Literatur Widersprüche zu finden sind. Unsere Daten bestätigen eine Abhängigkeit des gemessenen DNA-Gehaltes von der Fokussierung. Eine aktuell auf dem Markt erhältliche Weiterentwicklung der MotiCyte-DNA-Workstation, das Motic EasyScan, erkennt und eliminiert vollautomatisiert defokussierte Zellkerne. Auch eine Sichtfeldabhängigkeit des gemessenen DNA-Gehaltes des Zellkerns konnte nachgewiesen werden. Es zeigten sich deutliche Abweichungen der mittleren IOD zur Peripherie des Sichtfeldes hin. Werden die mittleren IOD-Werte um die Abweichung der peripheren Rasterpalten einer Rasterreihe zum Zentrum der Rasterreihe korrigiert, zeigt sich ein deutlich geringeres Rauschen. Ob sich ein solcher Faktor bewährt, sollte an größeren Stichproben mit engmaschigeren Rastern überprüft werden.

## Summary

The measuring precision of DNA image cytometry determines the diagnostic accuracy of the respective method. The aim of the present work was to compare two computer aided image analysis systems, the AutoCyte-Quick-DNA-Workstation and the MotiCyte-DNA-Workstation. For this purpose, the DNA content of hepatocytes (2c, 4c and 8c nuclei) and lymphocytes as reference cells of two healthy rats were measured and compared with the quality standards for the measurement precision established by the European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) and with each other. Based on the standards established by the ESACP, preparations of rat liver swabs, automatic Feulgen staining and interactive cell nucleus DNA measurements were analysed. In addition, the MotiCyte DNA workstation was used to check the visual field dependence and focus dependence of the measured DNA contents. The results of this thesis show that the required limits (<5%) of the ESACP for the coefficient of variation (CV) of the integrated optical density (IOD) for each 2c, 4c and 8c peak and the reference cells in each 4x4 imprint, i.e. in relation to a series of measurements, have been consistently maintained for both systems (3rd measurement parameter). By contrast, the ESACP standards for the CV values of each cell fraction (<5%) (2nd measurement parameter), the correlation coefficients of the cell nucleus area to the IOD for each cell nucleus peak (2c, 4c, 8c) (<0.4) (4th measurement parameter), the CV values of the IOD mean values for the same cell type (2c, 4c and 8c hepatocytes) within a 4x4 imprint (<3%) (5th measurement parameter), the CV values of the mean peak ratios of reference cells to analysis cells (2c cell nuclei) of each 4x4 imprint (<2%) (6th measurement parameter) and the CV-values of the mean peak ratios from tetraploid to diploid cell nuclei of each 4x4 imprint (<1%) (7th measurement parameter) are not consistently maintained by both systems. In a direct comparison of the MotiCyte DNA workstation to the AutoCyte-Quick DNA workstation, the first showed significantly better results throughout. This can be explained by the software implemented correction of measurement errors in the MotiCyte DNA workstation and demonstrates the higher precision of DNA image cytometry by introducing new algorithms for image correction of scattered light and diffraction errors. In addition, the deviating values of the second and fourth measurement parameters of the MotiCyte DNA workstation deviating from the ESACP standards in our data can be explained by a defective staining cuvette; it can be assumed that the required minimum standards of ESACP with the MotiCyte DNA workstation must be complied with if the preparations are optimally stained. The established standards for parameters five to seven should be further reviewed, as contradictions can also be found in the literature. Our data confirm a dependence of the measured DNA content on the focus. A further development of the MotiCyte DNA workstation currently available on the market, the Motic EasyScan, automatically detects and eliminates defocused cell nuclei. Furthermore, a visual field dependence of the measured DNA content of the cell nucleus was demonstrated. Significant deviations of the mean IOD to the periphery of the field of view were observed. If the mean IOD values are corrected by the deviation of the peripheral grid columns of a grid array from the centre of the grid array, a significantly lower noise level is achieved. Whether such a factor works well should be checked on larger samples with closer meshed grids.

## Abkürzungsverzeichnis

|                 |   |
|-----------------|---|
| CV              | Variationskoeffizient ( <i>Coefficient of Variation</i> )     |
| CC              | Korrelationskoeffizient ( <i>Coefficient of Correlation</i> ) |
| dest.           | destilliert   |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )       |
| EG              | Europäische Gemeinschaft                                      |
| ESACP           | <i>European Society for Analytical Cellular Pathology</i>     |
| FISH            | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung                            |
| HCL             | Chlorwasserstoff  |
| IGEL            | Individuelle Gesundheitsleistung                              |
| IOD             | Integrierte optische Dichte                                   |
| MW              | Mittelwert  |
| N               | Stickstoff  |
| N.A.            | Numerische Apertur  |
| PRESS           | <i>Prototype Reference Standard Slides</i>                    |
| SO <sub>2</sub> | Schwefeldioxid  |
| STABW           | Standardabweichung  |
| W.D.            | <i>Working Distance</i>                                       |
| ZNS             | zentrales Nervensystem  |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Für die Feulgenfärbung verwendete Reagenzien .....   | 15 |
| Tabelle 2: Herstellung der SO <sub>2</sub> -Stammlösung: .....  | 16 |
| Tabelle 3: Die Herstellung von Sulfit(SO <sub>2</sub> )-Wasser:.....  | 16 |
| Tabelle 4: Ablauf der Feulgenfärbung.....   | 16 |
| Tabelle 5: Qualitätsparameter (3-7) gemessen am MotiCyte-DNA, Ratte 1 .....   | 28 |
| Tabelle 6: Qualitätsparameter (3-7) gemessen am MotiCyte-DNA, Ratte 2 .....   | 29 |
| Tabelle 7: Qualitätsparameter (3-7) gemessen am AutoCyte-Quick-DNA, Ratte 2 .....   | 30 |
| Tabelle 8: Messergebnisse in Bezug auf die Färbeposition (1-36) gemessen am<br>MotiCyte-DNA .....   | 31 |
| Tabelle 9: Modalwerte Ratte 1 am MotiCyte-DNA .....   | 34 |
| Tabelle 10: Modalwerte Ratte 2 am MotiCyte-DNA .....  | 34 |
| Tabelle 11: CV der Zellfraktionen, Ratte 1 am MotiCyte-DNA .....  | 37 |
| Tabelle 12: CV der Zellfraktionen, Ratte 2 am MotiCyte-DNA .....  | 39 |
| Tabelle 13: Modalwerte am AutoCyte-Quick-DNA .....  | 51 |
| Tabelle 14: CVs der Zellfraktionen am AutoCyte-Quick-DNA.....   | 52 |
| Tabelle 15: Messergebnisse im Vergleich MotiCyte-DNA und AutoCyte-Quick-<br>DNA, Messparameter 1 .....                                      | 59 |
| Tabelle 16: Messergebnisse im Vergleich MotiCyte-DNA und AutoCyte-Quick-<br>DNA, Messparameter 2.....                                       | 60 |
| Tabelle 17: Messergebnisse im Vergleich MotiCyte-DNA und AutoCyte-Quick-<br>DNA, Messparameter 3 und 4.....                                 | 61 |
| Tabelle 18: Messergebnisse im Vergleich MotiCyte-DNA und AutoCyte-Quick-<br>DNA, Messparameter 5 und 6.....                                 | 62 |
| Tabelle 19: Messergebnisse im Vergleich MotiCyte-DNA und AutoCyte-Quick-<br>DNA, Messparameter 7.....                                       | 63 |
| Tabelle 20: DNA-Werte aller gemessenen Zellen bei verschiedenen<br>Fokuseinstellungen, gemessen am MotiCyte-DNA.....                        | 69 |
| Tabelle 21: Zellkern-DNA-Werte pro Sichtfeldposition.....   | 71 |
| Tabelle 22: CVs diploider Analysezellen unter Ausschluss von Zellkernen < 20 µm <sup>2</sup><br>der Ratte 1, gemessen am MotiCyte-DNA ..... | 74 |
| Tabelle 23: CVs diploider Analysezellen unter Ausschluss von Zellkernen < 20 µm <sup>2</sup><br>der Ratte 2, gemessen am MotiCyte-DNA ..... | 75 |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Phasen des Zellzyklus [5].  | 2  |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.  | 13 |
| Abbildung 3: Färbeautomat Shandon Varistain 24-4, Thermo Fisher Scientific Inc.,<br>Waltham, MA USA [59].  | 14 |
| Abbildung 4: AutoCyte-Quick-DNA-Workstation  | 18 |
| Abbildung 5: DNA-Histogramm aus dem Report des AutoCyte-Quick-DNA  | 20 |
| Abbildung 6: MotiCyte-DNA-Workstation  | 21 |
| Abbildung 7: DNA-Histogramm aus dem Report des MotiCyte-DNA  | 23 |
| Abbildung 8: Durchschnittliche Anzahl der CV-Abweichungen pro Objektträger in<br>Abhängigkeit von der Färbeposition gemessen am MotiCyte-DNA           | 32 |
| Abbildung 9: Durchschnittliche Anzahl der Modalwert-Abweichungen pro<br>Objektträger in Abhängigkeit von der Färbeposition gemessen am<br>MotiCyte-DNA | 32 |
| Abbildung 10: Durchschnittliche Anzahl der CC-Abweichungen pro Objektträger in<br>Abhängigkeit von der Färbeposition gemessen am MotiCyte-DNA          | 33 |
| Abbildung 11: Mittelwerte der Modalwerte jeder Zellfraktion inklusive<br>Standardabweichung für Ratte 1 gemessen am MotiCyte-DNA                       | 35 |
| Abbildung 12: Mittelwerte der Modalwerte jeder Zellfraktion inklusive<br>Standardabweichung für Ratte 2 gemessen am MotiCyte-DNA                       | 36 |
| Abbildung 13: CV-Werte jeder Zellfraktion der Ratte 1 am MotiCyte  | 38 |
| Abbildung 14: CV-Werte jeder Zellfraktion der Ratte 2 am MotiCyte  | 40 |
| Abbildung 15: CV-Werte der IODs aller <i>Peaks</i> pro Messreihe, Ratte 1, gemessen am<br>MotiCyte-DNA   | 42 |
| Abbildung 16: CV-Werte der IODs aller <i>Peaks</i> pro Messreihe, Ratte 2, gemessen am<br>MotiCyte-DNA   | 42 |
| Abbildung 17: Korrelationskoeffizient der Zellkernflächen gegenüber den IODs,<br>Ratte 1, gemessen am MotiCyte-DNA                                     | 44 |
| Abbildung 18: Korrelationskoeffizient der Zellkernflächen gegenüber den IODs,<br>Ratte 2, gemessen am MotiCyte-DNA                                     | 45 |
| Abbildung 19: CV der IOD-Mittelwerte der drei Messreihen, Ratte 1, gemessen am<br>MotiCyte-DNA   | 46 |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 20: CV der IOD-Mittelwerte der drei Messreihen, Ratte 2, gemessen am MotiCyte-DNA.....   | 47 |
| Abbildung 21: CV-Werte der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von Referenzzellen zu Analysezellen, Ratte 1, am MotiCyte-DNA.....                    | 48 |
| Abbildung 22: CV-Werte der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von Referenzzellen zu Analysezellen, Ratte 2, am MotiCyte-DNA.....                    | 48 |
| Abbildung 23: CV-Werte der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von tetraploiden zu diploiden Zellen aller Messreihen, Ratte 1, am MotiCyte-DNA. .... | 49 |
| Abbildung 24: CV-Werte der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von tetraploiden zu diploiden Zellen aller Messreihen, Ratte 2, am MotiCyte-DNA. .... | 50 |
| Abbildung 25: Mittelwerte der Modalwerte jeder Zellfraktion inklusive Standardabweichungen für Ratte 2, gemessen am AutoCyte-Quick-DNA                         | 51 |
| Abbildung 26: CVs jeder Zellfraktion am Auto-Cyte-Quick-DNA. ....  | 53 |
| Abbildung 27: CV-Werte der IODs von <i>Peaks</i> jeder Zellfraktion am AutoCyte-Quick-DNA. ....  | 54 |
| Abbildung 28: Korrelationskoeffizienten Kernfläche vs. IOD der Zellfraktionen, am AutoCyte-Quick-DNA.....  | 55 |
| Abbildung 29: CV-Werte der IOD-Mittelwerte für Zelltypen 2c, 4c, 8c, am AutoCyte-Quick-DNA.....  | 56 |
| Abbildung 30: CV-Werte der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von Referenzzellen zu Analysezellen, am AutoCyte-Quick-DNA.....  | 57 |
| Abbildung 31: CV-Werte der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von tetraploiden zu diploiden Zellen, am AuoCyte-Quick-DNA. ....                      | 58 |
| Abbildung 32 a: Histogramm des AutoCyte-Quick-DNA. b: Histogramm des MotiCyte-DNA.....   | 66 |
| Abbildung 33: Gemessene IODs der 2c-Zellen bei optimaler Fokuseinstellung (1., 2., 3., 4., 5.) und bei Defokussierung (-1, +1, -2, +2.).....                   | 66 |
| Abbildung 34: Gemessene IODs der 4c-Zellen bei optimaler Fokuseinstellung (1., 2., 3., 4., 5.) und bei Defokussierung (-1, +1, -2, +2.).....                   | 67 |
| Abbildung 35: Gemessene IODs der 8c-Zellen bei optimaler Fokuseinstellung (1., 2., 3., 4., 5.) und bei Defokussierung (-1, +1, -2, +2.).....                   | 67 |

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 36: Mittelwerte und Standardabweichungen der IODs aller 2c-Zellen bei optimaler Fokuseinstellung und bei -1, -2, +1 und +2, gemessen am MotiCyte-DNA.....             | 67 |
| Abbildung 37: Mittelwerte und Standardabweichungen der IODs aller 4c-Zellen bei optimaler Fokuseinstellung und bei -1, -2, +1 und +2, gemessen am MotiCyte-DNA.....             | 68 |
| Abbildung 38: Mittelwerte und Standardabweichungen der IODs aller 8c-Zellen bei optimaler Fokuseinstellung und bei -1, -2, +1 und +2, gemessen am MotiCyte-DNA.....             | 68 |
| Abbildung 39: Sichtfeldabhängigkeit der gemessenen mittleren IOD-Werte und der Standardabweichungen. ....   | 70 |
| Abbildung 40: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellkern-DNA-Einzelmessungen pro Rasterspalte. ....  | 71 |
| Abbildung 41: Sichtfeldabhängigkeit a) der mittleren IOD-Werte, b) korrigiert um die mittlere prozentuale Abweichungen von der mittleren Messung auf dem Sichtfelddraster. .... | 72 |

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Biologische Grundlagen der DNA-Bildzytometrie .....   | 1         |
| 1.1.1    | DNA .....   | 1         |
| 1.1.2    | Zellteilungsmechanismen/-phasen .....   | 1         |
| 1.1.3    | DNA-Aneuploidie und Tumorgenese.....  | 2         |
| 1.2      | DNA-Zytometrie .....  | 4         |
| 1.2.1    | Messgeräte .....  | 4         |
| 1.2.2    | Messtechnik .....   | 4         |
| 1.2.3    | Messpräzision .....   | 5         |
| 1.2.4    | Qualitätssicherung .....  | 7         |
| 1.3      | Ziele der Arbeit .....  | 10        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b> .....  | <b>12</b> |
| 2.1      | Studiendesign .....   | 12        |
| 2.2      | Untersuchungsmaterial .....   | 13        |
| 2.3      | Feulgenfärbung.....   | 14        |
| 2.4      | Tierversuchsgenehmigung und Ethikvotum.....   | 16        |
| 2.5      | Standardisierte statische DNA-Zytometrie .....  | 17        |
| 2.5.1    | Messungen an der AutoCyte-Quick-DNA-Workstation.....  | 17        |
| 2.5.2    | Messungen an der MotiCyte-DNA-Workstation .....   | 20        |
| 2.5.3    | Fokusabhängigkeit der IOD von 2c- und 4c-Zellkernen .....   | 23        |
| 2.5.4    | Sichtfeldabhängigkeit der Messgenauigkeit .....   | 23        |
| 2.6      | Messparameter .....   | 24        |
| 2.6.1    | Messwertinterpretation .....  | 24        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b> .....   | <b>27</b> |
| 3.1      | Parameter zur Überprüfung der Messpräzision.....  | 27        |
| 3.1.1    | Homogenität innerhalb eines Färbekades.....   | 31        |
| 3.2      | Ergebnisse der Messungen am MotiCyte-DNA .....  | 33        |
| 3.2.1    | Modalwerte jeder Zellfraktion .....   | 33        |
| 3.2.2    | CV jeder Zellfraktion und der Referenzzellen.....   | 36        |
| 3.2.3    | CV der IOD von jedem 2c-, 4c- und 8c- <i>Peak</i> und der Referenzzellen in<br>jedem 4x4 <i>Imprint</i> ..... | 41        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.2.4    | Korrelationskoeffizient der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern- <i>Peak</i> (2c, 4c und 8c).....                                       | 43        |
| 3.2.5    | CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp (2c-Hepatozyten, 4c-Hepatozyten, 8c-Hepatozyten) innerhalb eines 4x4 <i>Imprints</i> .....                 | 46        |
| 3.2.6    | CV der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4 <i>Imprint</i> .....              | 47        |
| 3.2.7    | CV der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von tetraploiden zu diploiden Zellkernen von jedem 4x4 <i>Imprint</i> .....                        | 49        |
| 3.3      | Ergebnisse der Messungen am AutoCyte-Quick-DNA.....   | 50        |
| 3.3.1    | Modalwerte jeder Zellfraktion .....   | 50        |
| 3.3.2    | CV jeder Zellfraktion und der Referenzzellen.....   | 52        |
| 3.3.3    | CV der IOD von jedem 2c-, 4c- und 8c- <i>Peak</i> und der Referenzzellen in jedem 4x4 <i>Imprint</i> .....  | 53        |
| 3.3.4    | Korrelationskoeffizient der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern- <i>Peak</i> (2c, 4c und 8c).....                                       | 54        |
| 3.3.5    | CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp (2c-Hepatozyten, 4c-Hepatozyten, 8c-Hepatozyten) innerhalb eines 4x4 <i>Imprints</i> .....                 | 56        |
| 3.3.6    | CV der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4 <i>Imprint</i> .....              | 57        |
| 3.3.7    | CV der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von tetraploiden zu diploiden Zellkernen von jedem 4x4 <i>Imprint</i> .....                        | 57        |
| 3.4      | Direkter Vergleich der Messergebnisse gemessen mit dem MotiCyte-DNA und dem AutoCyte-Quick-DNA.....   | 58        |
| 3.5      | DNA-Histogramme der Messungen am MotiCyte-DNA und AutoCyte-Quick-DNA im Vergleich .....   | 66        |
| 3.6      | Überprüfung der Fokusabhängigkeit am MotiCyte.....  | 66        |
| 3.7      | Überprüfung der Sichtfeldabhängigkeit am MotiCyte .....   | 69        |
| 3.8      | Überprüfung des Streulichtfehlers und einer möglichen Überkorrektur.....  | 73        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>  | <b>76</b> |
| 4.1      | Einhaltung der ESACP-Vorgaben: Homogenität der Färbung innerhalb eines Präparates und eines Färbebad es sowie Messpräzision der DNA-Bildzytometrie..... | 76        |
| 4.2      | Verbesserung der Präzision der DNA-Bildzytometrie durch neue Algorithmen zur bildanalytischen Korrektur des Streulicht- und Beugungsfehlers.....        | 78        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.2.1    | Abhängigkeit des DNA-Gehaltes von der Fokussierung des Zellkerns .....                   | 79        |
| 4.2.2    | Abhängigkeit des DNA-Gehaltes von der Positionierung des Zellkerns<br>im Sichtfeld ..... | 79        |
| <b>5</b> | <b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>   | <b>81</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Biologische Grundlagen der DNA-Bildzytometrie

### 1.1.1 DNA

Die DNA-Bildzytometrie beruht auf der Messung der integrierten optischen Dichte (IOD) des spezifisch für DNA gefärbten Zellkerns, welche wiederum als zytometrisches Äquivalent für dessen DNA-Gehalt steht. Dieses wird im DNA-Histogramm als „c“-Wert angegeben ( $c = \text{content}$ ) [1]. Jedes Chromosom besteht aus einem Faden, welcher aus Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Histonen (globuläre basische Proteine, die den DNA-Strang stabilisieren) besteht. Die DNA ist das genetische Material und setzt sich aus zwei Nukleinsäureketten zusammen, die in Form einer Doppelhelix schraubenartig um eine gedachte Achse gewunden sind. Der Durchmesser einer solchen DNA-Doppelhelix beträgt 2 nm. Die beiden DNA-Ketten zusammen werden als Chromatide bezeichnet[2].

Der weitaus größte Teil (mehr als 99 %) der zellulären DNA ist im Zellkern gespeichert, der so zum wichtigsten Informationsträger einer Zelle wird [3]. Die Anzahl der Chromosomen im menschlichen Körper ist konstant. So enthält jede somatische Zelle 46 Chromosomen, genauer 44 Autosomen und 2 Geschlechtschromosomen XX oder XY. Jedes Autosom ist doppelt vorhanden. Dieser, in jeder menschlichen Somazelle vorhandene Satz homologer Chromosomen wird als diploid ( $2c$ ) bezeichnet. Geschlechtszellen enthalten dagegen nur den halben, haploiden (23 Chromosomen) Chromosomensatz.[2, 4]

### 1.1.2 Zellteilungsmechanismen/-phasen

Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen (siehe Abbildung 1), der G1-, S-, G2- und M-Phase. Das „G“ steht für Gap, das „S“ für Synthese und das „M“ für Mitose. G1, S und G2 bilden zusammen die Interphase, d.h. die Phase zwischen zwei Mitosen. In der G1-Phase wachsen die Zellen und Zellorganellen werden gebildet. Sie ist bei vielen Zelltypen die längste Phase und ist durch einen konstanten diploiden DNA-Gehalt gekennzeichnet. In der S-Phase wird die DNA verdoppelt, sodass die Zelle anschließend einen tetraploiden DNA-Gehalt ( $4c$ ) hat. Es schließt sich eine zweite Wachstumsphase (G2) an. In der M-Phase erfolgt die mitotische Teilung der Zelle. Aus der G1-Phase können Zellen in die G0-Phase übergehen. Dies ist eine Differenzierungsphase. Von

## Einleitung

dieser Phase aus können sie entweder, bedingt durch einen bestimmten Reiz, in den Zellzyklus zurückkehren oder in eine terminale Differenzierungsphase ( $G_T$ ) übergehen. Von dort aus ist keine weitere Zellteilung mehr möglich, wie z.B. bei Neuronen des ZNS und des peripheren Nervensystems.[3]

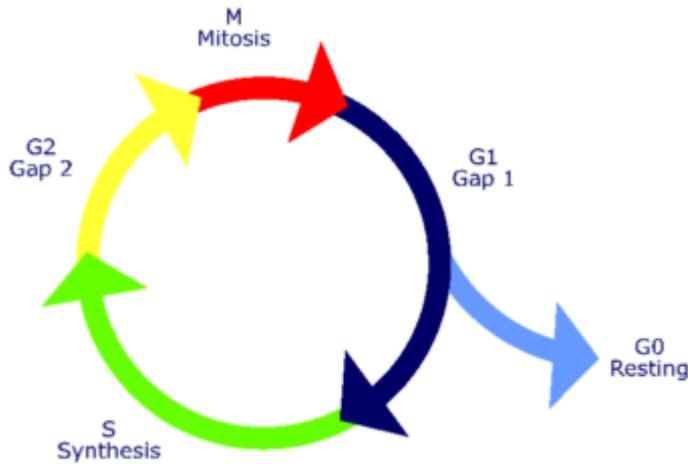


Abbildung 1: Phasen des Zellzyklus [5].

Ziel der Mitose ist die erbgleiche Verteilung des Genmaterials auf zwei Tochterzellen. Bei manchen Zellen wird jedoch der Zellzyklus nach der S-Phase abgebrochen. Bis dahin ist es zwar zur Verdopplung der DNA gekommen aber die anschließende Kern- und Zellteilung unterbleibt. Dieser Vorgang wird Endomitose genannt und kann sich wiederholen. Es entstehen Zellen, deren Kerne das Vielfache des üblichen Chromosomensatzes enthalten. Dies sind polyploide Zellen[2]. Dies bedeutet im DNA-Histogramm der DNA-Bildzytometrie das Vorkommen von DNA-Stammlinien in den Verdopplungsregionen euploider Stammlinien (d.h. bei 4c, 8c, 16c) [1].

### 1.1.3 DNA-Aneuploidie und Tumorgenese

Der DNA-Gehalt eines Zellkerns hängt von verschiedenen biologischen Faktoren ab. Dies sind, wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, physiologische Faktoren wie die Zellzyklusphasen, euploide Polyploidisierung, Replikation, Apoptose und Nekrose, aber auch nicht physiologische Faktoren wie Virusinfekte, Strahlentherapie, Zytostatikatherapie, Vitamin-B<sub>12</sub>-Mangel und eine Hyperregeneration von Zellen [6]. Diese Faktoren müssen bei der Interpretation eines DNA-Histogramms in Bezug auf den qualitativen Nachweis von DNA-Aneuploidie zur Dignitätsbestimmung berücksichtigt werden [6]. Normale, nicht maligne Zellen des Menschen haben, außer der Samenzelle und der Eizelle, einen zweifachen Chromosomensatz. Zellen z.B. eines

## Einleitung

beginnenden Prostatakarzinoms zeigen bereits Abweichungen davon, bedingt durch das Fehlen von Chromosomen bzw. deren Bruchstücken oder ein Zugewinn derselben (numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberration). Dies wird chromosomale Aneuploidie genannt [7, 8]. Chromosomale Aneuploidie, durch genetische Instabilität bedingt, ist ein frühes Schlüsselereignis in der Tumorgenese [6, 9]. Das quantitative zytometrische Äquivalent chromosomaler Aneuploidie ist die DNA-Aneuploidie [10]. Diese ist ein international anerkannter Marker für die maligne Transformation von Zellen [1, 11-15]. Die diagnostische Interpretation eines DNA-Histogramms der DNA-Bildzytometrie erfolgt durch den qualitativen Nachweis von DNA-Aneuploidie. Diese kann mit Hilfe der Identifizierung von abnorm hohen Einzelwerten (*Exceeding Events*) oder der Identifizierung abnormer Stammlinien erfolgen [16]. Der Modalwert eines Histogramm-*Peaks* repräsentiert den häufigsten Wert (Gipfelspitze) innerhalb desselben [17]. Eine Zellpopulation gesunder, proliferierender Zellen wird im DNA-Histogramm durch einen Häufigkeitsgipfel bei 2c (Zellen in der G0/1-Phase) und bei 4c (Zellen in der G2/M-Phase) angezeigt [9]. Werden Abweichungen des DNA-Gehaltes von der Norm von mehr als +/- 10 % (systembedingte Messfehler) gemessen, so liegt eine DNA-Aneuploidie vor. Dies ist ein spezifischer Marker für das Vorliegen maligner Tumorzellen [16]. Unter der Proliferationsrate versteht man die Wachstumsrate. Ein Maß hierfür ist in der DNA-Zytometrie der Anteil der in Teilung befindlichen Zellen (Proliferationsfraktion). Dieser spielt bei der Beurteilung des Grades der Bösartigkeit eines Tumors eine Rolle. Je schneller ein Tumor wächst, umso bösartiger ist er [16]. Ist die Proliferationsfraktion sehr niedrig und beträgt, wie z.B. beim Prostatakarzinom, weniger als 5 %, so ist die Wahrscheinlichkeit, in den folgenden 15 Jahren an einem solchen Tumor zu sterben, sehr gering [18, 19].

Peter Duisberg, ein amerikanischer Molekularbiologe, hat folgende Theorie zur Entstehung von malignen Tumorzellen entwickelt. Er beschreibt diese als Kettenreaktion mehrfacher Aneuploidisierungen [7, 20-24]. Im zeitlichen Verlauf kann es zu einer so genannten zytogenetischen Tumorprogression kommen, in deren Folge es zu einer Zunahme und Variabilität chromosomaler Aneuploidie kommt. Daraus folgt, je bösartiger ein Krebs ist, umso ausgeprägter sind die Chromosomenstörungen in Bezug auf die Anzahl und die Art und umso variabler sind diese von Zelle zu Zelle. In der DNA-Bildzytometrie wird sowohl das Ausmaß als auch die Variabilität der DNA-Aneuploidie gemessen [16]. Die Nichtnachweisbarkeit von DNA-Aneuploidie lässt jedoch nicht den Rückschluss zu, dass keine Malignität vorliegt, da es bei wenigen

## *Einleitung*

Tumoren zu so geringen chromosomalen Aberrationen kommt, dass diese zytometrisch nicht nachweisbar sind [10].

### **1.2 DNA-Zytometrie**

#### **1.2.1 Messgeräte**

Die DNA-Bildzytometrie misst den DNA-Gehalt von Zellkernen, indem deren Erbsubstanz durch die Feulgenfärbung spezifisch angefärbt wird. Die gebundene Farbstoffmenge wird mikrodensitometrisch gemessen [16]. Zunächst gab es im letzten Jahrhundert die Möglichkeit, diese Messungen mit Hilfe eines Mikroskopphotometers durchzuführen [16, 25, 26]. 1979 wurde das erste TV-gestützte Bild-Analyse-System für DNA-Messungen eingeführt (SAMBA von Alcatel, Frankreich) [27]. Daraufhin entwickelte sich diese Methode zur Bestimmung der DNA-Menge in Zellkernen weiter und verschiedene TV- und PC-gestützte Geräte wurden entwickelt (z.B. CAS von Becton and Dickinson, USA; TAS von Leica, Deutschland; IBAS von Zeiss, Deutschland; Cytometer CM1 von Hund, Deutschland; AutoCyte-Quick-DNA, Zeiss, Deutschland und MotiCyte-DNA, Motic, Xiamen, China) [16, 28, 29]. Das 1995 entwickelte AutoCyte-Quick-DNA und das 2009 entwickelte MotiCyte-DNA werden in der vorliegenden Arbeit genauer beschrieben und hinsichtlich der Messpräzision untersucht.

#### **1.2.2 Messtechnik**

Die Messung der Zellkerne zur Bestimmung der DNA-Menge erfolgt mittels geeigneter computerisierter Verfahren an einem Mikroskop unter der Kontrolle eines erfahrenen Pathologen [30]. In der vorliegenden Arbeit werden das AutoCyte-Quick-DNA und das MotiCyte-DNA verwendet. Messprinzip ist die Bestimmung der integrierten optischen Dichte pro Zellkern. Dazu werden die Grauwerte aller Pixel des Zellkernbildes aufsummiert und als integrierte optische Dichte (IOD) angegeben. Zur internen Kalibrierung werden die IODs von gesunden Zellen mit diploidem Chromosomensatz als Referenzzellen verwendet. Der mittlere IOD-Wert dieser Zellen wird als  $2c$  gesetzt und die IOD der gemessenen Zellkerne wird hierzu in Bezug gesetzt. Vor der Messung wird um die zu messenden Zellkerne herum eine Messmaske generiert, um deren Bild möglichst exakt abzudecken, in dem die IOD gemessen werden soll. Da Lagerung, Präparation und Fixation der Zellen Einfluss auf das Ergebnis der Feulgenfärbung haben, ist es unbedingt notwendig, Referenzzellen nicht nur im selben zytologischen

## Einleitung

Präparat, sondern möglichst auch in unmittelbarer Umgebung der jeweiligen Analysezellen zu messen [16].

In einem DNA-Histogramm wird die Häufigkeit des Vorkommens (Ordinate) bestimmter Zellkern-DNA-Gehalte (Abszisse) grafisch dargestellt [30]. In einer sogenannten Bildgalerie werden dem Untersucher auf einem Monitor alle gemessenen Zellen getrennt nach Referenzzellen und Analysezellen gezeigt. Hier können einzelne Objekte eliminiert (z.B. Artefakte, autolytische oder unscharf abgebildete Zellkerne) oder neu klassifiziert werden [16].

### 1.2.3 Messpräzision

Um eine exakte Aussage über die DNA-Ploidie bzw. den DNA-Gehalt der Zellen treffen zu können, ist es wichtig, dass die Messpräzision möglichst hoch ist. Diese hängt von verschiedenen Faktoren ab:

1. densitometrische Linearität
2. Streulicht (*glare*)
3. Beugung
4. Segmentierung

Unter **densitometrischer Linearität** versteht man eine Linearität zwischen den physikalisch vorgegebenen und den gemessenen Grauwerten. Dies lässt sich mit Hilfe eines standardisierten Objektträgers überprüfen, auf welchem Testobjekte unterschiedlicher Transmissionen aufgebracht sind. Da die meisten Videokameras keine ausreichende densitometrische Linearität aufweisen, muss diese durch softwaremäßige Korrektur der Kennlinien der Kamera korrigiert werden [31].

**Streulicht** (*glare*) entsteht durch Beugung von Licht an den Grenzen der Teile eines optischen Gerätes, z.B. von Linsen und Blenden oder wie in der DNA-Zytometrie am Rand des Zellkerns. Es führt dazu, dass auf dem mikroskopischen Bild schwarze Partikel grau erscheinen. In der DNA-Bildzytometrie hat dies den Effekt, dass sehr kleine (etwa  $25 \mu\text{m}^2$ ) und sehr dunkle (pyknotische) Zellkerne mit zu geringem IOD-Wert gemessen werden. Um diesen Effekt des Streulichts zu korrigieren, wurde ein Korrekturverfahren entwickelt, welches mit Hilfe von Aktivkohlepartikeln den prozentualen Anteil des Streulichts der Messung ermittelt [32]. Aktivkohle hat einen Transmissionskoeffizienten (Transmission = Helligkeit/Durchlässigkeit) von Null. Der

## *Einleitung*

bei der Messung von Null abweichende Wert der Transmission stellt den Korrekturwert dar, der dem Grauwert jedes Pixels zugezählt werden muss. Für das MotiCyte-DNA wurde darüber hinaus ein Algorithmus von Thomas Würflinger (RWTH Aachen, Lehrstuhl für Bildverarbeitung) entwickelt, der diesen Korrekturwert präparatespezifisch ermittelt. Er stellte heraus, dass der Korrelationskoeffizient (CC) zwischen der IOD und der Größe von Referenzzellen und der Analysezellen ein Gradmesser für eine erfolgreiche Korrektur des Streulichtes ist. Der Grauwert steht für die gemessene Helligkeit. Diese ist aufgrund des Streulichtes in Kombination mit der hellen, meist zellfreien Umgebung zu hoch. Das Prinzip der Verbesserung besteht darin, dass ein Transmissionswert in einem detektierten Zellkern abgezogen wird. Dieser Transmissionswert wird so optimiert, dass innerhalb eines Präparates der gesamte Korrelationskoeffizient der Kernfläche gegenüber der IOD 0 beträgt bzw. sehr nah bei 0 liegt. Der Grenzwert des Korrelationskoeffizienten, unterhalb dem der Streulichtfehler im MotiCyte-DNA akzeptiert wird, ist 0,4 [33]. Diese von Würflinger beschriebene Korrektur des Streulichtes gab es beim AutoCyte-Quick-DNA noch nicht (persönliche Mitteilung von Prof. Böcking, Juli 2016).

**Beugung** bedeutet, dass es am Rande eines Partikels im Strahlengang eines Lichtmikroskops zur Beugung von Lichtstrahlen in dessen Inneren kommt. Dieser entstehende „Beugungssaum“ führt ebenfalls zu einer verfälschten Messung der IOD von Zellkernen. Zunächst wurde zur Korrektur dieses Fehlers der Zellkern in zwei Regionen eingeteilt, den Nucleus und eine eng umliegende Grenzregion, welche zu optischen Störungen führt. Aus der Messung der IOD des Nucleus und dem Radius konnte so auf den wahren IOD-Wert geschlossen werden [34]. Im Lehrstuhl für Bildverarbeitung der RWTH Aachen wurde dieser Ansatz weiter entwickelt und der Zellkern zur Bestimmung der IOD in drei Regionen eingeteilt: der äußere Ring als Referenzregion, der Zwischenraum zwischen Nucleus und Referenzregion und der innere Rest des Zellkerns [33]. Thomas Würflinger hat den bestehenden Algorithmus im Rahmen seiner geplanten Dissertation für das MotiCyte-DNA verbessert, indem er eine Korrektur-Konstante berechnet hat, die für jedes optische System angewendet werden kann. Bei dieser Konstante muss nicht von einer runden Kontur der gemessenen Zelle ausgegangen werden. Diese Konstante beruht auf der Feststellung von Haroske et al. (1995), dass die Beugung das Verhältnis der Modalwerte der tetraploiden zu den diploiden Zellkernen beeinflusst. Für jedes optische System und für jede Segmentierungsmethode muss aus diesem Grund einmal der Querschnittsparameter „d“

## Einleitung

zur Beugungskorrektur festgelegt werden, so dass das Verhältnis der tetraploiden zu den diploiden Zellkernen bei 2 liegt bzw. möglichst nah an diesem Wert [33, 35]. Diese von Würflinger beschriebene zellkern-spezifische Korrektur der Beugung gab es beim AutoCyte-Quick-DNA noch nicht (persönliche Mitteilung von Prof. Böcking, Juli 2016).

Unter **Segmentierung** versteht man die passgenaue Erkennung eines bildlichen Objektes mit Hilfe einer ideal an die Größe des Kerns angepassten Messmaske. Wenn diese zu klein oder zu groß ist, wird evtl. ein zu großer bzw. ein zu geringer IOD-Wert gemessen [16].

### 1.2.4 Qualitätssicherung

Um eine möglichst hohe Messpräzision der Zellkern-DNA-Bestimmung mit großer Reproduzierbarkeit zu erlangen, wurden von der *European Society for Analytical Cellular Pathology* (ESACP) der gesamte Vorgang von der Präparat-Herstellung über die Messausrüstung bis hin zur Auswertung der DNA-Histogramme standardisiert [9, 36-38]. Insgesamt wurden sechs Tests zur Qualitätskontrolle entwickelt:

1. Protokoll für die DNA-Bildzytometrie,
2. Protokoll für die Färbekonzanz,
3. Protokoll für den Korrekturfaktor,
4. Protokoll zur diagnostischen DNA-Interpretation,
5. Protokoll zur IOD-Messung,
6. Protokoll für die DNA-Bildzytometrie-Instrumente [38].

Hervorzuhebende Aspekte zur Qualitätskontrolle und -sicherung sind die Folgenden:

1. Variationskoeffizient (CV, Coefficient of Variation) jeder Zellfraktion und der Referenzzellen, dieser muss unter 5 % liegen [37], [38],
2. CV der IODs von jedem 2c-, 4c- und 8c-Peak und der Referenzzellen in jedem 4x4 *Imprint* (bezogen auf eine Messreihe), dieser muss unter 5 % liegen [38],
3. Korrelationskoeffizient (CC, Coefficient of Correlation) der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern-Peak (2c, 4c und 8c), dieser muss unter 0,4 liegen [38],
4. CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp (2c-Hepatozyten, 4c-Hepatozyten, 8c-Hepatozyten) zwischen allen 4x4 *Imprints*, dieser muss unter 3 % liegen [38],

## Einleitung

5. CV der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4 *Imprint*, dieser muss unter 2 % liegen [38],
6. CV der Verhältnisse der Mittelwertes der *Peaks* von tetraploiden zu diploiden Zellkerne von jedem 4x4 *Imprint*, dieser muss unter 1 % liegen [38].

Dieser Test zur Qualitätssicherung wurde im Rahmen des PRESS-Projektes (Prototype Reference Standard Slides) der EG (Europäische Gemeinschaft) entwickelt [39]. Er besteht aus regelmäßigen Messungen von biologischen Testplatten, welche mit den Press-Pro4-Objektträgern übereinstimmen. Diese Objektträger beinhalten jeweils vier Abtupfpräparate von derselben Rattenleber. Zur Herstellung der Objektträger sollten immer Tiere derselben Spezies, desselben Geschlechts, Alters und Gewichtes genommen werden, welche gemäß eines standardisierten Protokolls aufgezogen wurden. Alle vier Objektträger sollten zusammen in einem Färbebad stehen, die erhaltenen 16 Abtupfpräparate (4x4) sollten durch die DNA-Zytometrie untersucht werden. Dafür müssen 50 Zellkerne jeder Zellfraktion gemessen werden. Es wird empfohlen, diese Messungen einmal jährlich und nach jeder Modifikation im Präparations-, Mess- oder Färbeprotokoll durchzuführen. Durch diese Messungen können Rückschlüsse auf die Qualität der Präparation, der Fixation, der Färbung und der Messpräzision gezogen werden. Resultierende Informationen betreffen die Präzision der Analysezellen- und Referenzzellen-*Peaks*, die Genauigkeit des Verhältnisses der *Peaks* der Analysezellen zu den Referenzzellen, der 2c-Zellen zu den 4c-Zellen sowie die Varianz auf einem Objektträger innerhalb eines Färbebades [38].

Je genauer die Messpräzision in der DNA-Bildzytometrie ist, desto höher ist die diagnostische Treffsicherheit. Dies bedeutet, je geringer die Streuung der Zellkern-DNA-Messungen ist, desto höher ist die Treffsicherheit zum Nachweis von Tumorzellen.

1990 wurde die DNA-Zytometrie gemäß Beschluss einer „Task Force“ der Internationalen Akademie für Zytologie und der *American Society of Cytology on „Standardisation of Quantitative Methods in Diagnostic Pathology“* auf der Konferenz „*The Computerized Cytology and Histopathology Laboratory*“ in Chicago unter den messenden diagnostischen Verfahren für die klinische Anwendung empfohlen, da sie auf einer theoretisch-biologischen Grundlage basiert, hinreichend standardisiert und reproduzierbar ist, die Messgeräte benutzerfreundlich sind, objektive Interpretationsalgorithmen zur Verfügung stehen und ausreichend Studien zur diagnostischen und

## Einleitung

prognostischen Validierung der DNA-Messdaten für die meisten Tumoren vorliegen [4]. Bis heute hat sich die DNA-Bildzytometrie jedoch nicht als diagnostischer Goldstandard durchgesetzt, was unter anderem auch den zeitaufwändigen und damit unwirtschaftlichen Messungen geschuldet sein dürfte. Die zytopathologische Diagnostik hat viele Vorteile gegenüber alternativen, invasiveren Verfahren. Die wichtigsten bestehen in der sehr früh möglichen Erkennung von Malignität, den niedrigen Kosten und der Anwendbarkeit bei ambulanten Patienten, insbesondere als *Screening*-Verfahren [40]. Die moderne klinische Diagnostik steht immer mehr unter dem Druck, möglichst wenig invasive Techniken mit sicheren und dabei therapeutisch und prognostisch relevanten Aussagen zu entwickeln. Dies führt dazu, dass häufig nur sehr kleine Zellmengen gewonnen werden. Eine verlässliche Aussage des Pathologen kann deshalb oft nur mit Nutzung weiterer Techniken, wie z.B. der DNA-Bildzytometrie gemacht werden, sodass die Spezifität der zytologischen und histologischen Untersuchungen in erfahrenen Händen 99 bis 100 % erreichen kann [41]. So kann die DNA-Bildzytometrie beispielsweise bei zweifelhaften zytologischen Diagnosen von Lungenkarzinomen ergänzend zur Zytologie hilfreich sein. Sie ist deutlich günstiger und weniger zeitaufwändig als andere Verfahren wie z.B. die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), vorausgesetzt es stehen ausreichend abnorme Zellen zur Messung zur Verfügung [42].

In manchen Organen (Mund, Muttermund, Bronchien, Kehlkopf) konnte durch den Nachweis von DNA-Aneuploidie in Abstrichen Krebs bis zu drei Jahre früher als mit der histologischen oder zytologischen Untersuchung von Biopsien alleine nachgewiesen werden [16, 43-48]. So wird auch der ergänzende Gebrauch der DNA-Bildzytometrie als angemessenes Werkzeug zur Bewertung der Tumor-Freiheit von Resektionsrändern z.B. bei oralen Plattenepithel-Karzinomen und als Hilfe bei der Findung der richtigen Therapie beschrieben [49]. Der prognostischen DNA-Ploidie-Bestimmung beim Prostatakarzinom kommt im Vergleich zum Gleason-Score eine bessere interindividuelle Reproduzierbarkeit von über 90 % zu [50-53]. Die Vorhersagekraft des DNA-Malignitätsgrades im Vergleich zum Gleason-Score ist deutlich besser [54, 55]. All diese Aspekte zeigen, dass das Verfahren der DNA-Bildzytometrie in der Diagnostik und Prognostik von Krebserkrankungen als sicheres Verfahren eingesetzt werden kann.

Eine Berechtigung als Routinemethode in der Krebsdiagnostik kann durch weitere Verbesserung der Messpräzision und eine schnellere Durchführbarkeit angestrebt

## *Einleitung*

werden. Zum heutigen Zeitpunkt steht ein Messgerät zu Verfügung, welches vollautomatisiert und computerassistent tausende von Zellkernen innerhalb weniger Minuten misst (Motic EasyScan). Im Vergleich hierzu wurden bei der Messung mittels des interaktiven MotiCyte-DNA lediglich ein paar hundert Zellkerne gemessen. Bei dem automatisierten Verfahren wird nicht nur die DNA-Menge pro Zellkern gemessen, sondern auch deren Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Zelltypen bestimmt (DNA-Karyometrie). Im Vergleich zur herkömmlichen interaktiven DNA-Bildzytometrie ist dieses Verfahren deutlich schneller. Zuvor benötigte ein erfahrener Pathologe für die Messung eines Präparates ca. 60 Minuten. Mit dem Motic EasyScan wird ein Präparat in ca. 6 Minuten vollständig untersucht. Malignitätsverdächtige oder eindeutig maligne Zellen werden mit einer Genauigkeit von 93,5 % erkannt [56].

### **1.3 Ziele der Arbeit**

Ziel dieser Untersuchung war es:

1. festzustellen, ob durch die Präparation der Rattenleber-Abtupfpräparate, die anschließende Feulgenfärbung und die interaktive Zellkern-DNA-Messung die von der ESACP vorgegebenen Mindeststandards bezüglich der Homogenität der Färbung innerhalb eines Präparates und innerhalb eines Färbebades sowie der Messpräzision der DNA-Bildzytometrie einzuhalten sind,
2. herauszufinden, ob die Vorgaben der ESACP tatsächlich für jede Zellkernfraktion (2c, 4c, 8c) einzuhalten sind oder ob es biologisch bedingt (z.B. durch erhöhte Zellteilungsraten) Schwankungen gibt, die nicht durch mangelhafte Messpräzision zu erklären sind. Hierbei sollte festgestellt werden, wie häufig derartige Vorkommnisse sind, wie sie erkannt und interaktiv korrigiert werden können,
3. zu klären, inwiefern die Präzision der DNA-Bildzytometrie durch neue Algorithmen zur bildanalytischen Korrektur zellkernbezogener Messwerte (Streulicht- und Beugungsfehler) zu verbessern ist;  
zu überprüfen, ob der gemessene DNA-Gehalt von der Positionierung des Zellkerns im Sichtfeld der Kamera und der Fokussierung abhängig ist.

Von der Messpräzision der DNA-Bildzytometrie hängt die diagnostische Treffsicherheit des Verfahrens ab. Je geringer die methodisch bedingten Streuungen der Zellkern-DNA-Messwerte sind, umso höher ist die Treffsicherheit zum Nachweis von

## *Einleitung*

Tumorzellen, die auf dem Nachweis abnormaler (aneuploider) Zellkern-DNA-Gehalte beruht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Zur Überprüfung der Messpräzision der diagnostischen DNA-Bildzytometrie wurden von der *European Society for Analytical Cellular Pathology* (ESACP) Mindeststandards festgelegt [1]. Diese wurden als Grundlage zur Überprüfung der Verbesserung der DNA-Bildzytometrie in der vorliegenden Arbeit herangezogen. Hierzu wurden von zwei gesunden Ratten der DNA-Gehalt der Hepatozyten und der Lymphozyten als Referenzzellen an zwei verschiedenen Messgeräten gemessen und mit den Erwartungswerten der ESACP und untereinander verglichen.

Wie in Abbildung 2 dargestellt, wurden von zwei als gesund deklarierten Ratten Leber-Tupfpräparate hergestellt. Pro Ratte wurden zwölf 12 Objektträger ( $3 \times 4$  *Imprints*) mit jeweils 4 Abtupfpräparaten erstellt. Diese wurden im Färbeautomaten der Feulgenfärbung unterzogen. Im Anschluss wurden 4 Objektträger einer Ratte (ein  $4 \times 4$  *Imprint*) am AutoCyte-Quick-DNA und alle Objektträger ( $2 \times 12$ ) am MotiCyte-DNA zytometrisch untersucht. Es wurden mindestens 50 Lymphozyten zur internen Kalibrierung für die spätere Bestimmung der DNA-Menge als Referenzzellen deklariert. Des Weiteren wurde von jeweils mindestens 50 diploiden (2c) und tetraploiden (4c) Rattenleberzellkernen die integrierte optische Dichte (IOD) gemessen. Es wurden so viele octoploide-Zellen (8c) wie möglich gemessen. Die IOD wurde in einer Bildgalerie zusammen mit den gemessenen Kernen dargestellt. Im Anschluss an die Messung wurden automatisch Reports erzeugt. Über die Funktion „Statistik“ in der Software der Messgeräte konnten die gewünschten Messparameter (siehe Kapitel 2.6) ermittelt werden. Zur Überprüfung der Sichtfeldabhängigkeit der optischen Dichte der Zellkerne wurden je 30 diploide Zellkerne von fünf verschiedenen Abtupfpräparaten an 49 Stellen des Sichtfeldes, die durch ein Raster festgelegt wurden, gemessen. Um die Fokusabhängigkeit der IOD von 2c- und 4c-Zellkernen zu überprüfen, wurden die Zellkerne nach optimaler Fokuseinstellung und bei 40-facher Primärvergrößerung jeweils vier Mal bei erneuter Fokuseinstellung mit jeweils einem Mikrometer Abweichung nach oben bzw. unten gemessen. Dies wurde jeweils bei fünf Zellkernen von 2c-, 4c- und 8c-Zellkernen durchgeführt. Sowohl die Überprüfung der Sichtfeldabhängigkeit als auch die Fokusabhängigkeit wurden nur am MotiCyte-DNA überprüft. Die detaillierte Beschreibung der Arbeitsabläufe erfolgt in Kap. 2.3 bis 2.5.

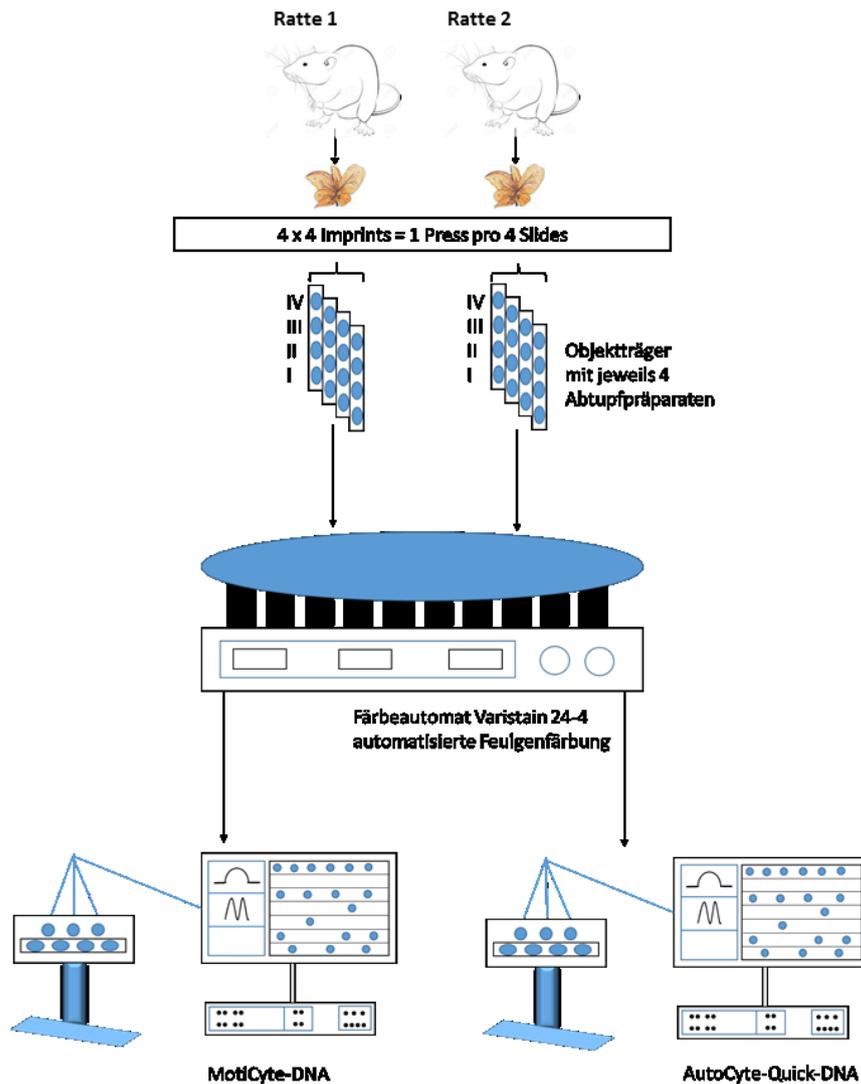


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.

Es wurden 3x4 Objektträger mit 4 Abtupfpräparaten von jeweils 2 gesunden Ratten am MotiCyte-DNA und 4 Objektträger mit 4 Abtupfpräparaten von einer gesunden Ratte (Ratte 2) am AutoCyte-Quick-DNA vermessen. Neben den Messungen zur Bestimmung der IOD-Werte der di-, tetra- und octoploiden Zellen wurden Messungen zur Fokus- und Sichtfeldabhängigkeit am MotiCyte-DNA durchgeführt.

## 2.2 Untersuchungsmaterial

Für die zytometrischen Messungen der vorliegenden Arbeit wurden Rattenlebern von gesunden Tieren verwendet. Um mögliche biologisch bedingte Messwertschwankungen festzustellen oder auszuschließen, wurden Präparate von zwei verschiedenen Rattenlebern zur Untersuchung herangezogen. Die Lebern wurden von Ratten der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf entnommen. Dort wurden diese Tiere im Rahmen einer vorgeschriebenen Kontrolle des Gesundheitszustandes der gesamten Rattenpopulation des Institutes getötet. Die für die Untersuchung benutzten Tiere wurden von der Tierversuchsanlage als gesund klassifiziert.

Die Herstellung der Präparate orientierte sich an den Empfehlungen der ESACP. Zur Bestimmung der Messpräzision in der zytologischen Diagnostik wurden standardisierte Zellkern-DNA-Messungen an 4 PRESS-PRO4 Slides [39] (4 Objektträger mit jeweils 4 Abtupfpräparationen von Schnittflächen einer Rattenleber) festgelegt [38].

Von den Lebern der Ratten wurden auf Glasobjektträgern luftgetrocknete Abtupfpräparate erstellt. Pro Ratte wurden 12 Objektträger (3x4 PRESS-PRO4 Slides) mit jeweils 4 Abtupfpräparaten hergestellt. Die Objektträger erhielten eine einheitliche Beschriftung: z.B. R-2-4-1-7. Das „R“ steht für Ratte, die folgende Zahl (von links nach rechts) für die Nummer der Ratte (1-2). Die nächste Zahl steht für den Objektträger, dann folgt der Abklatsch auf dem Objektträger und zuletzt die Position im Färbebad.

### 2.3 Feulgenfärbung

Feulgen und Rosenbeck entwickelten 1924 erstmalig eine Methode, um DNA stöchiometrisch visuell mittels Färbung nachzuweisen [57]. Diese Methode bildete die Grundlage für die heutige DNA-Bildzytometrie. Das Prinzip der Färbung beruht darauf, dass fuchsinschweflige Säure mit mindestens je zwei Aldehydgruppen eine rot gefärbte Verbindung eingeht, somit erscheinen die Zellkerne, in diesem Fall die Zellkerne der Hepatozyten, unter dem Mikroskop kardinalrot bis rosa-pink [57].

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Färbung der Präparate automatisch und standardisiert in einem Färbeautomaten (Shandon Varistain 24-4, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA, Abbildung 3). Dieser wurde speziell zur Färbung von DNA-Präparaten um eine beheizte, temperaturkontrollierte Färbeküvette für die salzsaure Hydrolyse ergänzt [58].



**Abbildung 3: Färbeautomat Shandon Varistain 24-4, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA [59].**

## Material und Methoden

Dabei wurden alle 12 Präparate einer Ratte gleichzeitig in einer temperaturkontrollierten Färbeküvette aus Kunststoff der Feulgenfärbung unterzogen. Jeder Objektträger erhielt eine definierte Position, die durch eine Nummer gekennzeichnet war; so konnten spezifische Färbeergebnisse einer bestimmten Position in der beheizten Küvette des Färbeautomaten zugeordnet werden.

Die Färbung der Präparate erfolgte nach einem Färbeablauf (Tabelle 4) unter Verwendung der in Tabelle 1 aufgelisteten Reagenzien [6, 16, 36]. Die verwendeten Reagenzien stammten, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt, Germany). Die ungefärbten, luftgetrockneten Präparate wurden zunächst für 15 Minuten in Xylol eingelegt, um so das Eindeckmittel Entellan zu entfernen. Danach wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe (99,5 % und 96 %) für jeweils 5 Minuten rehydriert und anschließend in 10 % gepuffertem Formalin 50 Minuten lang fixiert. Bei 27 °C fand die saure Hydrolyse der DNA in 5 N HCl für 60 Minuten in der beheizbaren Küvette statt. Hierbei wurde die Bindung zwischen der Desoxyribose und der Base Purin gespalten. An den Desoxyriboseanteilen der DNA entstanden freie Aldehydgruppen, welche mit dem Schiffs-Reagenz innerhalb von 60 Minuten farbig markiert wurden. Durch dreimaliges Spülen für jeweils 5 Minuten mit Sulfitwasser (Tabelle 2, Tabelle 3) wurde der nicht an Aldehydgruppen gebundene Farbstoff entfernt. Zuletzt wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 99,5 %) jeweils drei Minuten dehydriert. Die Präparate wurden anschließend erneut für 15 Minuten in Xylol gespült. Zum Abschluss wurden die Objektträger aus dem Färbeautomaten entnommen und mit einem Deckglas verschlossen. Die Aufbewahrung erfolgte in einer lichtundurchlässigen Pappmappe.

|  |
|--|
| Xylol  |
| 99,5 % Ethanol (vergällt)                                      |
| 96 % Ethanol (vergällt)  |
| 70 % Ethanol (vergällt)  |
| 5 N HCl  |
| 1 N HCl  |
| Aqua dest.   |
| 10 % gepuffertes Formalin                                      |
| Kaliumdisulfid (K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) |
| Schiffs Reagenz  |

**Tabelle 1: Für die Feulgenfärbung verwendete Reagenzien**

## Material und Methoden

| Substanz       | Menge  |
|----------------|--------|
| Kaliumdisulfid | 100 g  |
| Aqua dest.     | 900 ml |

**Tabelle 2: Herstellung der SO<sub>2</sub>-Stammlösung:**

**Das Kaliumdisulfid wird in der angegebenen Menge Aqua dest. gelöst. Die Aufbewahrung erfolgt in einer dunklen Flasche. So ist die Lösung über mehrere Monate haltbar.**

| Substanz                     | Menge   |
|------------------------------|---------|
| SO <sub>2</sub> -Stammlösung | 75 ml   |
| 1 N HCL                      | 75 ml   |
| Aqua dest.                   | 1350 ml |

**Tabelle 3: Die Herstellung von Sulfit(SO<sub>2</sub>)-Wasser:**

**erfolgt durch Mischen der angegebenen Substanzen. Das Sulfitwasser ist nicht haltbar.**

| Küvette | Substanz (Volumen reduzierte Küvetten, 600 ml bzw. 400 ml) | Zeit       |
|---------|--|------------|
| 1.      | Xylol  | 15 Minuten |
| 2.      | 99,5 % Ethanol   | 5 Minuten  |
| 3.      | 96 % Ethanol   | 5 Minuten  |
| 4.      | 10 % gepuffertes Formalin                                  | 50 Minuten |
| 5.      | Aqua dest.   | 10 Minuten |
| 6.      | Aqua dest.   | 5 Minuten  |
| 7.      | 5 N HCl bei 27 °C in Heizküvette (400 ml)                  | 60 Minuten |
| 8.      | Aqua dest.   | 2 Minuten  |
| 9.      | Aqua dest.   | 2 Minuten  |
| 10.     | Aqua dest.   | 2 Minuten  |
| 11.     | Schiffs Reagenz (Parafuchsin) (400 ml)                     | 60 Minuten |
| 12.     | SO <sub>2</sub> -Wasser (400 ml)                           | 5 Minuten  |
| 13.     | SO <sub>2</sub> -Wasser (400 ml)                           | 5 Minuten  |
| 14.     | SO <sub>2</sub> -Wasser (400 ml)                           | 5 Minuten  |
| 15.     | Aqua dest.   | 1 Minuten  |
| 16.     | Aqua dest.   | 1 Minuten  |
| 17.     | 70 % Ethanol   | 3 Minuten  |
| 18.     | 96 % Ethanol   | 3 Minuten  |
| 19.     | 99,5 % Ethanol   | 3 Minuten  |
| 20.     | Xylol  | 15 Minuten |

**Tabelle 4: Ablauf der Feulgenfärbung.**

## 2.4 Tierversuchsgenehmigung und Ethikvotum

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Studie lag ein Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit dem Aktenzeichen 4285 vor. Das positive Votum wurde am 17.6.2013 erteilt. Eine Tierversuchsgenehmigung war für diese Studie nicht erforderlich, da die verwendeten Rattenlebern von gesunden Tieren stammten, die im Rahmen der

regelmäßigen Gesundheitskontrolle des Bestandes der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf getötet wurden. Es wurden keine Tiere für die vorliegende Studie gehalten oder getötet.

## **2.5 Standardisierte statische DNA-Zytometrie**

Für die standardisierte DNA-Bildzytometrie stehen verschiedene Videokameras, Mikroskope und PC-gestützte Bildanalyseysteme zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden die AutoCyte-Quick-DNA-Workstation und die MotiCyte-DNA-Workstation verglichen. Das AutoCyte-Quick-DNA wurde 1995 entwickelt und ist somit im Vergleich zum 2009 entwickelten MotiCyte-DNA deutlich älter. Der Aufbau der Arbeitseinheiten wird im folgenden Text detailliert erläutert.

### **2.5.1 Messungen an der AutoCyte-Quick-DNA-Workstation**

Das AutoCyte-Quick-DNA der Firmen (Carl Zeiss, Jena und AutoCyte, Burlington, USA) (siehe Abbildung 4) besteht aus einem PC-gestützten Bildanalyseystem, das ein Durchlichtmikroskop (Axioplan 2, Carl Zeiss AG, Schweiz) mit Kreuztisch, ein 40er Objektiv (Carl Zeiss AG, Schweiz, Numerische Apertur (N.A.) 0,75), einen 570 nm Interferenzfilter (entspricht dem Adsorptionsmaximum der mit Parafuchsin gefärbten Zellkerne) mit +/- 10 nm Halbwertsbreite, eine Schwarzweißkamera (VarioCam, Modell CCIR, PCO Computer Optics, Kehlheim) und einen Kameraadapter mit 1,6-fachem Vergrößerungsfaktor beinhaltet. An das Mikroskop ist ein PC mit Pentium-I-Prozessor angeschlossen, welcher über einen Monitor, eine Maus, eine Tastatur und einen Drucker verfügt. Die Anwendersoftware AutoCyte-Quick zur photometrischen Messung der IOD der nach Feulgen gefärbten Zellkerne wurde zusammen mit dem Institut der Cytopathologie der Universität Düsseldorf entwickelt. Die Arbeitsstation erfüllt die Anforderungen des „*Consensus reports of the ESACP task force*“ zur Standardisierung der DNA-Bildzytometrie [2, 4, 5].



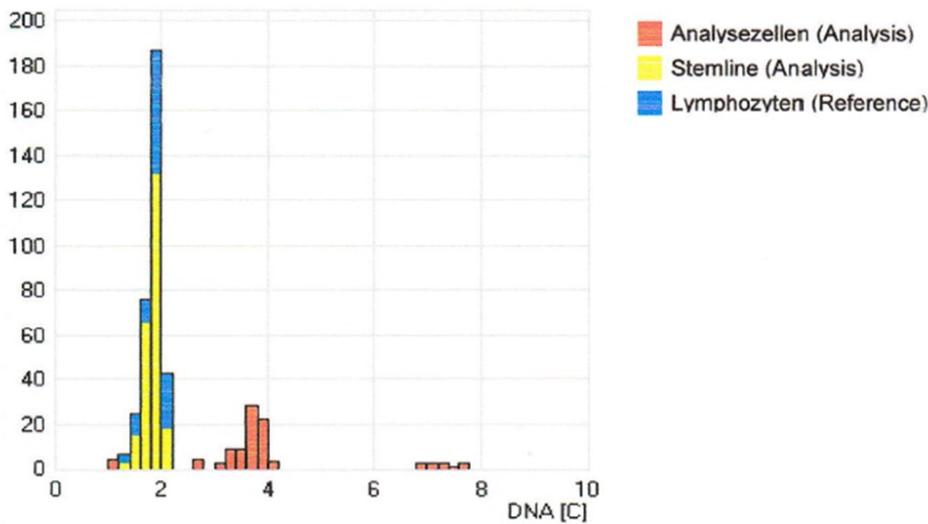
**Abbildung 4: AutoCyte-Quick-DNA-Workstation**

Vor der Vermessung der Zellkerne müssen das Mikroskop und die Software auf das zu messende Präparat abgestimmt werden. Hierzu wurde ein Objektträger auf dem Kreuztisch eingespannt, die Präparatenummer in die Software eingegeben und die Zellkerne möglichst scharf fokussiert. Die Leuchtfeld- und die Kondensorblende wurden gemäß dem Köhler'schen Beleuchtungsprinzip justiert. Anschließend wurde eine Leerwertmessung durchgeführt, wozu eine objektfreie Stelle auf dem Objektträger gesucht und der mittlere Grauwert ermittelt wurde. Diese Abstimmung musste vor jeder Messung wiederholt werden. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellkerne über die IOD erfolgte automatisch durch die Software, indem diese die Summe der Grauwerte aller Pixel eines Zellkerns bestimmte. Dieser Wert war dem DNA-Gehalt des Zellkerns gleichzusetzen. Die Auswahl der zu messenden Kerne erfolgte interaktiv am Monitor per Mausklick. Es wurde automatisch eine Messmaske, die der Kerngröße und Kernform entsprach, um den Zellkern gelegt. Da die DNA-Bildzytometrie die IOD der Zellkerne misst, welche äquivalent jedoch nicht identisch mit dem nuklearen DNA-Gehalt ist, verlangte die Bewertung der gemessenen Zellkern-DNA eine Skalierung der IOD durch den Vergleich mit Zellen mit bekanntem DNA-Gehalt, den Referenzzellen [5]. Zur internen Kalibrierung mussten mindestens 50 Lymphozyten als Referenzzellen

## *Material und Methoden*

gemessen werden. Deren Variationskoeffizient (CV) sollte unter 5 % liegen [2, 4]. Der CC (Korrelationskoeffizient) zwischen der IOD und der Fläche der Referenzzellen sollte kleiner als 0,4 sein, um den Mindestanforderungen der ESACP zu entsprechen [2]. Die IOD der Referenzzellen wurde als 2c festgelegt. 1c entspricht dem DNA-Gehalt eines Chromosomensatzes einer gesunden haploiden Zelle. Des Weiteren mussten mindestens 50 diploide (2c) und 50 tetraploide (4c) Hepatozyten sowie möglichst viele octoploide (8c) Hepatozyten gemessen werden. Die Bilder der Zellkerne wurden durch die Software in einer Bildgalerie gespeichert. Im Nachhinein konnten autolytische, nekrotische oder überlappende Zellkerne sowie Artefakte interaktiv verworfen werden. Per Computermaus konnten sich berührende Zellkerne mit einem Trennstrich geteilt werden. Automatisch wurde ein DNA-Histogramm (Abbildung 5) erzeugt, in welchem die Häufigkeitsverteilung der IOD-Werte der Hepatozyten-Zellkerne im Vergleich zu den Referenzzellen dargestellt wurde. Manuell wurden Stammlinien markiert und so die Modalwerte jeder Zellfraktion erzeugt. Daraus erzeugte die Software automatisiert einen dreiseitigen Report. Abbildung 5 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt eines solchen Histogramms, wie er vom AutoCyte-Quick-DNA ausgegeben wird.

DNA Histogram



**Comments :**

N/A

DNA Statistics

**Reference Cells**

|                   |      |
|-------------------|------|
| Number            | 56   |
| Correction Factor | 1.00 |
| CV [%]            | 1.75 |
| REM [%]           | 0.23 |

**Basic indices**

|                  |        |
|------------------|--------|
| 2c Ref. IOD      | 181.91 |
| 2c Dev.Index     | 1.50   |
| DNA Malig. Grade | 0.70   |
| Diploid Dev.     | 0.91   |
| Z value          | 70.19  |
| Ploidy Balance   | 9.94   |

**Analysis Cells**

|          |      |
|----------|------|
| Number   | 322  |
| Min. [c] | 1.10 |
| Max. [c] | 7.78 |

**Stemline indices**

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Modal Value     | 1.90  |
| DNA Index(mean) | 1.20  |
| DNA Index(peak) | 0.93  |
| Std. Dev. Steml | 0.14  |
| CV Stemline     | 7.83  |
| Steml. Shoulder | 12.73 |

Abbildung 5: DNA-Histogramm aus dem Report des AutoCyte-Quick-DNA

2.5.2 Messungen an der MotiCyte-DNA-Workstation

Das MotiCyte-DNA (Motic, Xiamen, China) ist ein PC-gestütztes Bildanalyse-System (siehe Abbildung 6). Es besteht aus einem Durchlichtmikroskop (BA410 Trinocular) mit einem Kreuztisch, zwei 12,5x-Weitfeld-, 18 mm-Sichtfeld-Okularen, einem Kondensator (LWD), W.D. 10,7 mm, N.A. 0,65) und fünf Objektiven (CCIS EC Plan, 4x, N.A. 0,1, W.D. 15,9; 10x, N.A. 0,25, W.D. 17,4; 20x, N.A. 0,25, W.D. 0,9; 40x, N.A. 0,65, W.D. 0,5; 60x, N.A. 0,8, W.D. 0,35). An das Mikroskop ist eine Farbkamera (Scientific grade MotiCam Pro 285A, Motic, Xiamen, P.R. China) mit einem 2/2“ Sony ICX 255CCD Farbsensor (Sony, Minato, Tokio) angeschlossen. Zur Analyse der aufgenommenen Bilder ist ein PC (Dell Optiplex 755 MT, Round Rock, USA) mit

## Material und Methoden

DualCore-Prozessor angeschlossen, welcher über eine Maus, einen Monitor (High resolution 22“ Wide screen Monitor, Samsung, Seoul, Südkorea), eine Tastatur und einen Drucker verfügt. Die Anwendersoftware für interaktive Zellkern-DNA-Messungen wurde weitestgehend am Lehrstuhl für Bildverarbeitung der RWTH-Aachen entwickelt. Sie enthält bildanalytische Algorithmen zur Korrektur von Streulicht- und Beugungsfehlern bei der Messung der IOD von Zellkernen. Die Arbeitsstation erfüllt die Anforderungen des „Consensus reports of the ESACP task force“ zur Standardisierung der DNA-Bildzytometrie [2, 4, 5].



**Abbildung 6: MotiCyte-DNA-Workstation**

Für die Messung der zuvor der Feulgenfärbung unterzogenen Rattenleber-Abtupfpräparate wurde eines dieser auf dem Kreuztisch des Mikroskops eingespannt. Eine beliebige Zelle wurde möglichst scharf mit 40-facher Primärvergrößerung fokussiert. Danach wurde eine Leerstelle auf dem Objektträger aufgesucht. Zum Abgleich der Farbtemperatur wurde ein Weißabgleich und zum Abgleich der Farbkanäle rot, grün und blau bei geschlossener Blende ein Schwarzabgleich durchgeführt. Anschließend wurde im PC die Präparatenummer eingegeben. Als Referenzzellen zur internen Eichung wurden mindestens 50 Lymphozyten deklariert.

## *Material und Methoden*

Hierzu wurden die Zellen interaktiv mit einer Messmaske per Mausklick erfasst und klassifiziert. Die Messmaske war sowohl der Kernform als auch der Kerngröße angepasst. Die mittlere IOD der Referenzzellen wurde als 2c festgelegt. 1c entspricht dem DNA-Gehalt eines einfachen Chromosomensatzes. Der Variationskoeffizient CV der Referenzzellen musste unter 5 % liegen [2, 4]. Der Korrelationskoeffizient CC zwischen der IOD und der Fläche der Referenzzellen musste kleiner als 0,4 sein, um den Forderungen des internationalen Konsenses zu entsprechen [2]. Anschließend wurden jeweils mindestens 50 2c- und 4c-Hepatozyten ebenfalls automatisch mit der Messmaske umrandet und als Analysezellen gemessen. Es wurden so viele 8c-Hepatozyten wie möglich vermessen. Der Untersucher hat die Möglichkeit, mithilfe der Software entweder automatisch alle im Sichtfeld erscheinenden Zellen zu markieren und zu messen oder manuell jede Zelle einzeln anzuklicken und für die Messung auszuwählen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen manuell markiert und pyknotische Zellkerne bewusst verworfen. Ein Kriterium für die Auswahl von 2c-Zellen war, dass das Chromatinmuster des Zellkerns erkennbar sein musste. Die Sortierung der Zellkerne der Hepatozyten nach der entsprechenden IOD erfolgte automatisch durch die Software. Zum Schluss wurde die Sortierung in der Bildgalerie manuell überprüft und segmentierte Artefakte interaktiv eliminiert. Ebenso wurden überlappende, nekrotische oder autolytische Zellkerne nicht in die Messung einbezogen. Dicht beieinander liegende Zellkerne konnten manuell durch einen Trennstrich separiert werden. Nach der Messung der Zellkerne wurden diese nach dem DNA-Gehalt und der Häufigkeit im Vergleich zu den Referenzzellen sortiert in einem DNA-Histogramm (Abbildung 7) dargestellt. Mithilfe der Software wurden DNA-Stammlinien für jede Zellfraktion erstellt und so der Modalwert ermittelt. Nachdem die Messung gespeichert wurde, wurde automatisch ein dreiseitiger Report erzeugt, der ausschnittsweise in Abbildung 7 beispielhaft dargestellt ist.

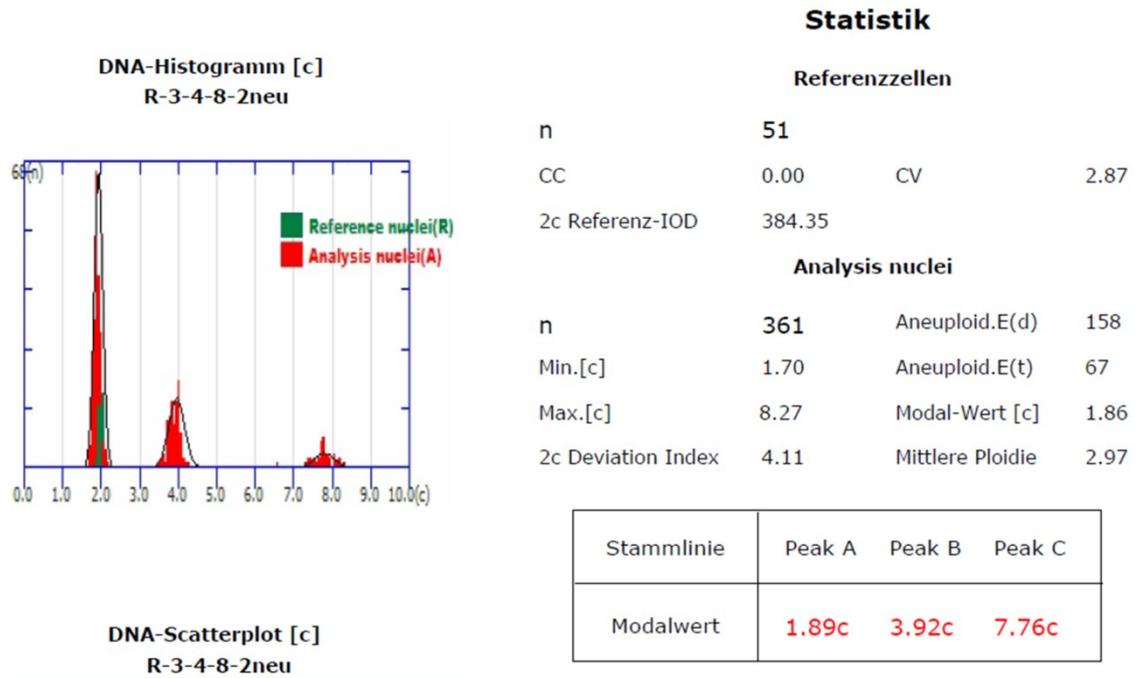


Abbildung 7: DNA-Histogramm aus dem Report des MotiCyte-DNA

### 2.5.3 Fokusabhängigkeit der IOD von 2c- und 4c-Zellkernen

Zur Überprüfung der Fokusabhängigkeit der gemessenen IOD von 2c-, 4c- und 8c-Hepatozyten wurden aus jeder Zellfraktion zufällig 5 Zellkerne ausgewählt. Jeder einzelne Zellkern wurde an der MotiCyte-Workstation möglichst präzise fokussiert und die IOD bei 40-facher Primärvergrößerung bestimmt. Im Anschluss wurde dieser Zellkern jeweils viermal bei veränderter Fokuseinstellung erneut gemessen. Hierfür wurde der Feintrieb zur manuellen Tischfokussierung jeweils um einen bzw. zwei Teilstrichabstände (1 Teilstrichabstand entspricht 1  $\mu\text{m}$ ) nach oben bzw. unten korrigiert.

### 2.5.4 Sichtfeldabhängigkeit der Messgenauigkeit

Es wurde überprüft, ob der Wert der gemessenen IOD der Zellkerne von der Position im Sichtfeld der Kamera abhängt, indem auf einer transparenten Folie ein Raster von 7x7 Feldern aufgetragen wurde, welches auf dem Bildschirm der MotiCyte-Workstation angebracht wurde. Es wurden jeweils 6 2c-Zellkerne von 5 verschiedenen Präparaten in jedem Feld des Rasters gemessen. Die Fokuseinstellung wurde für jede Messung möglichst optimal eingestellt.

## 2.6 Messparameter

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende statistische Größen berechnet:

1. Modalwert jeder Zellfraktion in c,
2. Variationskoeffizient (CV, *Coefficient of Variation*) jeder Zellfraktion und der Referenzzellen, dieser sollte unter 5 % liegen [37], [38],
3. CVs der IOD von jedem 2c-, 4c- und 8c-*Peak* und der Referenzzellen in jedem 4x4 *Imprint* (bezogen auf eine Messserie), dieser sollte unter 5 % liegen [38],
4. Korrelationskoeffizient (CC, *Coefficient of Correlation*) der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern-*Peak* (2c, 4c und 8c), dieser sollte unter 0,4 liegen [38],
5. CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp (2c-Hepatozyten, 4c-Hepatozyten, 8c-Hepatozyten) zwischen allen 4x4 *Imprints*, dieser sollte unter 3 % liegen [38],
6. CV der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4 *Imprint*, dieser sollte unter 2 % liegen [38],
7. CV der Verhältnisse der Mittelwertes der *Peaks* von tetraploiden zu diploiden Zellkerne von jedem 4x4 *Imprint*, dieser sollte unter 1 % liegen [38].

### 2.6.1 Messwertinterpretation

Die oben genannten Messparameter (1-7, Kap.2.6) können wie folgt interpretiert werden: Der Modalwert (Messparameter 1) ist der Wert, der in einer Liste von Zahlen am häufigsten vorkommt. Der Modalwert in einem Histogramm befindet sich dort, wo das Histogramm einen *Peak* aufweist. Anders ausgedrückt ist der Modalwert der Mittelwert derjenigen Gruppen von Zellen im Histogramm, die die höchste Anzahl an Zellkernen mit gleichem DNA-Gehalt aufweisen [37]. Dieser Wert ist ähnlich oder nah an dem Mittelwert einer angepassten Gaußschen Kurve [9]. Hierbei gilt, dass der Wert möglichst nah am Sollwert, das heißt bei 2 bei der 2c-Zellfraktion, bzw. bei 4 bei der 4c-Zellfraktion und bei 8 bei der 8c-Zellfraktion liegen sollte.

Der Variationskoeffizient (CV) ist der Quotient aus der Standardabweichung und dem Mittelwert in Prozent [9]:

$$CV = \text{STABW}/\text{MW} \times 100$$

Das bedeutet, dass der CV ein Maß der relativen Streuung ist (unabhängig von der Maßeinheit der statistischen Variable). Durch den CV kann die Varianz normiert werden. Er gibt an, um wieviel Prozent des Mittelwertes die Merkmalswerte im

Durchschnitt um den Mittelwert streuen [60]. Wenn die Standardabweichung größer als der Mittelwert bzw. der Erwartungswert ist, dann ist  $CV > 1$ . Durch den CV wird in dieser Studie die Streuung der DNA-Werte jeder Zellfraktion pro Abtupfpräparat (Messparameter 2), die Streuung jeder Zellfraktion pro PressPro4-Slide, d.h. bezogen auf vier Objektträger mit jeweils vier Abtupfpräparaten (Messparameter 3), die Streuung der IOD-Mittelwerte jeder Zellfraktion pro PressPro4-Slide (Messparameter 5), die Streuung des Verhältnisses der Referenzzellen zu den 2c-Zellkernen pro PressPro4-Slide (Messparameter 6) und die Streuung des Verhältnisses zwischen den 4c-Zellkernen und den 2c-Zellkernen pro PressPro4-Slide (Messparameter 7) angegeben. Zur Berechnung des Messparameters 3 wurden zunächst jeweils die CVs aller *Peaks* (2c, 4c, 8c und Lymphozyten) pro 4x4 *Imprint* addiert und davon der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Diese Werte wurden in die oben stehende Formel zur Berechnung des CV-Wertes eingegeben. Zur Berechnung des Messparameters 5 wurden alle Modalwerte der jeweiligen *Peaks* (2c, 4c und 8c) pro 4x4 *Imprint* addiert und davon wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Aus diesen Werten wiederum wurde nach oben stehender Formel der CV berechnet. Zur Berechnung des Messparameters 6 wurde für jede Messung das Verhältnis der Modalwerte von den Lymphozyten zu den 2c-Zellkernen berechnet. Diese Werte wurden pro 4x4 *Imprint* addiert und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Der CV wurde nach oben stehender Formel berechnet. Um den Messparameter 7 zu berechnen, wurde das Verhältnis der Modalwerte der 4c-Zellkerne zu den 2c-Zellkernen pro Messung ermittelt. Diese Werte wurden pro 4x4 *Imprint* addiert und der Mittelwert und die Standardabweichung wurden gebildet. Mit Hilfe dieser Werte wiederum konnte nach oben stehender Formel der CV berechnet werden. Von der ESACP wird eine Unterschreitung von bestimmten Grenzwerten gefordert. Grundsätzlich gilt, dass ein Streuungswert möglichst nah an 0 ein Hinweis für eine präzise Messung ist. Für den Messparameter 3 wird eine Streuung unter 5 %, für den Messparameter 5 eine Streuung unter 3 %, für den Messparameter 6 eine Streuung unter 2 % und für den Messparameter 7 eine Streuung unter 1 % gefordert.

Der Korrelationskoeffizient (CC) ist ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs von zwei Variablen. Er kann zwischen +1 und -1 liegen, dabei bedeutet 0, dass es keinen linearen Zusammenhang gibt. Bei 1 liegt entweder ein vollständig positiver oder negativer Zusammenhang vor. In dieser Studie wurde der Grad des linearen Zusammenhangs der Zellkernfläche gegenüber der gemessenen IOD

## *Material und Methoden*

jeder Zellfraktion überprüft (Messparameter 4). Hier wird gefordert, dass dieser Wert unter 0,4 liegt. Das bedeutet, dass möglichst keine lineare Abhängigkeit der gemessenen IOD eines Zellkernes von dessen Fläche vorliegt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Parameter zur Überprüfung der Messpräzision

In der vorliegenden Arbeit sollte festgestellt werden, ob durch die Präparation der Rattenleber-Abtupfpräparate, die anschließende automatische Feulgenfärbung und die interaktive Zellkern-DNA-Messungen die Vorgaben der ESACP betreffend der Qualität der Messpräzision eingehalten werden können. Hierzu wurden von beiden Ratten 12 Objektträger mit jeweils 4 Abtupfpräparaten am MotiCyte-DNA und 4 Objektträger von Ratte 2 mit jeweils 4 Abtupfpräparaten am AutoCyte-Quick-DNA entsprechend den Vorgaben der ESACP vermessen [38]. In den unten stehenden Tabellen (Tabelle 5, Tabelle 6, Tabelle 7) werden die ermittelten Ergebnisse zusammenfassend und zur Übersicht von beiden Ratten sowie beiden Messsystemen vergleichend dargestellt. Es werden die Parameter für jede Zellfraktion und für die Referenzzellen (Lymphozyten) getrennt für jede Ratte sowie für die Messung am AutoCyte-Quick-DNA aufgeführt. Jede Zellkernfraktion ist aufgeteilt in die einzelnen Objektträgermessreihen (4x4 *Imprints*) 1-3. Folgende Parameter werden in den Tabellen aufgeführt: der CV der IOD von jedem 2c-, 4c- und 8c-*Peak* und der Referenzzellen in jedem 4x4 *Imprint* (<5 %), der Korrelationskoeffizient der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern-*Peak* (< 0,4), der CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp zwischen allen 4x4 *Imprints* (<3 %), der CV der Verhältnisse der *Peak*-Mittelwerte von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4 *Imprint* (<2 %), der CV der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von tetraploiden zu diploiden Zellkernen von jedem 4x4 *Imprint* (<1 %) [38]. Dies sind die von der ESACP vorgegebenen Parameter zur Qualitätskontrolle und -sicherung (siehe Kapitel 1.2.4). Rot markiert sind die Werte, welche oberhalb des von der ESACP vorgegebenen Grenzwerts liegen. In den anschließenden Kapiteln werden die einzelnen Messergebnisse detailliert betrachtet.

## Ergebnisse

| Messparameter |  | 2c    |       |       | 4c    |       |       | 8c    |       |       | Lymphozyten |       |       |
|---------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|
|               |  | 1     | 2     | 3     | 1     | 2     | 3     | 1     | 2     | 3     | 1           | 2     | 3     |
| 3             | CV der IOD von jedem 2c-, 4c- und 8c-Peak in jedem 4x4 <i>Imprint</i> und der Referenzzellen   | 0,33  | 0,12  | 0,39  | 0,27  | 0,16  | 0,34  | 0,53  | 0,24  | 0,41  | 0,21        | 0,17  | 0,15  |
| 4             | Korrelationskoeffizient (CC) der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern-Peak (2c, 4c und 8c)                            | -0,05 | -0,06 | 0,02  | -0,11 | -0,09 | -0,02 | -0,05 | -0,37 | -0,01 | 0,01        | -0,06 | -0,03 |
|               |  | -0,01 | -0,11 | -0,09 | -0,02 | -0,16 | -0,01 | -0,05 | 0,14  | -0,27 | -0,01       | -0,03 | -0,03 |
|               |  | 0,02  | -0,17 | -0,12 | -0,02 | -0,11 | -0,15 | -0,06 | -0,12 | -0,08 | -0,03       | -0,02 | 0,05  |
|               |  | -0,02 | -0,11 | -0,03 | 0,04  | 0,19  | -0,22 | 0,01  | -0,13 | -0,18 | 0,03        | -0,04 | -0,01 |
|               |  | -0,03 | -0,14 | 0,00  | -0,01 | -0,06 | -0,23 | -0,05 | -0,37 | -0,13 | -0,03       | -0,05 | -0,03 |
|               |  | -0,09 | -0,03 | -0,31 | 0,02  | -0,07 | -0,13 | -0,11 | -0,06 | -0,23 | -0,19       | 0,02  | -0,02 |
|               |  | -0,02 | -0,03 | -0,19 | -0,07 | 0,00  | -0,27 | -0,19 | -0,08 | -0,22 | -0,04       | 0,03  | -0,04 |
|               |  | -0,11 | -0,07 | -0,07 | -0,10 | 0,01  | -0,19 | 0,12  | -0,08 | 0,17  | -0,01       | -0,11 | 0,01  |
|               |  | -0,12 | 0,01  | -0,15 | -0,07 | -0,06 | -0,06 | -0,14 | -0,04 | 0,12  | -0,10       | -0,13 | -0,04 |
|               |  | 0,01  | -0,15 | -0,06 | 0,03  | -0,11 | -0,18 | -0,24 | 0,04  | -0,11 | 0,00        | 0,02  | -0,10 |
|               |  | -0,05 | -0,13 | -0,03 | -0,01 | -0,03 | -0,03 | -0,03 | -0,05 | -0,15 | 0,01        | 0,05  | -0,07 |
|               |  | -0,06 | -0,18 | -0,12 | -0,01 | -0,03 | -0,27 | 0,10  | -0,01 | -0,34 | -0,09       | 0,01  | -0,04 |
|               |  | 0,00  | -0,22 | -0,07 | -0,05 | 0,03  | -0,05 | -0,68 | 0,08  | -0,32 | 0,04        | 0,04  | -0,02 |
|               |  | 0,03  | -0,15 | -0,03 | 0,08  | -0,19 | -0,04 | 0,00  | -0,10 | -0,04 | -0,05       | 0,08  | -0,41 |
| -0,13         | -0,07  | -0,04 | 0,00  | 0,02  | -0,01 | -0,77 | 0,11  | -0,30 | -0,06 | -0,05 | -0,02       |       |       |
| -0,07         | -0,08  | 0,00  | -0,31 | -0,01 | -0,03 | 0,00  | -0,29 | -0,05 | 0,04  | -0,06 | -0,11       |       |       |
| 5             | CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp (2c-Hepatozyten, 4c-Hepatozyten, 8c-Hepatozyten) zwischen allen 4x4 <i>Imprints</i>     | 3,27  | 1,87  | 2,06  | 3,44  | 1,54  | 1,23  | 3,09  | 2,44  | 3,01  | -           | -     | -     |
| 6             | CV der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4 <i>Imprint</i> | 3,37  | 1,89  | 2,17  | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -           | -     | -     |
| 7             | CV der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von tetraploiden zu diploiden Zellkernen von jedem 4x4 <i>Imprint</i>           | -     | -     | -     | 1,59  | 0,99  | 1,95  | -     | -     | -     | -           | -     | -     |

Tabelle 5: Qualitätsparameter (3-7) gemessen am MotiCyte-DNA, Ratte 1

Ergebnisse

| Messparameter |  | 2c    |       |       | 4c    |       |       | 8c    |       |       | Lymphozyten |       |       |
|---------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|
|               | Messreihe  | 1     | 2     | 3     | 1     | 2     | 3     | 1     | 2     | 3     | 1           | 2     | 3     |
| 3             | CV der IOD von jedem 2c-, 4c- und 8c-Peak in jedem 4x4 <i>Imprint</i> und der Referenzzellen   | 0,15  | 0,16  | 0,27  | 0,18  | 0,15  | 0,34  | 0,22  | 0,28  | 0,39  | 0,11        | 0,15  | 0,12  |
| 4             | Korrelationskoeffizient (CC) der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern-Peak (2c, 4c und 8c)                            | -0,05 | -0,02 | 0,00  | -0,13 | -0,06 | 0,00  | -0,22 | 0,11  | -0,51 | -0,06       | -0,04 | 0,00  |
|               |  | -0,15 | -0,06 | -0,06 | -0,28 | -0,02 | -0,42 | -0,33 | -0,18 | -0,31 | -0,04       | 0,00  | -0,02 |
|               |  | -0,05 | -0,15 | -0,10 | 0,01  | -0,02 | -0,18 | -0,05 | -0,03 | -0,32 | -0,01       | 0,02  | -0,02 |
|               |  | -0,04 | -0,14 | -0,30 | -0,06 | -0,08 | -0,14 | -0,03 | -0,26 | -0,49 | 0,03        | -0,02 | 0,04  |
|               |  | -0,07 | -0,05 | -0,15 | -0,23 | -0,24 | -0,01 | -0,31 | -0,27 | -0,09 | -0,02       | -0,08 | -0,04 |
|               |  | -0,12 | -0,14 | -0,01 | -0,05 | -0,03 | -0,08 | -0,82 | -0,17 | -0,22 | 0,00        | 0,06  | 0,01  |
|               |  | -0,14 | -0,12 | 0,01  | 0,00  | -0,25 | 0,00  | -0,26 | -0,03 | 0,10  | -0,01       | -0,11 | -0,07 |
|               |  | 0,00  | -0,03 | -0,11 | -0,02 | -0,14 | -0,34 | -0,13 | -0,15 | -0,12 | 0,03        | -0,08 | -0,04 |
|               |  | -0,08 | -0,03 | -0,13 | -0,06 | -0,04 | -0,43 | -0,50 | -0,15 | -0,40 | -0,06       | 0,01  | 0,01  |
|               |  | -0,09 | -0,08 | 0,00  | -0,12 | -0,04 | -0,32 | -0,39 | 0,00  | -0,02 | 0,02        | -0,12 | -0,02 |
|               |  | 0,02  | -0,02 | 0,01  | -0,80 | -0,01 | 0,03  | -0,26 | 0,01  | 0,02  | -0,10       | -0,05 | -0,05 |
|               |  | -0,16 | -0,04 | -0,09 | -0,06 | -0,09 | -0,30 | -0,06 | 0,00  | -0,39 | 0,03        | 0,12  | -0,06 |
|               |  | -0,05 | 0,06  | -0,02 | -0,03 | -0,08 | -0,20 | -0,02 | -0,33 | -0,22 | -0,02       | -0,14 | -0,06 |
|               |  | 0,01  | -0,04 | 0,03  | -0,06 | -0,12 | -0,04 | -0,31 | -0,04 | -0,05 | 0,05        | 0,02  | -0,01 |
| 0,00          | 0,01   | -0,14 | -0,02 | -0,13 | -0,38 | 0,06  | -0,50 | 0,00  | -0,05 | 0,00  | 0,04        |       |       |
| 0,03          | 0,03   | -0,01 | -0,06 | -0,14 | -0,02 | -0,24 | -0,08 | -0,53 | -0,02 | -0,01 | -0,15       |       |       |
| 5             | CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp (2c-Hepatozyten, 4c-Hepatozyten, 8c-Hepatozyten) zwischen allen 4x4 <i>Imprints</i>     | 2,48  | 1,75  | 2,81  | 2,33  | 2,21  | 2,82  | 2,75  | 4,27  | 3,45  | -           | -     | -     |
| 6             | CV der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4 <i>Imprint</i> | 2,53  | 1,74  | 2,71  | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -           | -     | -     |
| 7             | CV der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von tetraploiden zu diploiden Zellkernen von jedem 4x4 <i>Imprint</i>           | -     | -     | -     | 1,64  | 0,82  | 1,26  | -     | -     | -     | -           | -     | -     |

Tabelle 6: Qualitätsparameter (3-7) gemessen am MotiCyte-DNA, Ratte 2

Ergebnisse

| Messparameter |  | 2c    |       |   | 4c    |       |   | 8c    |       |   | Lymphozyten |   |   |
|---------------|--|-------|-------|---|-------|-------|---|-------|-------|---|-------------|---|---|
|               |  | 1     | 2     | 3 | 1     | 2     | 3 | 1     | 2     | 3 | 1           | 2 | 3 |
| 3             | CV der IOD von jedem 2c-, 4c- und 8c-Peak in jedem 4x4 <i>Imprint</i> und der Referenzzellen   | 0,27  | -     | - | 0,29  | -     | - | 0,52  | -     | - | 0,24        | - | - |
| 4             | Korrelationskoeffizient (CC) der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern-Peak (2c, 4c und 8c)                            | 0,08  | -     | - | -0,05 | -     | - | 0,78  | -     | - | -0,08       | - | - |
|               |  | 0,03  | -     | - | -0,51 | -     | - | 0,09  | -     | - | -0,03       | - | - |
|               |  | 0,15  | -     | - | -0,04 | -     | - | 0,45  | -     | - | 0,13        | - | - |
|               |  | 0,45  | -     | - | -0,08 | -     | - | 0,91  | -     | - | 0,20        | - | - |
|               |  | 0,14  | -     | - | 0,24  | -     | - | 0,50  | -     | - | 0,07        | - | - |
|               |  | -0,20 | -     | - | -0,55 | -     | - | 0,81  | -     | - | -0,31       | - | - |
|               |  | -0,21 | -     | - | -0,34 | -     | - | 0,55  | -     | - | 0,21        | - | - |
|               |  | -0,35 | -     | - | -0,65 | -     | - | 0,83  | -     | - | 0,35        | - | - |
|               |  | 0,15  | -     | - | 0,27  | -     | - | -0,01 | -     | - | -0,08       | - | - |
|               |  | -0,24 | -     | - | -0,21 | -     | - | -1,00 | -     | - | 0,18        | - | - |
|               |  | 0,28  | -     | - | -0,10 | -     | - | 0,43  | -     | - | -0,04       | - | - |
|               |  | 0,25  | -     | - | 0,11  | -     | - | -0,86 | -     | - | -0,05       | - | - |
|               |  | 0,37  | -     | - | -0,04 | -     | - | -0,53 | -     | - | 0,28        | - | - |
|               |  | 0,09  | -     | - | 0,23  | -     | - | -1,00 | -     | - | -0,05       | - | - |
| 0,02          | -  | -     | -0,32 | - | -     | -0,49 | - | -     | -0,07 | - | -           |   |   |
| 0,20          | -  | -     | 0,32  | - | -     | 0,03  | - | -     | 0,10  | - | -           |   |   |
| 5             | CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp (2c-Hepatozyten, 4c-Hepatozyten, 8c-Hepatozyten) zwischen allen 4x4 <i>Imprints</i>     | 3,78  | -     | - | 3,04  | -     | - | 5,29  | -     | - | -           | - | - |
| 6             | CV der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4 <i>Imprint</i> | 3,90  | -     | - | -     | -     | - | -     | -     | - | -           | - | - |
| 7             | CV der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von tetraploiden zu diploiden Zellkernen von jedem 4x4 <i>Imprint</i>           | -     | -     | - | 3,90  | -     | - | -     | -     | - | -           | - | - |

Tabelle 7: Qualitätsparameter (3-7) gemessen am AutoCyte-Quick-DNA, Ratte 2

### 3.1.1 Homogenität innerhalb eines Färbebades

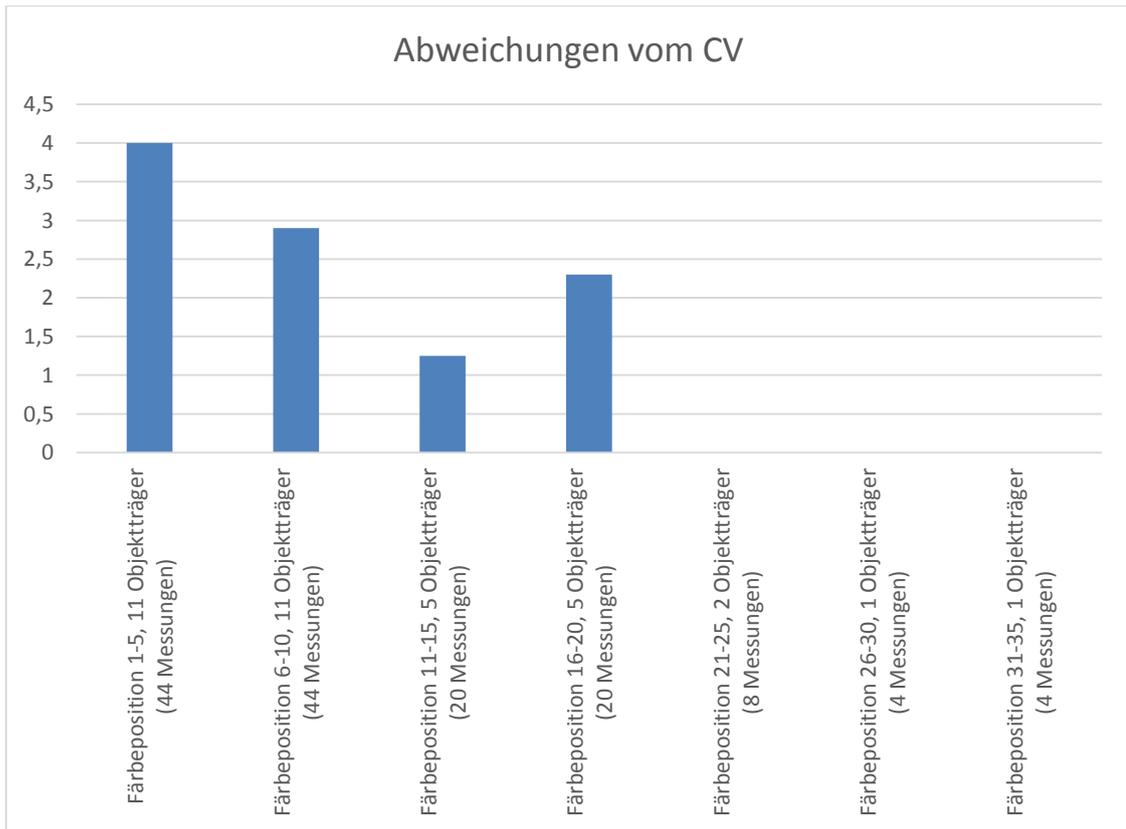
Zur Überprüfung der Homogenität der Färbung der Abtupfpräparate auf den Objektträgern, die innerhalb eines Bades gefärbt wurden, wurden die Positionen innerhalb des Färbebades vor der Feulgenfärbung dokumentiert. Eine Messküvette umfasste 36 Objektträger. In der vorliegenden Arbeit wurden die Positionen 1-18 mit Objektträgern belegt. Die Verteilung der Objektträger auf die Positionen war nicht gleichmäßig und die Positionen 19-36 wurden bei keiner Messung belegt. Es wurden jeweils 5 Positionen, also je 5 Objektträger, die nebeneinander in einer Querreihe der Färbeküvette standen, bei der Auswertung zusammengefasst. Es wurden die Ergebnisse der CV-Werte pro Zellfraktion, des Verhältnisses der Lymphozyten zu den 2c-Zellen, die Modalwerte jeder Zellfraktion und die CC-Werte jeder Zellfraktion berücksichtigt. Eine Übersicht der Messwertabweichungen wird in Tabelle 8 gegeben.

| Färbe-<br>position | Objekt-<br>träger<br>(n) | Messun-<br>gen (n) | Abweichungen |                          |          |            |                          |    |                          |
|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------|--------------------------|----------|------------|--------------------------|----|--------------------------|
|                    |                          |                    | CV           |                          | Lymph/2c | Modalwerte |                          | CC |                          |
|                    |                          |                    | n            | pro<br>Objekt-<br>träger | n        | n          | pro<br>Objekt-<br>träger | n  | pro<br>Objekt-<br>träger |
| 1-5                | 8                        | 32                 | 23           | 4                        | 0        | 3          | 0,3                      | 2  | 0,2                      |
| 6-10               | 9                        | 36                 | 26           | 2,9                      | 0        | 11         | 1                        | 9  | 0,8                      |
| 11-15              | 4                        | 16                 | 5            | 1,25                     | 0        | 1          | 0,25                     | 0  | 0                        |
| 16-20              | 3                        | 12                 | 7            | 2,3                      | 0        | 2          | 0,67                     | 0  | 0                        |
| 21-25              | 0                        | 0                  | 0            | 0                        | 0        | 0          | 0                        | 0  | 0                        |
| 26-30              | 0                        | 0                  | 0            | 0                        | 0        | 0          | 0                        | 0  | 0                        |
| 31-36              | 0                        | 0                  | 0            | 0                        | 0        | 0          | 0                        | 0  | 0                        |

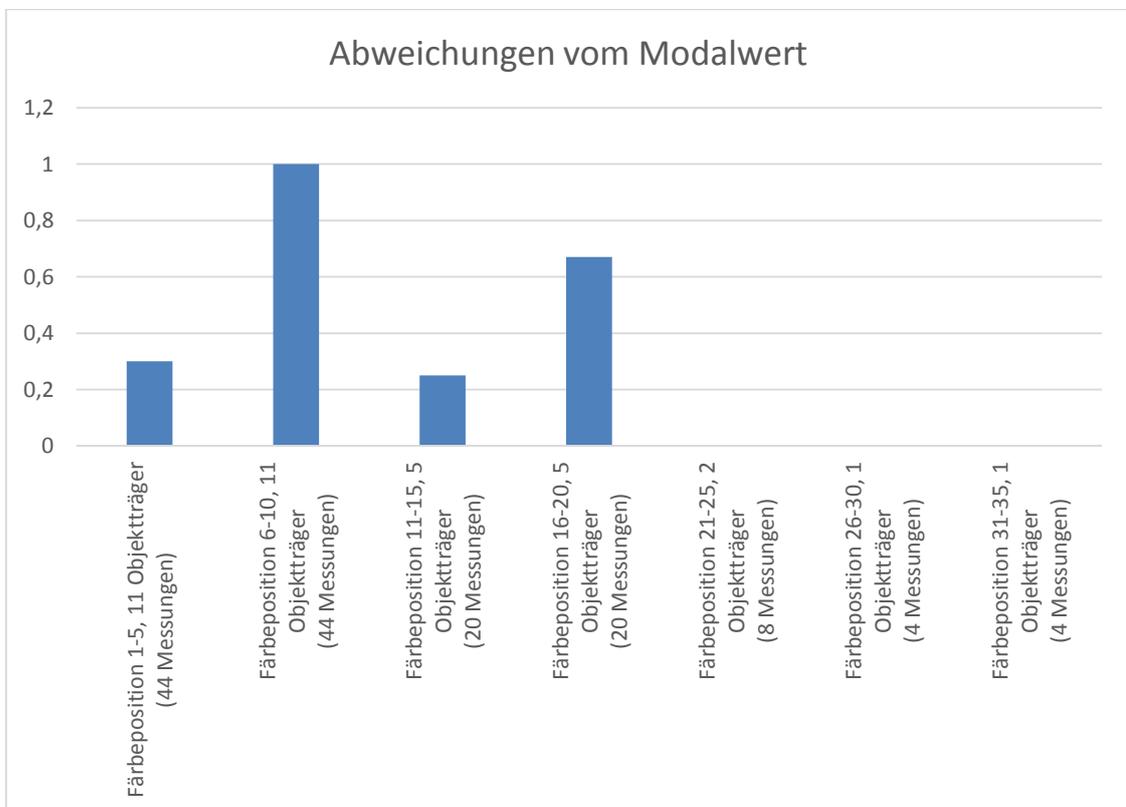
**Tabelle 8: Messergebnisse in Bezug auf die Färbeposition (1-36) gemessen am MotiCyte-DNA**

Aus Tabelle 8 ist keine eindeutige Häufung von Abweichungen in Bezug auf bestimmte Färbepositionen zu entnehmen. Da einige Färbepositionen sehr häufig und andere wiederum nur sehr wenig belegt waren, wurden die Abweichungen einer Färbeposition in Abhängigkeit von der Anzahl der Objektträger (pro Objektträger) berechnet und in Abbildung 8, Abbildung 9 und Abbildung 10 dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 8: Durchschnittliche Anzahl der CV-Abweichungen pro Objektträger in Abhängigkeit von der Färbeposition gemessen am MotiCyte-DNA**



**Abbildung 9: Durchschnittliche Anzahl der Modalwert-Abweichungen pro Objektträger in Abhängigkeit von der Färbeposition gemessen am MotiCyte-DNA**

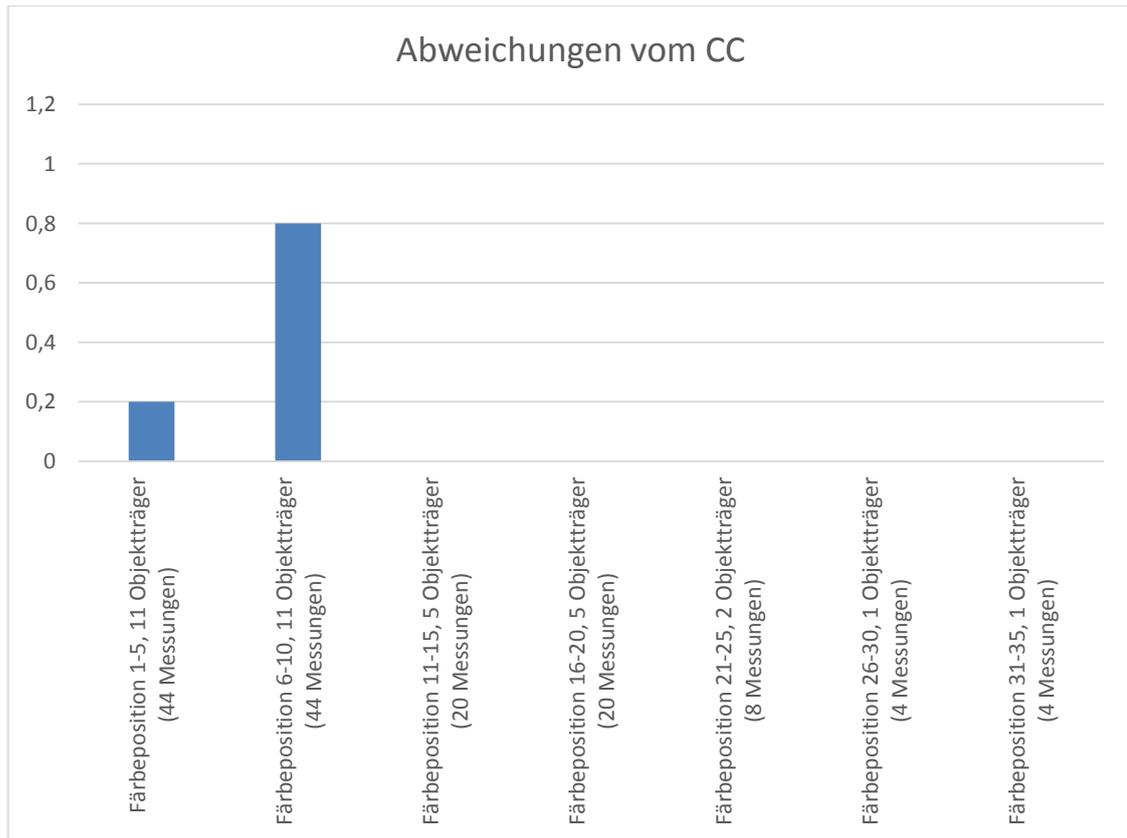


Abbildung 10: Durchschnittliche Anzahl der CC-Abweichungen pro Objektträger in Abhängigkeit von der Färbeposition gemessen am MotiCyte-DNA

Auch aus Abbildung 8, Abbildung 9 und Abbildung 10 lassen sich keine eindeutigen Häufungen von Abweichungen bei bestimmten Färbepositionen erkennen.

### 3.2 Ergebnisse der Messungen am MotiCyte-DNA

#### 3.2.1 Modalwerte jeder Zellfraktion

Für die Messungen an der MotiCyte-DNA-Workstation wurden von zwei Ratten jeweils drei Messreihen durchgeführt, welche wiederum aus vier Objektträgern mit vier Abtupfpräparaten bestanden. Zur Bestimmung der Modalwerte der einzelnen Zellfraktionen an der MotiCyte-DNA-Workstation wurden diese jeweils manuell im DNA-Histogramm markiert und über die Funktion „Statistik“ der Software wurden die gewünschten Werte ermittelt. Diese wurden zur Übersicht in Tabelle 9 und Tabelle 10 dargestellt. In rot wurden die Werte markiert, welche mehr als 5 % vom Sollwert (2c, 4c, 8c) abwichen. Dieser Wert wurde willkürlich zur besseren Betrachtung festgelegt.

## Ergebnisse

| Messparameter |            | 2c   |      |      | 4c   |      |      | 8c   |      |      | Lymphozyten |      |      |
|---------------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|------|------|
|               |            | 1    | 2    | 3    | 1    | 2    | 3    | 1    | 2    | 3    | 1           | 2    | 3    |
| 1             | Modalwerte | 2,01 | 1,99 | 1,96 | 4,04 | 4,04 | 3,87 | 7,90 | 7,92 | 7,51 | 1,00        | 1,01 | 1,02 |
|               |            | 2,03 | 1,97 | 1,99 | 4,07 | 4,07 | 3,90 | 8,16 | 8,04 | 7,83 | 0,99        | 1,02 | 1,01 |
|               |            | 2,01 | 2,02 | 2,02 | 4,05 | 4,06 | 4,02 | 7,71 | 7,99 | 7,99 | 1,00        | 0,99 | 0,99 |
|               |            | 1,92 | 2,01 | 2,00 | 3,96 | 4,04 | 4,02 | 7,80 | 8,02 | 7,98 | 1,04        | 1,00 | 1,00 |
|               |            | 2,04 | 2,00 | 1,85 | 4,13 | 3,99 | 3,95 | 8,15 | 7,69 | 7,95 | 0,98        | 1,00 | 1,08 |
|               |            | 1,97 | 2,04 | 2,01 | 4,05 | 4,12 | 3,98 | 7,93 | 7,98 | 7,87 | 1,02        | 0,98 | 1,00 |
|               |            | 1,97 | 2,01 | 2,03 | 4,02 | 4,05 | 4,05 | 7,92 | 7,70 | 7,98 | 1,02        | 1,00 | 0,99 |
|               |            | 1,98 | 1,93 | 2,00 | 4,05 | 4,00 | 4,00 | 7,86 | 7,86 | 7,91 | 1,01        | 1,04 | 1,00 |
|               |            | 1,96 | 2,04 | 2,01 | 3,93 | 4,13 | 3,98 | 7,81 | 8,33 | 8,67 | 1,02        | 0,98 | 1,00 |
|               |            | 1,96 | 2,03 | 2,00 | 4,04 | 4,10 | 3,96 | 7,93 | 8,00 | 7,79 | 1,02        | 0,99 | 1,00 |
|               |            | 1,95 | 2,04 | 1,99 | 4,07 | 4,14 | 3,93 | 8,18 | 8,38 | 7,76 | 1,03        | 0,98 | 1,01 |
|               |            | 1,94 | 1,99 | 1,99 | 3,92 | 4,03 | 3,95 | 7,76 | 7,85 | 7,85 | 1,03        | 1,01 | 1,01 |
|               |            | 1,88 | 1,98 | 2,00 | 3,68 | 4,01 | 4,00 | 7,66 | 7,90 | 7,86 | 1,06        | 1,01 | 1,00 |
|               |            | 1,93 | 2,03 | 2,00 | 3,87 | 4,09 | 3,98 | 7,50 | 8,17 | 7,92 | 1,04        | 0,99 | 1,00 |
|               |            | 1,80 | 1,95 | 1,98 | 3,67 | 3,99 | 3,95 | 7,31 | 7,89 | 7,83 | 1,11        | 1,03 | 1,01 |
| 2,06          | 1,93       | 1,96 | 4,10 | 3,90 | 3,90 | 8,15 | 7,80 | 7,72 | 0,97 | 1,04 | 1,02        |      |      |

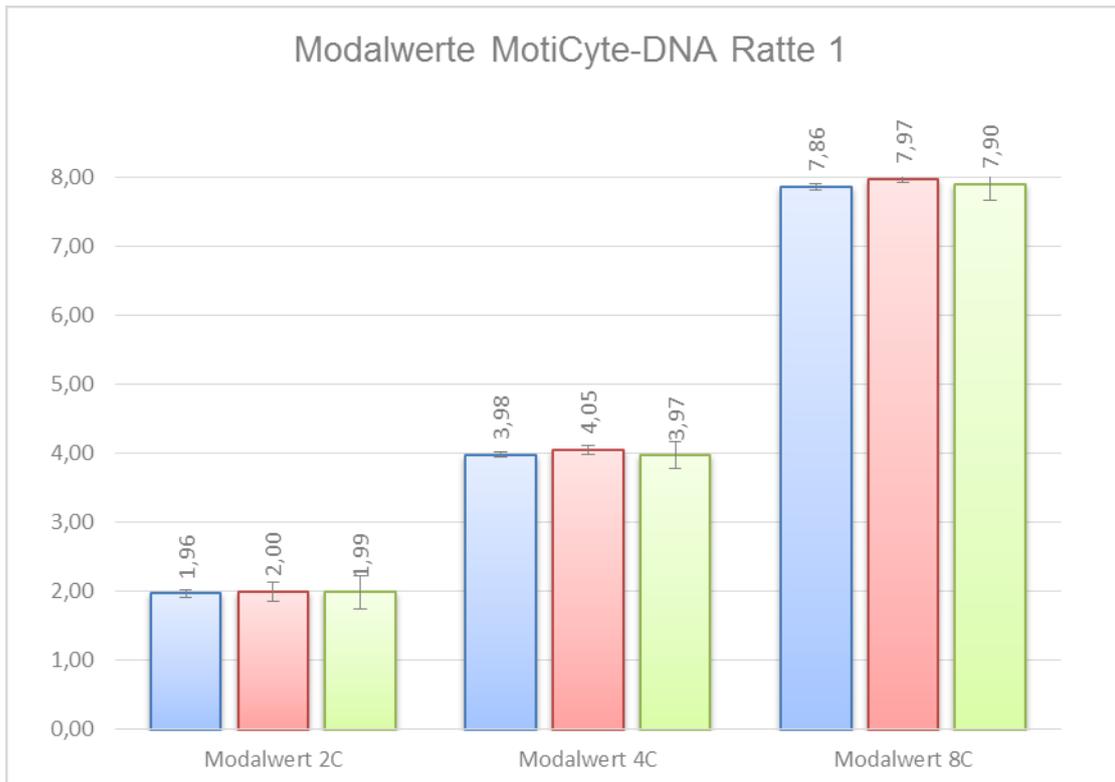
**Tabelle 9: Modalwerte Ratte 1 am MotiCyte-DNA**

| Messparameter |            | 2c   |      |      | 4c   |      |      | 8c   |      |      | Lymphozyten |      |      |
|---------------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|------|------|
|               |            | 1    | 2    | 3    | 1    | 2    | 3    | 1    | 2    | 3    | 1           | 2    | 3    |
| 1             | Modalwerte | 1,99 | 2,00 | 2,00 | 4,03 | 4,04 | 4,06 | 8,00 | 7,86 | 8,19 | 1,01        | 1,00 | 1,00 |
|               |            | 1,93 | 2,02 | 2,03 | 3,90 | 4,03 | 4,03 | 7,95 | 8,00 | 7,83 | 1,04        | 0,99 | 0,99 |
|               |            | 1,97 | 1,98 | 1,98 | 4,01 | 3,97 | 3,93 | 8,00 | 7,94 | 7,80 | 1,02        | 1,01 | 1,01 |
|               |            | 1,99 | 2,05 | 1,95 | 4,02 | 4,11 | 3,90 | 7,97 | 8,08 | 7,72 | 1,01        | 0,98 | 1,03 |
|               |            | 2,01 | 2,01 | 1,95 | 4,06 | 4,09 | 3,94 | 7,97 | 7,98 | 8,18 | 1,00        | 1,00 | 1,03 |
|               |            | 1,88 | 2,07 | 1,98 | 3,91 | 4,23 | 3,93 | 7,75 | 8,33 | 7,83 | 1,06        | 0,97 | 1,01 |
|               |            | 2,08 | 1,95 | 1,97 | 4,14 | 3,94 | 3,88 | 8,02 | 7,82 | 7,85 | 0,96        | 1,03 | 1,02 |
|               |            | 2,04 | 2,01 | 1,97 | 3,97 | 4,03 | 3,88 | 7,72 | 7,93 | 7,74 | 0,98        | 1,00 | 1,02 |
|               |            | 2,00 | 2,01 | 2,04 | 4,05 | 4,07 | 4,10 | 7,90 | 7,98 | 7,99 | 1,00        | 1,00 | 0,98 |
|               |            | 2,06 | 1,95 | 2,01 | 4,20 | 3,92 | 4,11 | 8,25 | 7,62 | 8,02 | 0,97        | 1,03 | 1,00 |
|               |            | 1,96 | 2,05 | 1,90 | 3,90 | 4,18 | 3,89 | 7,66 | 8,73 | 8,02 | 1,02        | 0,98 | 1,05 |
|               |            | 2,00 | 2,03 | 1,98 | 3,97 | 4,07 | 4,00 | 7,94 | 7,88 | 7,99 | 1,00        | 0,99 | 1,01 |
|               |            | 2,04 | 2,00 | 1,95 | 4,16 | 4,04 | 3,88 | 8,12 | 8,85 | 7,55 | 0,98        | 1,00 | 1,03 |
|               |            | 2,02 | 1,98 | 1,94 | 4,12 | 3,95 | 3,95 | 8,24 | 7,97 | 7,90 | 0,99        | 1,01 | 1,03 |
|               |            | 1,98 | 1,98 | 2,15 | 4,11 | 3,93 | 4,29 | 8,55 | 7,85 | 8,78 | 1,01        | 1,01 | 0,93 |
| 2,03          | 1,97       | 2,00 | 4,10 | 3,97 | 4,02 | 8,14 | 7,60 | 7,98 | 0,99 | 1,02 | 1,00        |      |      |

**Tabelle 10: Modalwerte Ratte 2 am MotiCyte-DNA**

In den Abbildungen 11 und 12 werden grafisch die Mittelwerte der Modalwerte jeder Zellkernfraktion und die Standardabweichungen für jede Objektträgermessreihe für beide Ratten gezeigt. Dabei ist zu sehen, dass die Mittelwerte der Modalwerte beider Ratten bei allen Zellfraktionen und in allen Messreihen nah beieinander liegen.

In Abbildung 11 werden die Mittelwerte der Modalwerte jeder Zellfraktion inklusive Standardabweichung für Ratte 2 gezeigt.

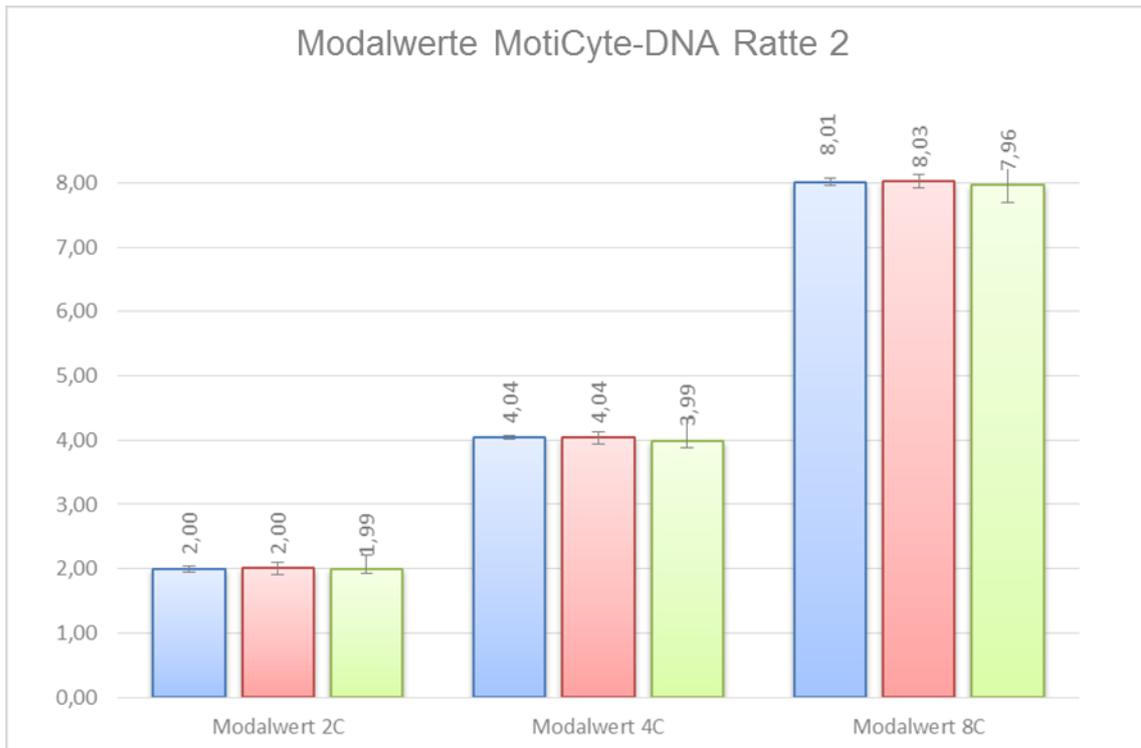


**Abbildung 11: Mittelwerte der Modalwerte jeder Zellfraktion inklusive Standardabweichung für Ratte 1 gemessen am MotiCyte-DNA**

Messwerte pro Objektträgermessreihe bestehend aus 4 Objektträgern mit jeweils 4 Abtupfpräparaten (= 16 Messungen pro Objektträgermessreihe). Es wurden drei Objektträgermessreihen (blau, rot, grün) durchgeführt.

Bei Ratte 1 zeigten sich bei jeder Zellfraktion Mittelwerte der Modalwerte mit einer Standardabweichung, die sehr nah an den geforderten Sollwerten lagen. Jedoch kam es auch hier in den Einzelmessungen zu Ausreißern. In der ersten Messreihe zeigten sich bei den 2c-Zellen ein Wert von 1,88 und 1,80. Die 4c-Zellen zeigten Werte von 3,68 und 3,67. Bei den 8c-Zellen wurden Werte von 7,50 und 7,31 bestimmt. In der dritten Messreihe zeigten sich bei den 2c-Zellen ein Wert von 1,85 und bei den 8c-Zellen von 7,51 und 8,67.

Abbildung 12 zeigt die Mittelwerte der Modalwerte jeder Zellfraktion inklusive Standardabweichung für Ratte 2.



**Abbildung 12: Mittelwerte der Modalwerte jeder Zellfraktion inklusive Standardabweichung für Ratte 2 gemessen am MotiCyte-DNA**

Messwerte pro Objektträgermessreihe bestehend aus 4 Objektträgern mit jeweils 4 Abtupfpräparaten (= 16 Messungen pro Objektträgermessreihe). Es wurden drei Objektträgermessreihen (blau, rot, grün) durchgeführt.

Bei Ratte 2 zeigten sich bei jeder Zellfraktion Mittelwerte der Modalwerte mit einer Standardabweichung, welche ebenfalls nahe an den geforderten Sollwerten von 2c, 4c und 8c lagen. Ausreißer bei dieser Ratte wurden bei den Einzelmessungen in der ersten Messreihe bei den 2c-Zellen mit einem Wert von 1,88 und bei den 8c-Zellen von 8,55 festgestellt. In der zweiten Messreihe zeigte sich bei den 4c-Zellen ein Wert von 4,23 und bei den 8c-Zellen von 8,73 und 8,85. In der dritten Messreihe wurde bei den 2c-Zellen ein Wert von 2,15, bei den 4c-Zellen von 4,29 und bei den 8c-Zellen von 7,55 und 8,78 festgestellt.

### 3.2.2 CV jeder Zellfraktion und der Referenzzellen

Für jede Zellfraktion in jeder Messung wurde der CV ermittelt, indem manuell im DNA-Histogramm in der Software die Zellen der einzelnen Zellfraktionen markiert und über die Funktion „Statistik“ die gewünschten Werte dargestellt wurden. Bei diesem Wert ist eine möglichst geringe Streuung erforderlich und somit ein möglichst kleiner Wert. Von der ESACP wird eine Unterschreitung von 5 % gefordert. Die ermittelten

## Ergebnisse

Werte der beiden Ratten werden jeweils in der Abbildung 13 und Abbildung 14 und der Tabelle 11 und Tabelle 12 dargestellt.

| Messparameter |                       | 2c   |      |      | 4c   |      |      | 8c    |      |      | Lymphozyten |      |      |
|---------------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|-------------|------|------|
|               |                       | 1    | 2    | 3    | 1    | 2    | 3    | 1     | 2    | 3    | 1           | 2    | 3    |
| 2             | CV jeder Zellfraktion | 2,97 | 4,81 | 6,53 | 3,14 | 4,09 | 4,74 | 4,96  | 2,71 | 6,23 | 4,76        | 3,53 | 2,91 |
|               |                       | 6,50 | 4,99 | 2,71 | 6,52 | 3,49 | 2,88 | 5,28  | 2,79 | 2,81 | 4,96        | 3,13 | 2,46 |
|               |                       | 5,01 | 5,18 | 2,45 | 4,16 | 3,72 | 2,32 | 4,25  | 3,13 | 3,03 | 3,97        | 3,87 | 2,33 |
|               |                       | 4,34 | 4,30 | 2,83 | 4,50 | 3,01 | 2,68 | 4,11  | 3,87 | 3,60 | 4,21        | 3,12 | 2,21 |
|               |                       | 4,21 | 4,05 | 5,02 | 4,23 | 2,78 | 3,62 | 3,59  | 3,66 | 7,27 | 3,21        | 2,59 | 2,46 |
|               |                       | 3,58 | 4,59 | 3,69 | 3,27 | 2,82 | 2,46 | 3,81  | 3,73 | 4,82 | 1,92        | 2,88 | 2,24 |
|               |                       | 4,27 | 3,69 | 3,70 | 3,70 | 2,79 | 2,69 | 3,62  | 4,05 | 3,53 | 4,29        | 2,38 | 2,27 |
|               |                       | 3,68 | 4,66 | 2,32 | 3,08 | 3,61 | 1,71 | 2,10  | 4,17 | 2,31 | 4,42        | 2,57 | 1,95 |
|               |                       | 4,25 | 5,21 | 5,10 | 2,96 | 4,28 | 2,50 | 2,88  | 4,96 | 3,87 | 4,60        | 2,80 | 2,82 |
|               |                       | 3,37 | 3,70 | 2,34 | 2,90 | 2,72 | 1,81 | 2,83  | 2,58 | 2,31 | 4,78        | 2,39 | 1,75 |
|               |                       | 5,07 | 4,99 | 1,84 | 4,58 | 3,37 | 1,78 | 5,25  | 3,65 | 2,43 | 4,82        | 2,44 | 2,16 |
|               |                       | 4,07 | 3,98 | 3,59 | 3,51 | 2,72 | 2,30 | 2,67  | 3,25 | 3,11 | 4,62        | 2,45 | 2,62 |
|               |                       | 9,13 | 4,37 | 2,57 | 5,78 | 2,81 | 1,93 | 7,95  | 2,80 | 4,10 | 4,36        | 2,17 | 1,80 |
|               |                       | 5,37 | 5,00 | 2,43 | 3,32 | 3,37 | 1,69 | 4,03  | 3,52 | 2,64 | 3,67        | 2,41 | 2,69 |
|               |                       | 7,44 | 3,75 | 2,61 | 5,44 | 3,36 | 1,80 | 12,54 | 2,56 | 2,75 | 4,35        | 2,40 | 1,91 |
|               |                       | 6,24 | 4,56 | 2,66 | 5,27 | 2,83 | 1,76 | 5,57  | 5,53 | 2,18 | 2,66        | 2,82 | 2,14 |

**Tabelle 11: CV der Zellfraktionen, Ratte 1 am MotiCyte-DNA**

Ergebnisse

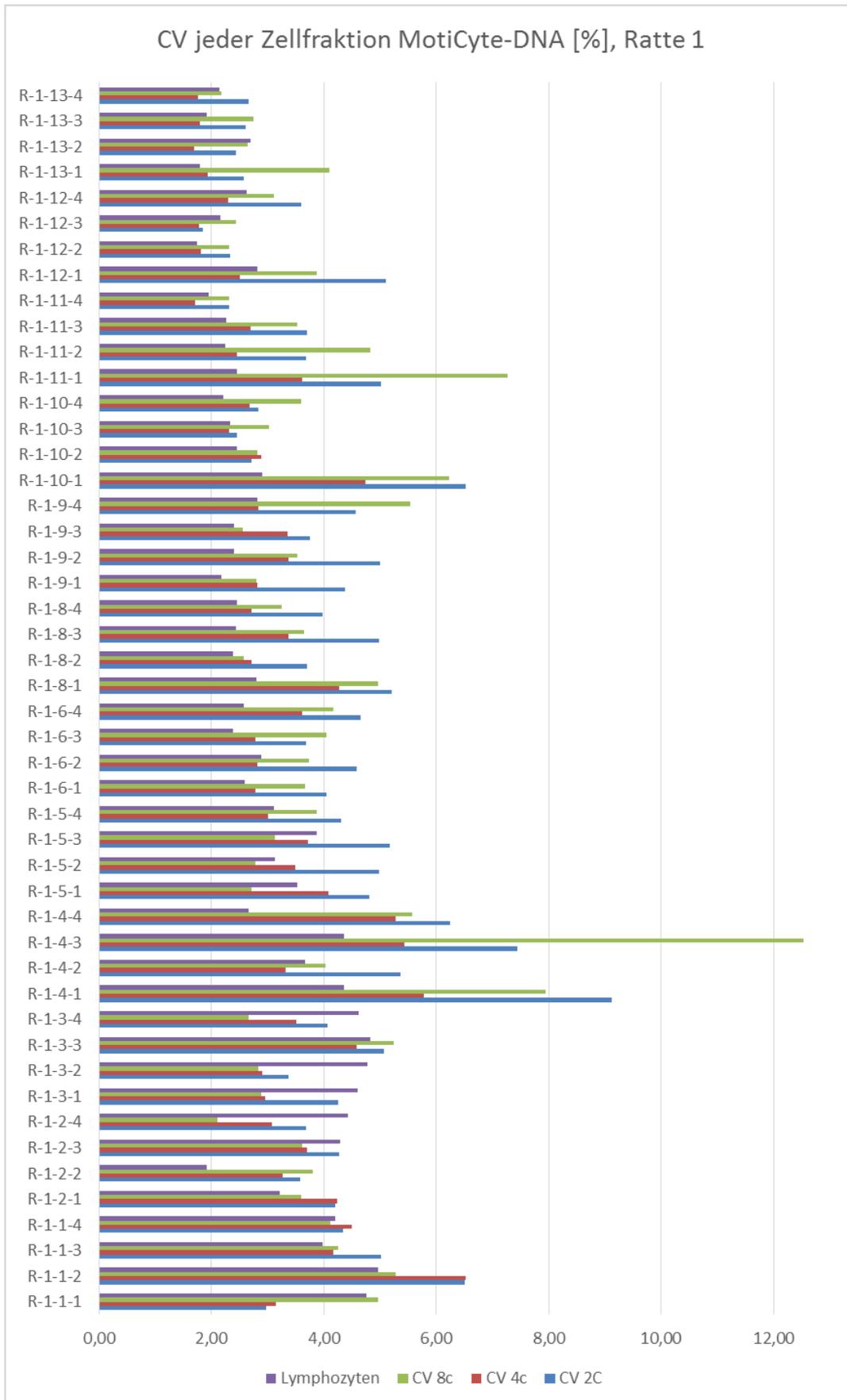


Abbildung 13: CV-Werte jeder Zellfraktion der Ratte 1 am MotiCyte.

## Ergebnisse

Bei Ratte 1 lagen in den nachfolgend genannten Messreihen CVs über den geforderten 5 %: 1. Messreihe: 7 der 2c-Zellen, 4 der 4c-Zellen und 5 der 8c-Zellen. 2. Messreihe: 2 der 2c-Zellen, 1 der 8c-Zellen. 3. Messreihe: 3 der 2c-Zellen, 2 der 8c-Zellen.

Bei Ratte 1 ist in der Abbildung 13 eine größere Streuung der CV-Werte der 8c- und 4c-Zellen im Vergleich zu den Referenzzellen und 2c-Zellen unterhalb der 5 %-Grenze zu sehen.

| Messparameter |                       | 2c   |      |      | 4c   |      |      | 8c   |      |      | Lymphozyten |      |      |
|---------------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|------|------|
|               |                       | 1    | 2    | 3    | 1    | 2    | 3    | 1    | 2    | 3    | 1           | 2    | 3    |
| 2             | CV jeder Zellfraktion | 5,32 | 3,69 | 4,72 | 2,44 | 3,28 | 2,61 | 4,19 | 3,44 | 9,33 | 3,08        | 3,22 | 2,93 |
|               |                       | 5,00 | 4,11 | 4,66 | 3,49 | 3,12 | 4,56 | 4,42 | 4,16 | 5,88 | 2,45        | 2,66 | 3,15 |
|               |                       | 4,65 | 3,62 | 3,97 | 3,73 | 2,67 | 4,31 | 5,46 | 3,63 | 7,16 | 3,35        | 2,34 | 2,06 |
|               |                       | 4,49 | 3,86 | 4,25 | 3,49 | 3,43 | 1,94 | 5,30 | 4,01 | 5,05 | 2,85        | 2,63 | 2,30 |
|               |                       | 3,77 | 3,80 | 6,10 | 2,99 | 3,22 | 4,14 | 3,45 | 3,49 | 9,51 | 2,31        | 3,07 | 2,71 |
|               |                       | 4,38 | 4,18 | 3,56 | 3,75 | 3,30 | 2,75 | 2,99 | 5,33 | 9,00 | 2,87        | 2,93 | 2,69 |
|               |                       | 3,15 | 4,27 | 4,98 | 2,51 | 4,13 | 3,06 | 4,67 | 3,93 | 4,92 | 2,85        | 3,10 | 2,75 |
|               |                       | 4,13 | 3,93 | 3,60 | 3,21 | 2,81 | 3,03 | 5,60 | 3,65 | 4,68 | 2,97        | 3,59 | 2,10 |
|               |                       | 3,29 | 3,38 | 4,08 | 3,45 | 2,91 | 4,03 | 3,81 | 4,64 | 5,92 | 2,45        | 2,54 | 2,57 |
|               |                       | 4,51 | 3,93 | 4,49 | 3,32 | 3,73 | 2,99 | 4,10 | 4,93 | 5,84 | 3,04        | 2,81 | 2,99 |
|               |                       | 4,62 | 4,85 | 6,84 | 2,35 | 3,78 | 5,35 | 3,87 | 8,42 | 7,87 | 2,74        | 3,04 | 2,85 |
|               |                       | 3,85 | 4,23 | 6,32 | 2,67 | 3,75 | 3,90 | 3,44 | 5,27 | 5,68 | 2,57        | 2,53 | 2,98 |
|               |                       | 3,86 | 4,80 | 3,86 | 2,79 | 4,12 | 2,97 | 4,92 | 6,51 | 4,09 | 2,52        | 2,54 | 2,53 |
|               |                       | 4,66 | 3,11 | 6,92 | 3,07 | 2,91 | 6,07 | 5,60 | 4,50 | 5,47 | 3,12        | 2,46 | 2,80 |
|               |                       | 5,38 | 2,34 | 8,34 | 4,22 | 2,54 | 6,96 | 6,71 | 6,12 | 0,00 | 2,40        | 2,03 | 2,67 |
| 3,67          | 3,53                  | 5,18 | 4,01 | 3,11 | 4,30 | 5,24 | 5,05 | 4,87 | 3,01 | 2,23 | 3,21        |      |      |

**Tabelle 12: CV der Zellfraktionen, Ratte 2 am MotiCyte-DNA**

Ergebnisse

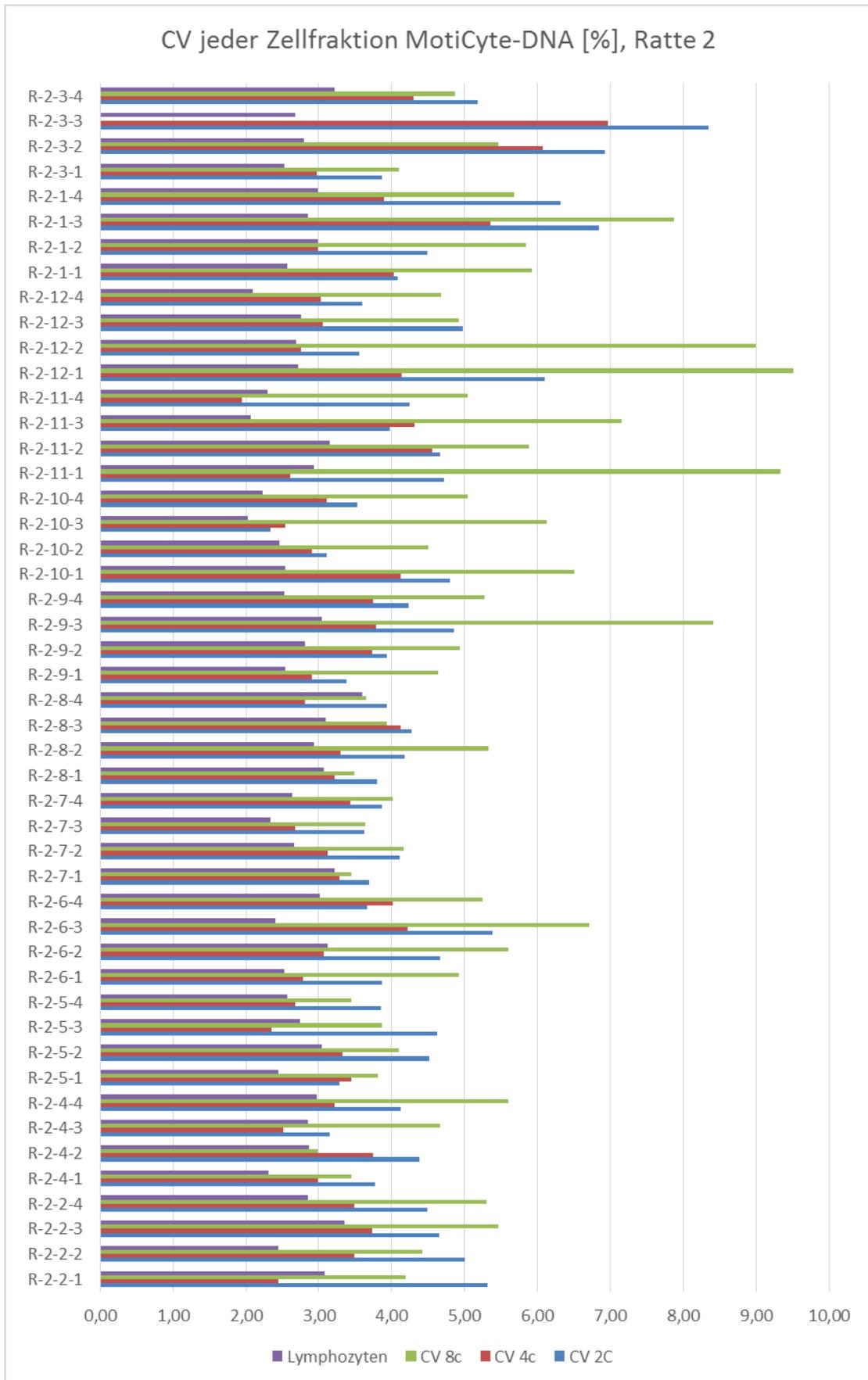


Abbildung 14: CV-Werte jeder Zellfraktion der Ratte 2 am MotiCyte.

## *Ergebnisse*

Bei Ratte 2 lagen in den nachfolgend genannten Messreihen CVs über den geforderten 5 %: 1. Messreihe: 2 der 2c-Zellen, 6 der 8c-Zellen. 2. Messreihe: 6 der 8c-Zellen. 3. Messreihe: 6 der 2c-Zellen, 3 der 4c-Zellen, 11 der 8c-Zellen.

Auch bei Ratte 2 zeigt Abbildung 14, dass die Werte insgesamt nicht immer unterhalb der 5 %-Grenze liegen, besonders die CV-Werte der 2c- und 8c-Zellen zeigen hohe Werte auf.

Insgesamt zeigt sich, dass die Mehrheit der Werte unterhalb von 5 % liegt, es jedoch zu Ausreißern kommt. Zwischen den Ratten gab es große Unterschiede in der absoluten Anzahl der Ausreißer. So zeigten sich bei Ratte 1 24 Ausreißer und bei Ratte 2 stieg die Anzahl auf 34 Ausreißerwerte an. Anhand der Abbildung 13 und Abbildung 14 lässt sich gut erkennen, dass die CV-Werte von Ratte 1 zu Ratte 2 leicht ansteigen. So zeigt sich bei Ratte 1 ein Mittelwert aller CV-Werte der 2c-Zellen von 4,24 und bei Ratte 2 von 4,42. Der Mittelwert der CV-Werte der 4c-Zellen steigt von 3,27 bei Ratte 1 auf 3,48 bei Ratte 2 an. Ebenso steigt der Mittelwert der CV-Werte der 8c-Zellen von 3,95 bei Ratte 1 auf 5,13 bei Ratte 2 an. Insgesamt zeigen sich besonders hohe CV-Werte bei den 8c-Zellen beider Ratten.

Die CV-Werte der Referenzzellen liegen in jeder Einzelmessung unter 5 %.

### **3.2.3 CV der IOD von jedem 2c-, 4c- und 8c-Peak und der Referenzzellen in jedem 4x4 Imprint**

In diesem Schritt der Überprüfung der Messpräzision wurde der Variationskoeffizient pro 4x4 *Imprint* (bezogen auf eine Messreihe) und pro Zellfraktion bestimmt. Dieser wurde ermittelt, indem die Standardabweichung durch den Mittelwert aller CV-Werte einer Zellfraktion innerhalb eines 4x4 *Imprints* geteilt wurde. Von der ESACP wird eine Unterschreitung dieser CV-Werte von 5 % gefordert. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bei allen untersuchten Messreihen eingehalten werden (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16).

## Ergebnisse

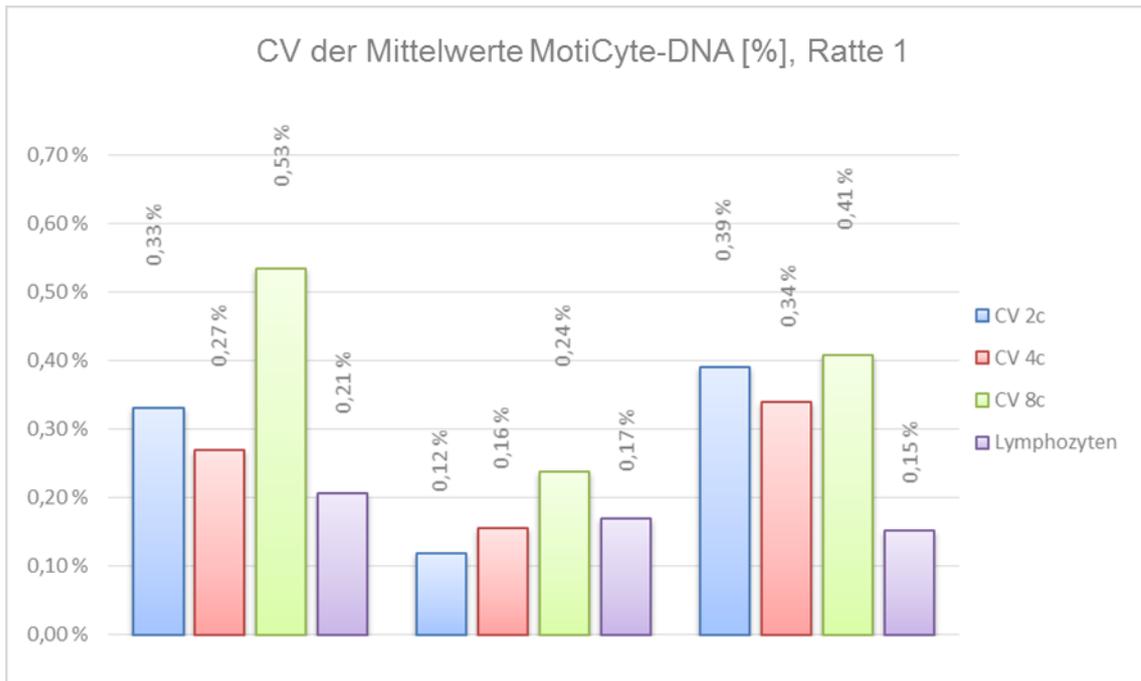


Abbildung 15: CV-Werte der IODs aller *Peaks* pro Messreihe, Ratte 1, gemessen am MotiCyte-DNA.

Abbildung 15 zeigt die CV-Werte der IOD der *Peaks* aus den Messreihen der Ratte 1. Bei dieser Ratte liegen die CV-Werte der *Peaks* deutlich unterhalb des geforderten Wertes. Der höchste Wert zeigt sich in der ersten Messreihe mit 0,53 %. Die zweite Messreihe zeigt insgesamt die niedrigsten CV-Werte.

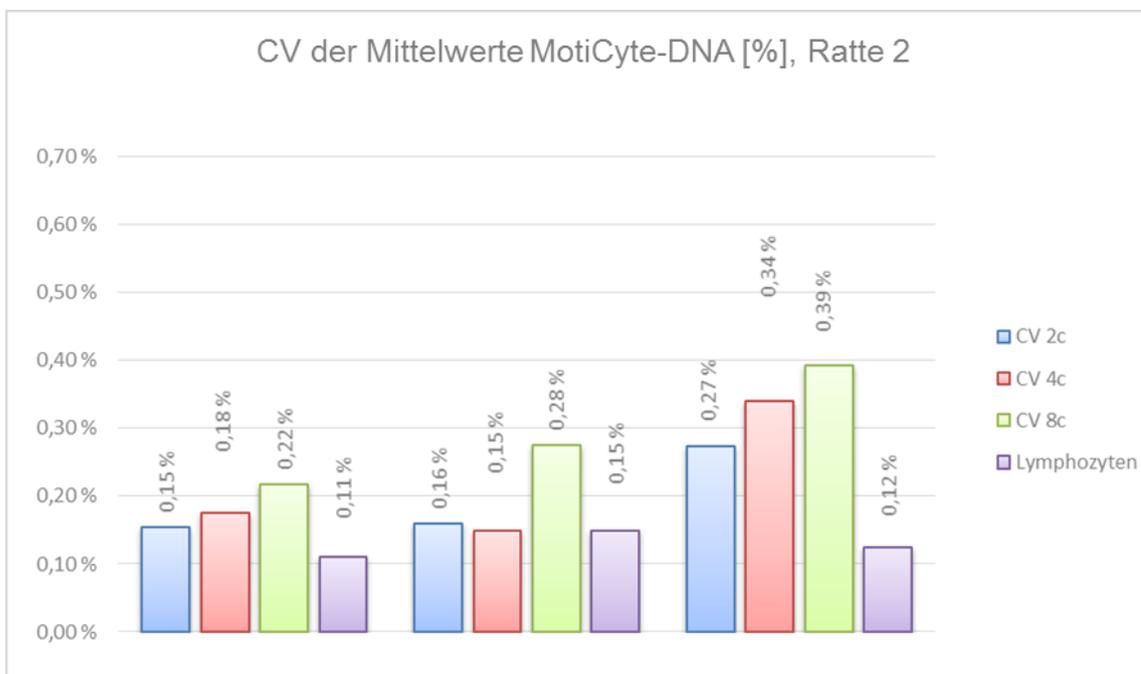


Abbildung 16: CV-Werte der IODs aller *Peaks* pro Messreihe, Ratte 2, gemessen am MotiCyte-DNA.

## *Ergebnisse*

Die CV-Werte der IOD aller *Peaks* der Ratte 2 werden in Abbildung 16 gezeigt. Der zu unterschreitende Wert von 5 % wird bei dieser Ratte ebenfalls von allen *Peaks* und allen Messreihen deutlich unterschritten. Bei dieser Ratte zeigt sich ein tendenzieller Anstieg der CV-Werte von der ersten Messreihe zur dritten Messreihe. Der höchste Wert der dritten Messreihe liegt bei 0,39 %.

### **3.2.4 Korrelationskoeffizient der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern-Peak (2c, 4c und 8c)**

Der Korrelationskoeffizient der Messungen für jeden *Zellkern-Peak* wurde ermittelt, indem in der Software manuell jede Zellfraktion als "Referenzzelle" deklariert wurde, da so automatisch der CC berechnet und im Report angegeben wurde. Die Forderung der ESACP ist, dass der CC unter 0,4 liegt. In den vorliegenden Messungen gab es Ausreißer, die dieser Vorgabe nicht entsprachen. Die Mehrheit der Messergebnisse lag jedoch innerhalb des geforderten Rahmens.

Innerhalb der Messwerte der Ratte 1 gab es nur in der ersten Messreihe zwei Ausreißer bei den CC-Werten der 8c-Zellen mit -0,68 und -0,77 (siehe Abbildung 17).

Bei den Messwerten der Ratte 2 zeigten sich insgesamt die meisten Ausreißer (Abbildung 18). In der ersten Messreihe zeigten sich ein Ausreißer bei den CC-Werten der 4c-Zellen mit -0,80 und zwei Ausreißer der CC-Werte der 8c-Zellen mit - 0,82 und - 0,50. In der zweiten Messreihe zeigte sich ein Ausreißer in den CC-Werten der 8c-Zellen mit -0,5. In der dritten Messreihe waren zwei Ausreißer innerhalb der CC-Werte der 4c-Zellen mit -0,42 und -0,43 festzustellen. Bei den CC-Werten der 8c-Zellen gab es 3 Ausreißer mit -0,5, -0,49 und -0,53.

## Ergebnisse

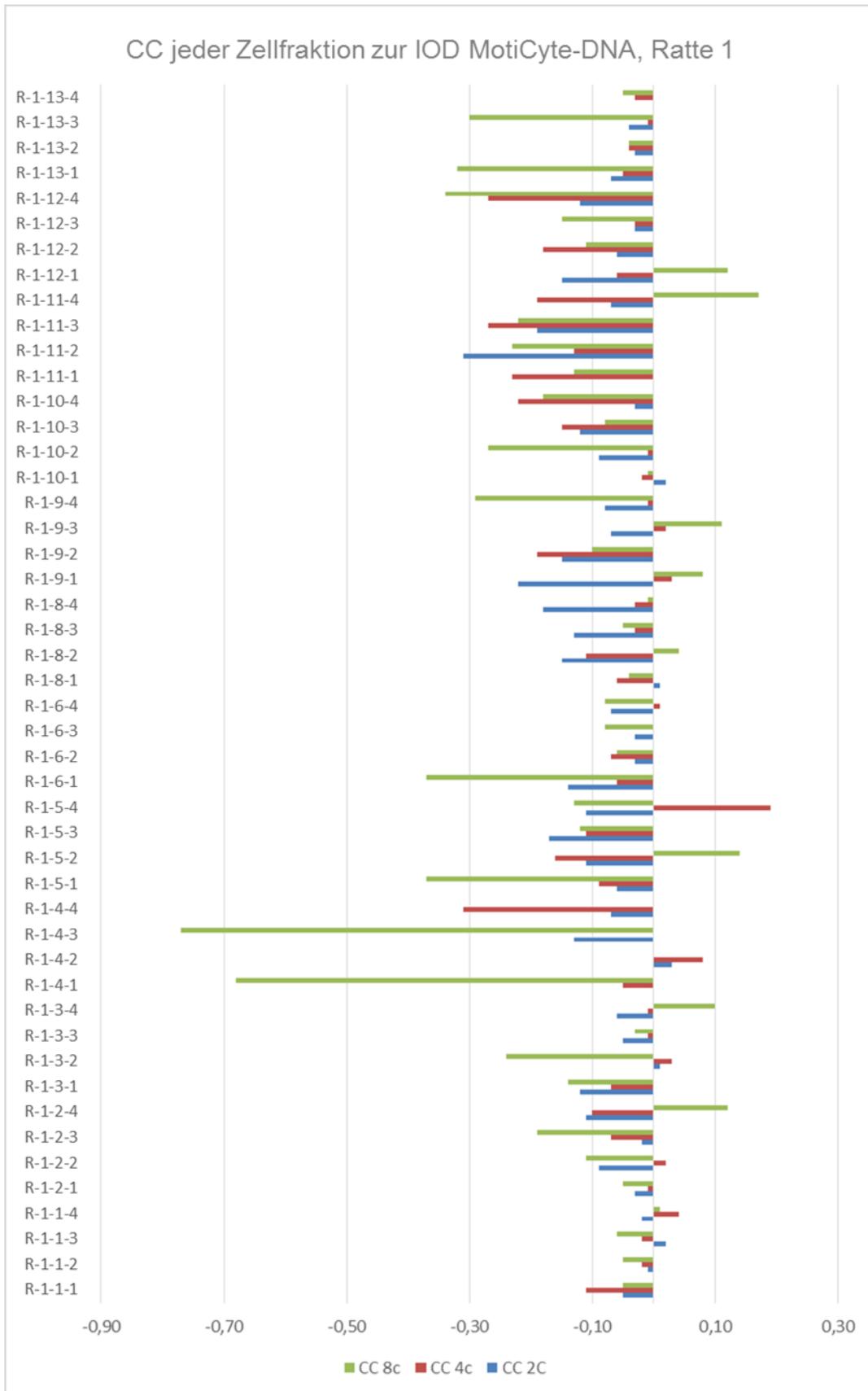


Abbildung 17: Korrelationskoeffizient der Zellkernflächen gegenüber den IODs, Ratte 1, gemessen am MotiCyte-DNA.

Ergebnisse

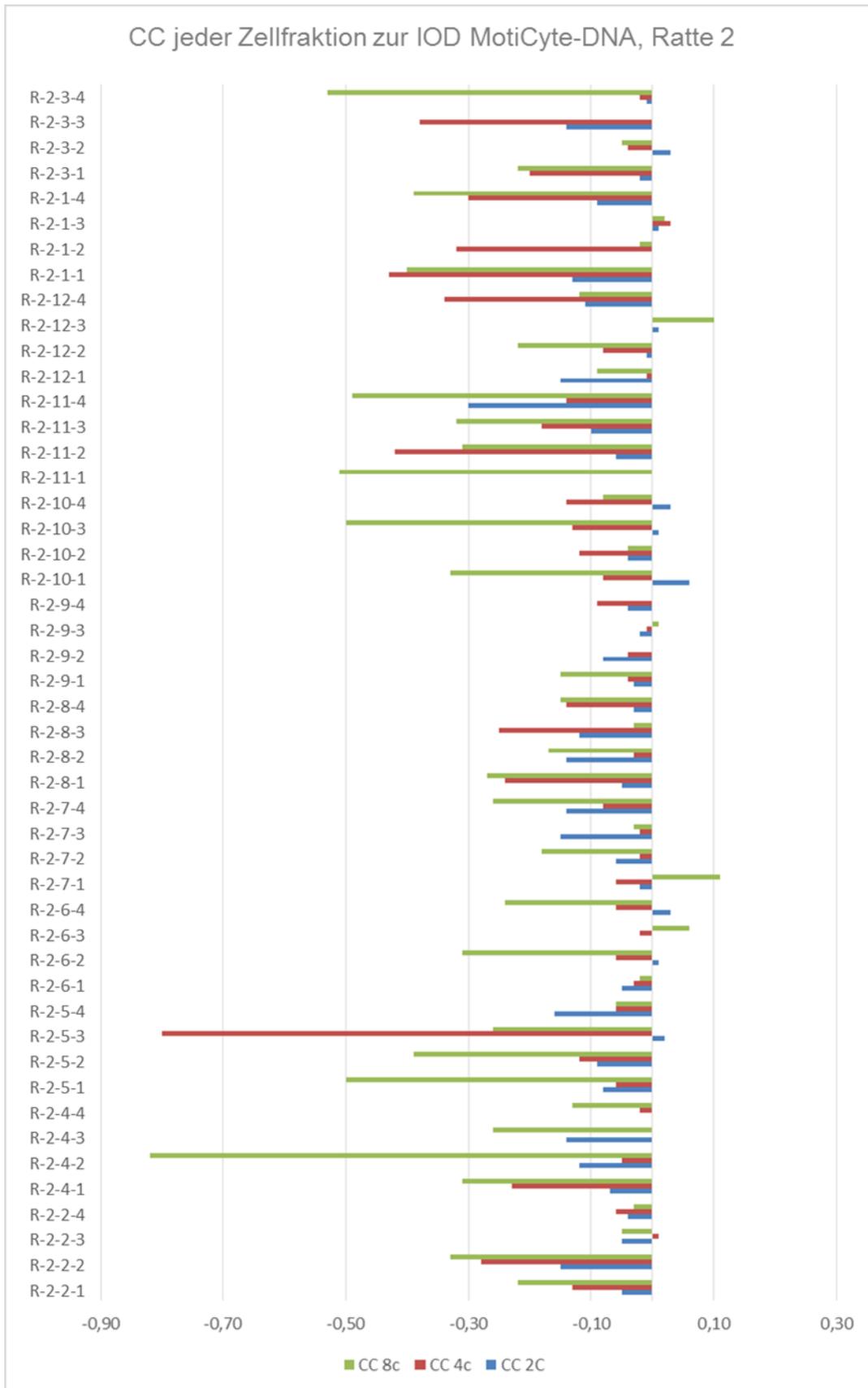
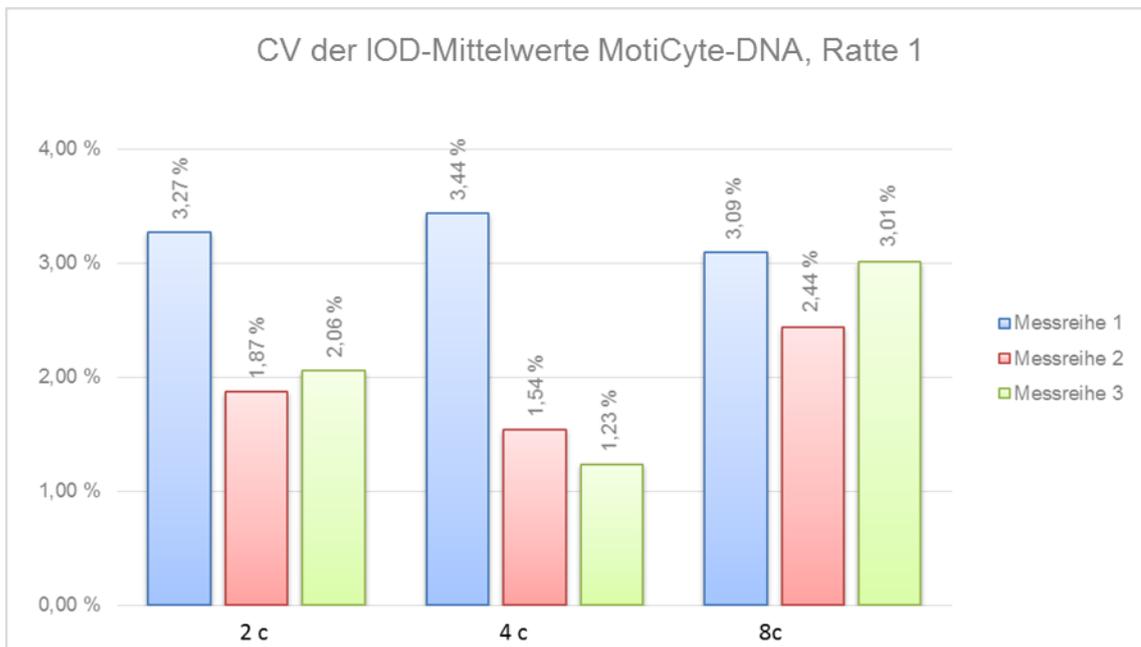


Abbildung 18: Korrelationskoeffizient der Zellkernflächen gegenüber den IODs, Ratte 2, gemessen am MotiCyte-DNA.

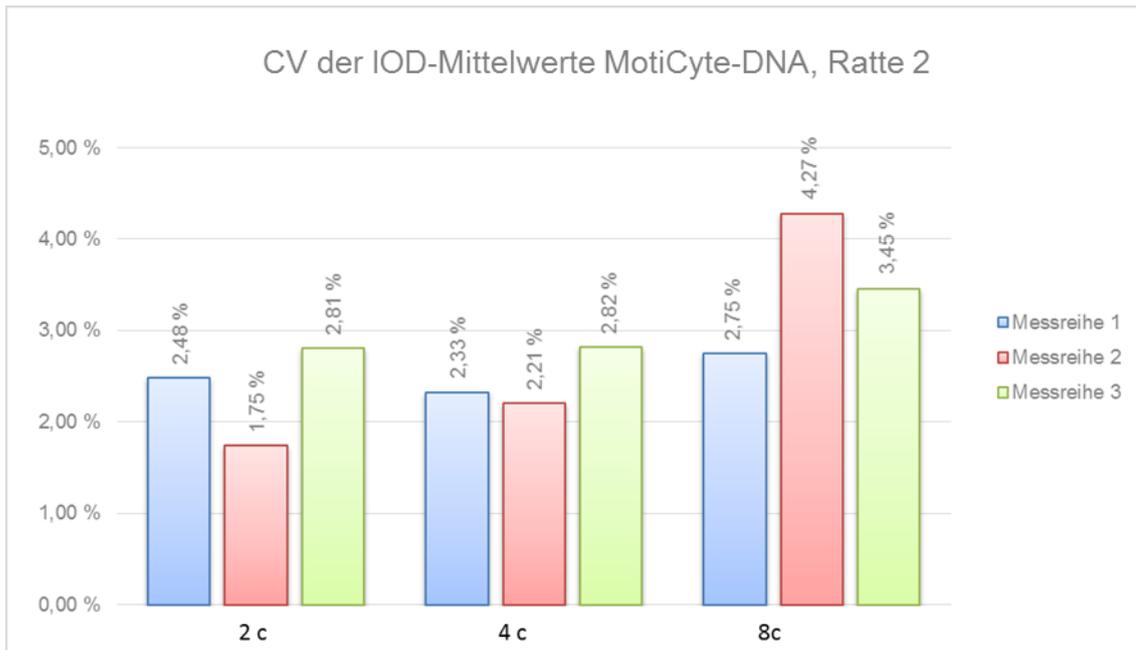
### 3.2.5 CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp (2c-Hepatozyten, 4c-Hepatozyten, 8c-Hepatozyten) innerhalb eines 4x4 *Imprints*

Der CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp wurde ermittelt, indem alle erhaltenen Modalwerte jeder Zellfraktion aus jedem 4x4 *Imprint* addiert wurden und daraus Standardabweichung und Mittelwert bestimmt wurden. Aus diesen Werten wurde dann der CV berechnet. Von der ESACP wird hier eine Unterschreitung des CVs von 3 % gefordert.



**Abbildung 19:** CV der IOD-Mittelwerte der drei Messreihen, Ratte 1, gemessen am MotiCyte-DNA.

Die geforderte Unterschreitung von 3 % wird in der ersten Messreihe der Ratte 1 (Abbildung 19) nicht eingehalten. Hier ergibt sich aus den Modalwerten der 2c-Zellen ein CV von 3,27 %, aus den Modalwerten der 4c-Zellen ein CV 3,44 % und aus den Modalwerten der 8c-Zellen ergibt sich ein CV von 3,09 %.



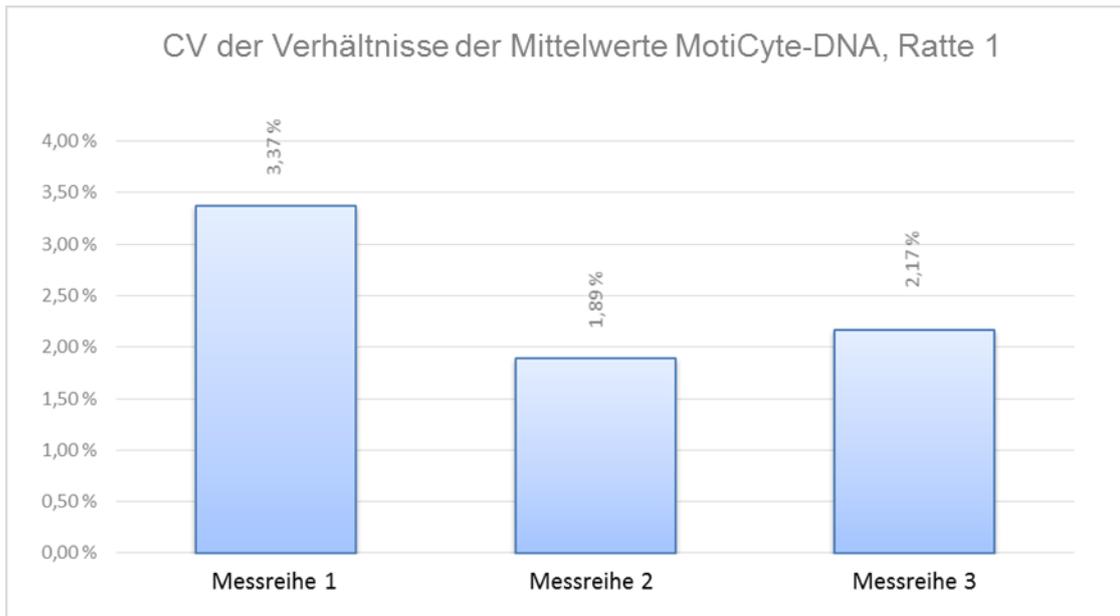
**Abbildung 20: CV der IOD-Mittelwerte der drei Messreihen, Ratte 2, gemessen am MotiCyte-DNA.**

Bei Ratte 2 (Abbildung 20) ergibt sich in der zweiten Messreihe aus den Modalwerten der 8c-Zellen ein CV von 4,27 %. Aus den Modalwerten der 8c-Zellen der dritten Messreihe ergibt sich ein CV von 3,45 %. Die CV-Werte der anderen Messreihen liegen unterhalb der geforderten 3 %.

### 3.2.6 CV der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4 *Imprint*

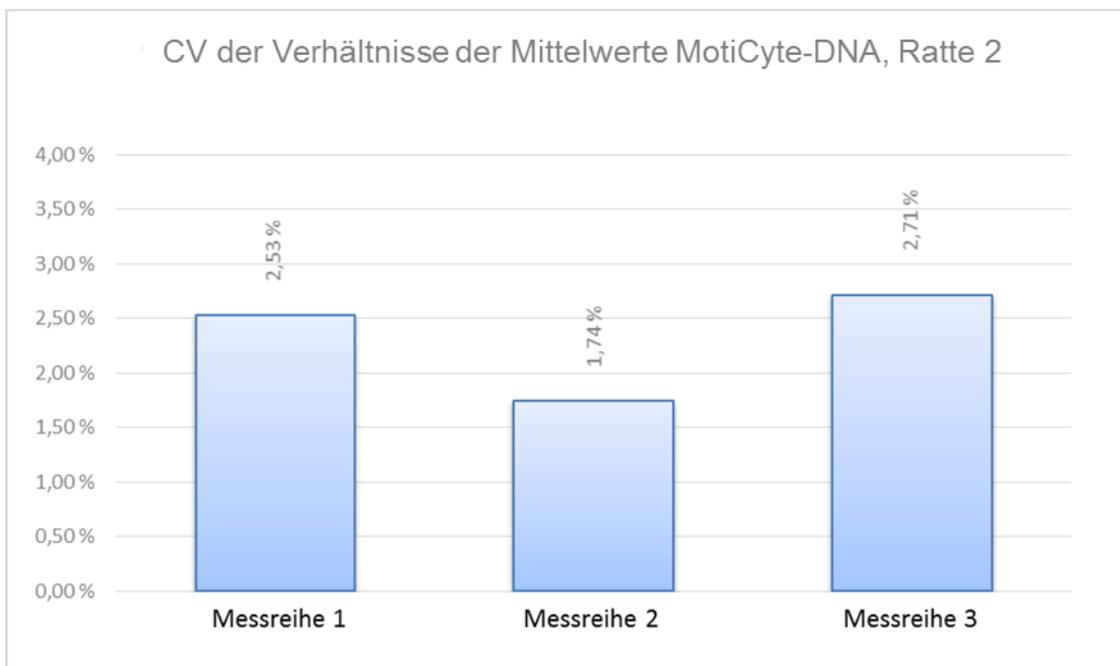
Die CV-Werte der Verhältnisse der *Peak*-Mittelwerte von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) wurden ermittelt, indem zunächst für jede Messung das Verhältnis der Modalwerte der Referenzzellen zu den Analysezellen berechnet wurde. Anschließend wurden diese Werte pro Messreihe (4x4 *Imprint*) addiert und der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Hieraus wurde der CV berechnet. Von der ESACP wurde eine Unterschreitung dieser Streuung von 2 % gefordert.

## Ergebnisse



**Abbildung 21:** CV-Werte der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von Referenzzellen zu Analysezellen, Ratte 1, am MotiCyte-DNA.

Bei Ratte 1 (Abbildung 21) ergab sich in der ersten Messreihe ein CV von 3,37 % und in der dritten Messreihe von 2,17 %, womit in beiden Fällen die Forderung der Unterschreitung von 2 % nicht erfüllt wurde.



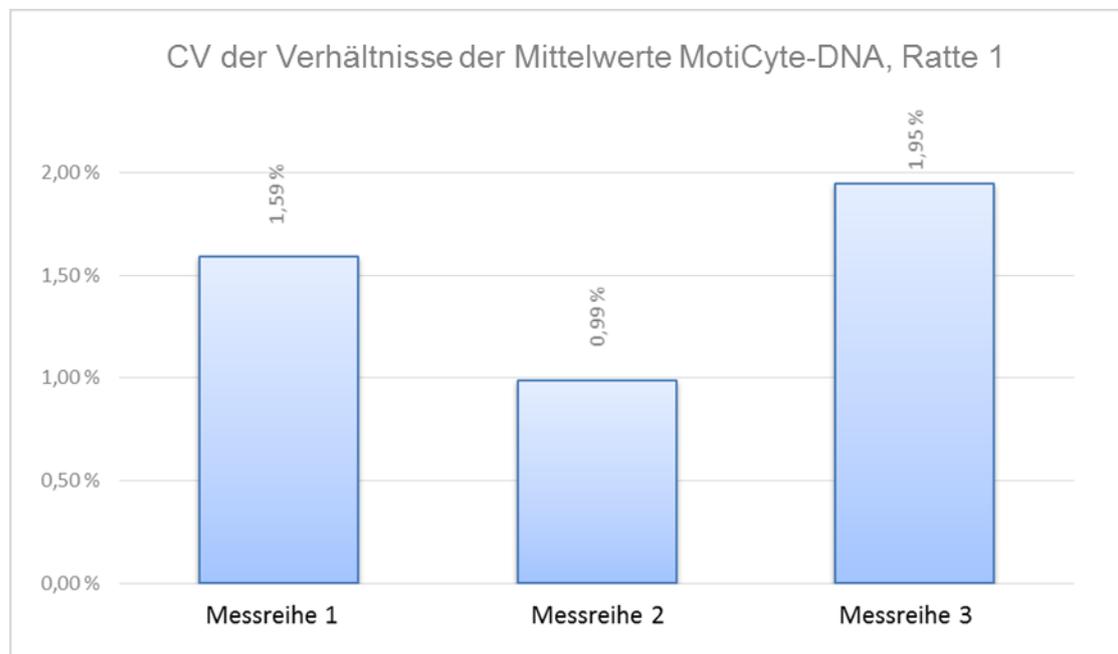
**Abbildung 22:** CV-Werte der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von Referenzzellen zu Analysezellen, Ratte 2, am MotiCyte-DNA.

## Ergebnisse

Bei Ratte 2 (Abbildung 22) wurde in der ersten Messreihe ein CV von 2,53 % und in der dritten Messreihe von 2,71 % ermittelt, die somit ebenfalls nicht den Anforderung (<2 %) genügten.

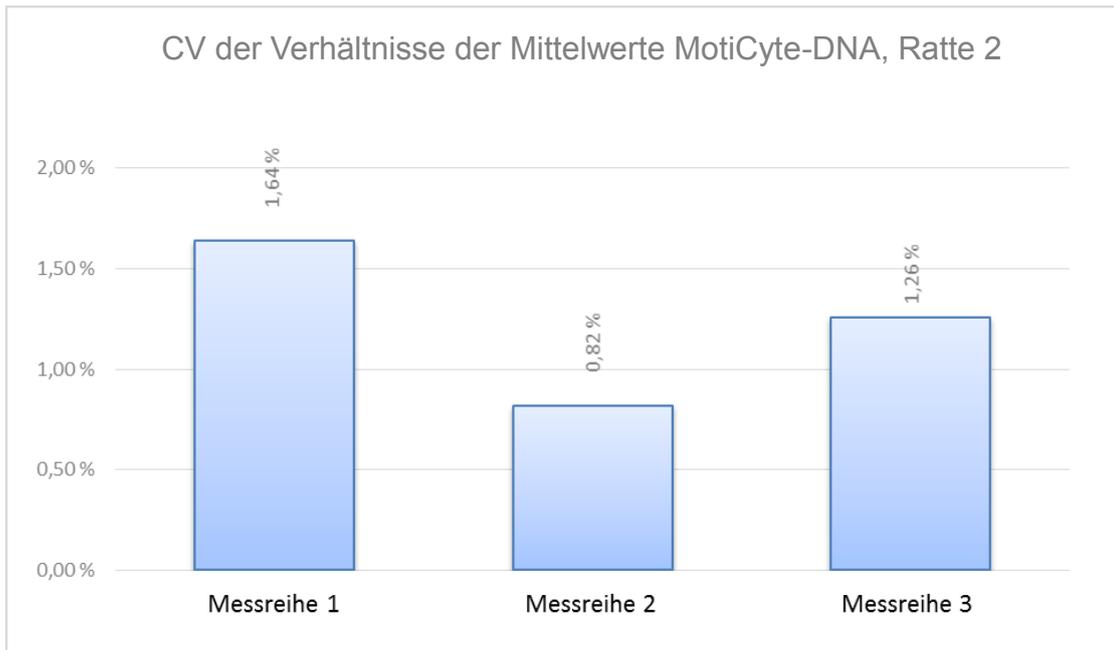
### 3.2.7 CV der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von tetraploiden zu diploiden Zellkernen von jedem 4x4 *Imprint*

Der CV-Wert der Verhältnisse der Mittelwerte von tetraploiden zu diploiden Zellkernen von jedem 4x4 *Imprint* wurde gebildet, indem die Quotienten der Modalwerte aller 4c- und 2c-Hepatozyten-Populationen von einer Messreihe addiert wurden. Daraus wurden Mittelwert und Standardabweichung gebildet. Hieraus wiederum wurde der CV-Wert berechnet. Von der ESACP wurde eine Unterschreitung dieses CV-Wertes von 1 % gefordert.



**Abbildung 23: CV-Werte der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von tetraploiden zu diploiden Zellen aller Messreihen, Ratte 1, am MotiCyte-DNA.**

Bei Ratte 1 (Abbildung 23) zeigte sich in der ersten Messreihe ein CV-Wert von 1,59 % und in der dritten Messreihe ein CV-Wert von 1,95 %. Diese ermittelten Werte für Ratte 1 überschritten somit den geforderten Wert.



**Abbildung 24: CV-Werte der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von tetraploiden zu diploiden Zellen aller Messreihen, Ratte 2, am MotiCyte-DNA.**

Bei Ratte 2 (Abbildung 24) konnte in der ersten Messreihe ein CV-Wert von 1,64 % und in der dritten Messreihe von 1,26 % festgestellt werden, welche somit ebenfalls die geforderte Unterschreitung von 1 % nicht erreichten.

### 3.3 Ergebnisse der Messungen am AutoCyte-Quick-DNA

#### 3.3.1 Modalwerte jeder Zellfraktion

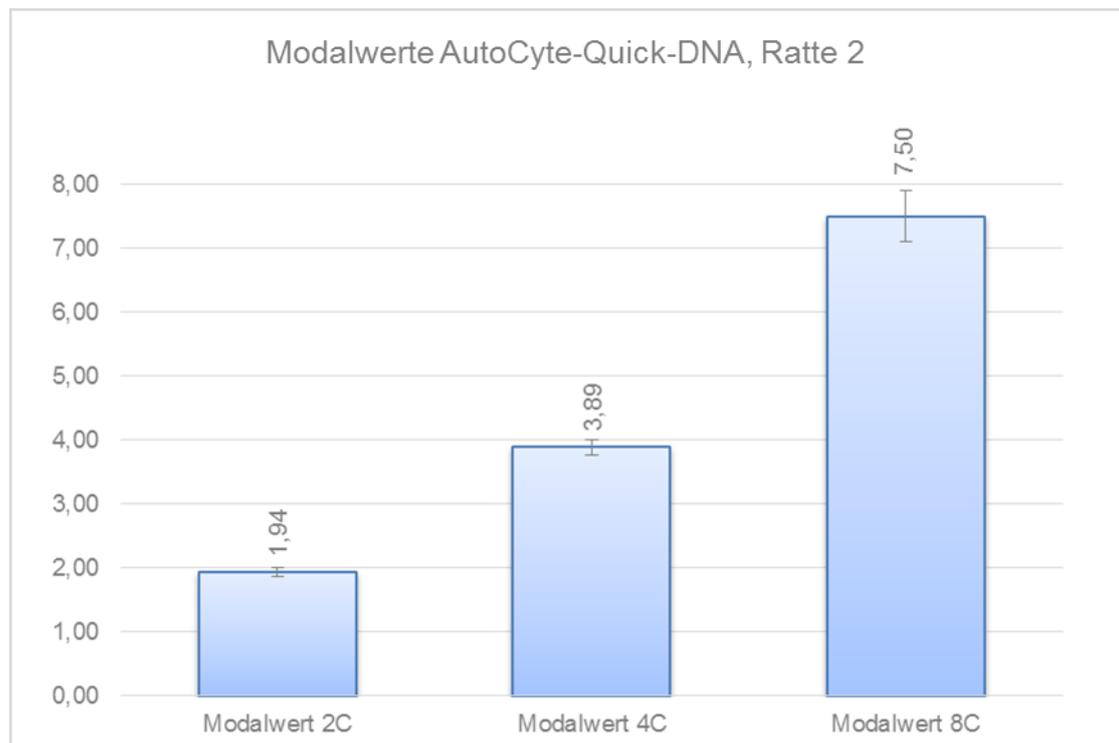
Für die Messungen an der AutoCyte-Quick-DNA-Workstation wurde von einer Ratte eine Messreihe mit wiederum vier Objektträgern und jeweils vier Abtupfpräparaten (ein 4x4 *Imprint*) durchgeführt. Die Modalwerte konnten für die 2c-Zellen im automatisch erzeugten Report abgelesen werden. Um die Modalwerte für die 4c und 8c-Zellen zu erzeugen, mussten diese Zellfraktionen der einzelnen Messungen manuell als Analysezellen deklariert und ein Report erzeugt werden, in welchem der ermittelte Wert ausgegeben wurde. Bei diesem Wert ist eine möglichst geringe Abweichung vom Sollwert (2c, 4c, 8c) wünschenswert. Zu Übersicht werden die gemessenen Werte in Tabelle 13 dargestellt. Dort werden die Modalwerte der am AutoCyte-Quick-DNA gemessenen Zellkerne für jede Zellfraktion (2c, 4c, 8c und Lymphozyten) aufgeführt. In Rot wurden die Werte markiert, welche mehr als 5 % vom Sollwert (2c, 4c, 8c) abwichen. Dieser Wert wurde willkürlich festgelegt.

## Ergebnisse

| Messparameter |            | 2c   | 4c   | 8c   | Lymphozyten |
|---------------|------------|------|------|------|-------------|
|               | Messreihe  | 1    | 1    | 1    | 1           |
| 1             | Modalwerte | 1,91 | 3,86 | 7,46 | 1,05        |
|               |            | 1,88 | 3,92 | 7,29 | 1,06        |
|               |            | 1,91 | 3,69 | 7,07 | 1,05        |
|               |            | 1,84 | 3,68 | 7,46 | 1,09        |
|               |            | 1,97 | 4,08 | 8,14 | 1,02        |
|               |            | 1,9  | 3,76 | 6,94 | 1,05        |
|               |            | 1,98 | 3,94 | 7,67 | 1,01        |
|               |            | 1,97 | 3,75 | 7,27 | 1,02        |
|               |            | 1,97 | 3,91 | 7,72 | 1,02        |
|               |            | 2,02 | 4,03 | 7,56 | 0,99        |
|               |            | 1,91 | 3,88 | 6,86 | 1,05        |
|               |            | 1,96 | 3,91 | 7,84 | 1,02        |
|               |            | 2,04 | 4,01 | 7,66 | 0,98        |
|               |            | 1,76 | 3,96 | 8,21 | 1,14        |
|               |            | 2,03 | 3,98 | 7,76 | 0,99        |
| 1,97          | 3,93       | 7,11 | 1,02 |      |             |

**Tabelle 13: Modalwerte am AutoCyte-Quick-DNA**

Abbildung 25 zeigt die Mittelwerte der Modalwerte der einzelnen Zellfraktionen (2c, 4c, 8c), gemessen am AutoCyte-Quick-DNA für Ratte 2.



**Abbildung 25: Mittelwerte der Modalwerte jeder Zellfraktion inklusive Standardabweichungen für Ratte 2, gemessen am AutoCyte-Quick-DNA**

Messwerte pro Objektträgermessreihe bestehend aus 4 Objektträger mit jeweils 4 Abtupfpräparaten (= 16 Messungen pro Objektträgermessreihe). Es wurde eine Objektträgermessreihe (blau) durchgeführt. Die ermittelten Variationskoeffizienten CV jeder Zellfraktion sind pro Messreihe in % angegeben.

## Ergebnisse

Wie aus der Abbildung 25 zu entnehmen ist, liegt der Mittelwert aller drei Zellfraktionen sehr nah an den Sollwerten von 2c, 4c und 8c. Jedoch konnten bei den 2c-Zellen Ausreißer (Modalwerte-Werte, welche mehr als 5 % vom Sollwert abweichen) mit 1,88, 1,84 und 1,76, bei den 4c-Zellen mit 3,69, 3,68, 3,76, 3,75 und bei den 8c-Zellen mit 7,46, 7,29, 7,07, 7,46, 6,94, 7,27, 7,56, 6,86 und 7,11 ermittelt werden.

### 3.3.2 CV jeder Zellfraktion und der Referenzzellen

Die CV-Werte sämtlicher Zellfraktion konnten sowohl für die Referenzzellen (Lymphozyten) als auch für die 2c-Zellen im automatisch ermittelten Report abgelesen werden. Um diesen Wert für die 4c-Zellen und 8c-Zellen zu ermitteln, wurden jeweils die zu untersuchenden Zellen als Analysezellen deklariert und erneut ein Report erzeugt, aus dem die Werte abgelesen werden konnten. Da bei den IOD-Werten der Zellfraktionen eine möglichst geringe Streuung um die Sollwerte von 2c, 4c und 8c erforderlich ist, sollten die so erhaltenen CV-Werte möglichst klein sein. Zur Übersicht werden die ermittelten CV-Werte in Tabelle 14 dargestellt. In Abbildung 26 sind die Werte der Messungen am AutoCyte-Quick-DNA grafisch dargestellt.

| Messparameter |                       | 2c   | 4c   | 8c   | Lymphozyten |
|---------------|-----------------------|------|------|------|-------------|
|               | Messreihe             | 1    | 1    | 1    | 1           |
| 2             | CV jeder Zellfraktion | 7,06 | 9,86 | 4,24 | 2,93        |
|               |                       | 8,49 | 8,65 | 3,38 | 3,15        |
|               |                       | 8,95 | 6,92 | 5,71 | 2,06        |
|               |                       | 9,99 | 8,44 | 4,58 | 2,3         |
|               |                       | 7,84 | 4,4  | 8,53 | 2,71        |
|               |                       | 7,83 | 6,28 | 4,34 | 2,69        |
|               |                       | 4,67 | 8,94 | 4,74 | 2,75        |
|               |                       | 5,64 | 6,07 | 6,87 | 2,1         |
|               |                       | 4,52 | 6,21 | 0,97 | 2,57        |
|               |                       | 5,44 | 5,57 | 0,33 | 2,99        |
|               |                       | 5,08 | 4,09 | 5,64 | 2,85        |
|               |                       | 5,97 | 4,44 | 5,17 | 2,98        |
|               |                       | 4,96 | 7,36 | 2,58 | 2,53        |
|               |                       | 7,99 | 6,18 | 2,02 | 2,8         |
|               |                       | 5,81 | 9,51 | 2,22 | 2,67        |
|               |                       | 4,67 | 4,19 | 5,29 | 3,21        |

Tabelle 14: CVs der Zellfraktionen am AutoCyte-Quick-DNA

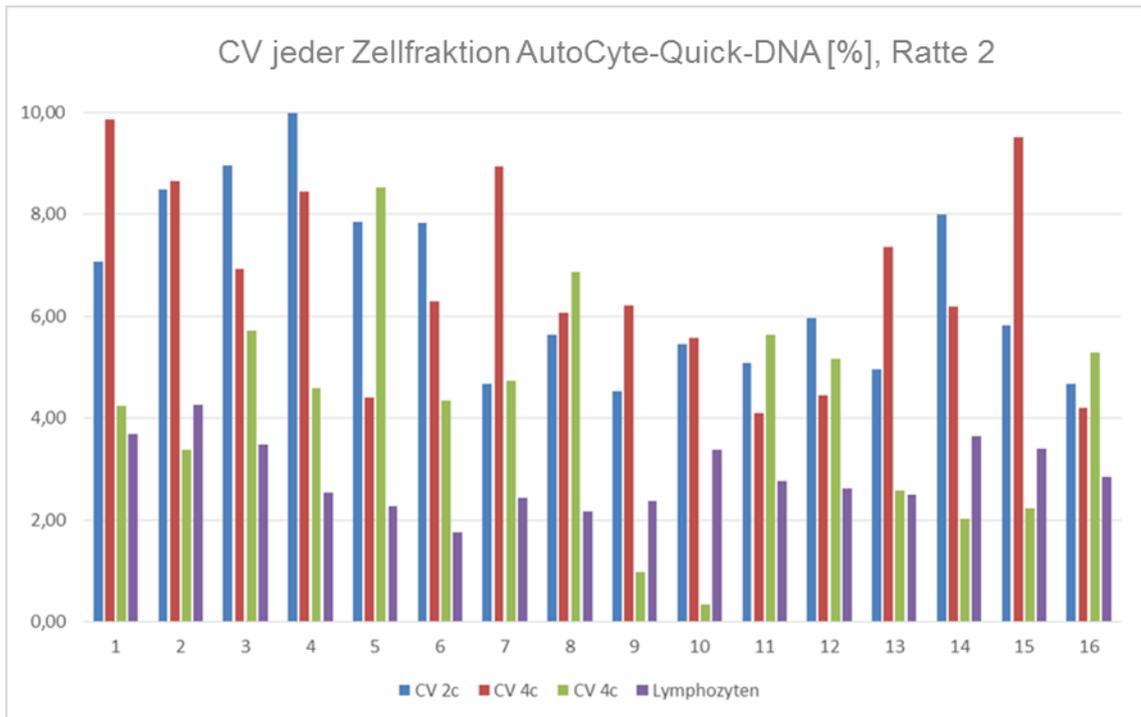


Abbildung 26: CVs jeder Zellfraktion am Auto-Cyte-Quick-DNA.

Wie in Abbildung 26 zu sehen, zeigen besonders die CV-Werte der 2c- und 4c-Zellen Abweichungen vom Soll-Wert. Nur eine Minderheit von 18 von 48 Fällen (Referenzzellen ausgenommen) liefert Werte unter 5 %. Die Ergebnisse für die Referenzzellen weisen die geringste Streuung auf und liegen alle unter einem CV-Wert von 5 %.

### 3.3.3 CV der IOD von jedem 2c-, 4c- und 8c-Peak und der Referenzzellen in jedem 4x4 Imprint

Der Variationskoeffizient wurde in diesem Schritt pro Zellfraktion ermittelt, indem die Standardabweichung durch den Mittelwert aller CV-Werte einer Zellfraktion geteilt wurde. Von der ESACP wird eine Unterschreitung dieser CV-Werte von 5 % gefordert. In Abbildung 27 sind die CV-Werte der IOD von jedem *Peak* (2c, 4c, 8c) und der Referenzzellen dargestellt.

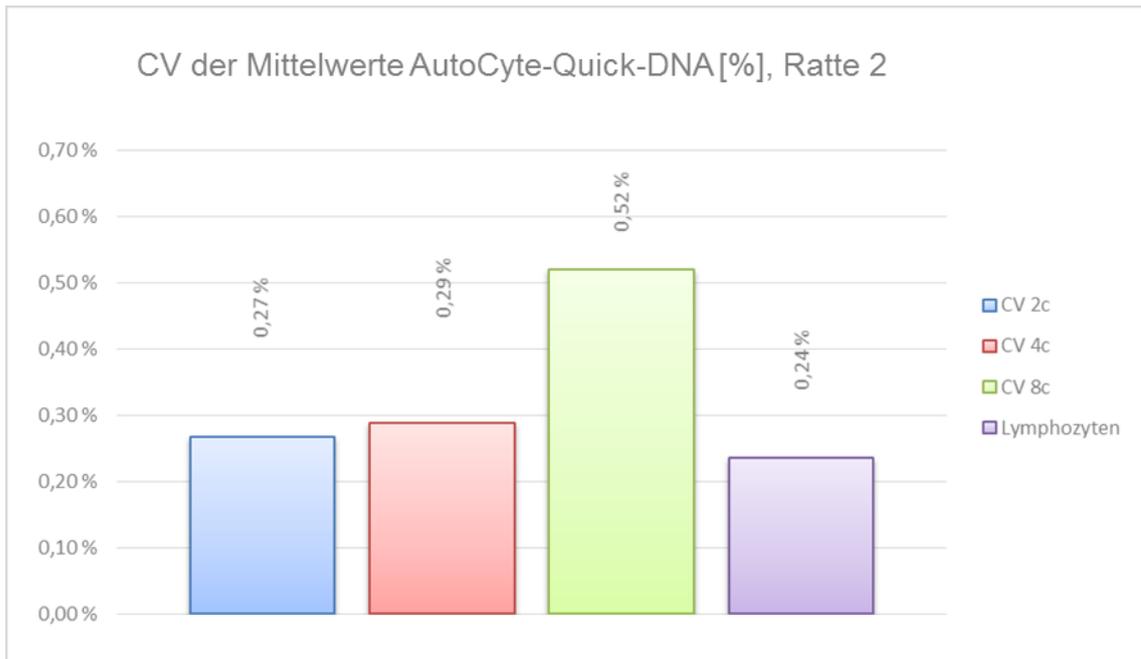


Abbildung 27: CV-Werte der IODs von *Peaks* jeder Zellfraktion am AutoCyte-Quick-DNA.

Wie in der Abbildung 27 gut zu erkennen ist, wurde die gewünschte Unterschreitung von 5 % bei den untersuchten Präparaten bei sämtlichen Zellfraktionen eingehalten. Der höchste Wert zeigt sich bei der Fraktion der 8c-Zellen mit 0,52 %.

### 3.3.4 Korrelationskoeffizient der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern-Peak (2c, 4c und 8c)

Der Korrelationskoeffizient der Zellkernfläche gegenüber der IOD konnte für die Lymphozyten in dem automatisch erstellten Report oder am Monitor bei geöffneter Messung abgelesen werden. Um die CC-Werte für die 2c-, 4c-, und 8c-Zellen zu erzeugen, mussten diese Zellfraktionen jeweils als Referenzzellen deklariert werden. So konnte der Wert in der jeweiligen Messung am Monitor abgelesen werden. Von der ESACP wird eine Unterschreitung von 0,4 gefordert. In Abbildung 28 werden die Korrelationskoeffizienten der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern-Peak dargestellt.

Ergebnisse

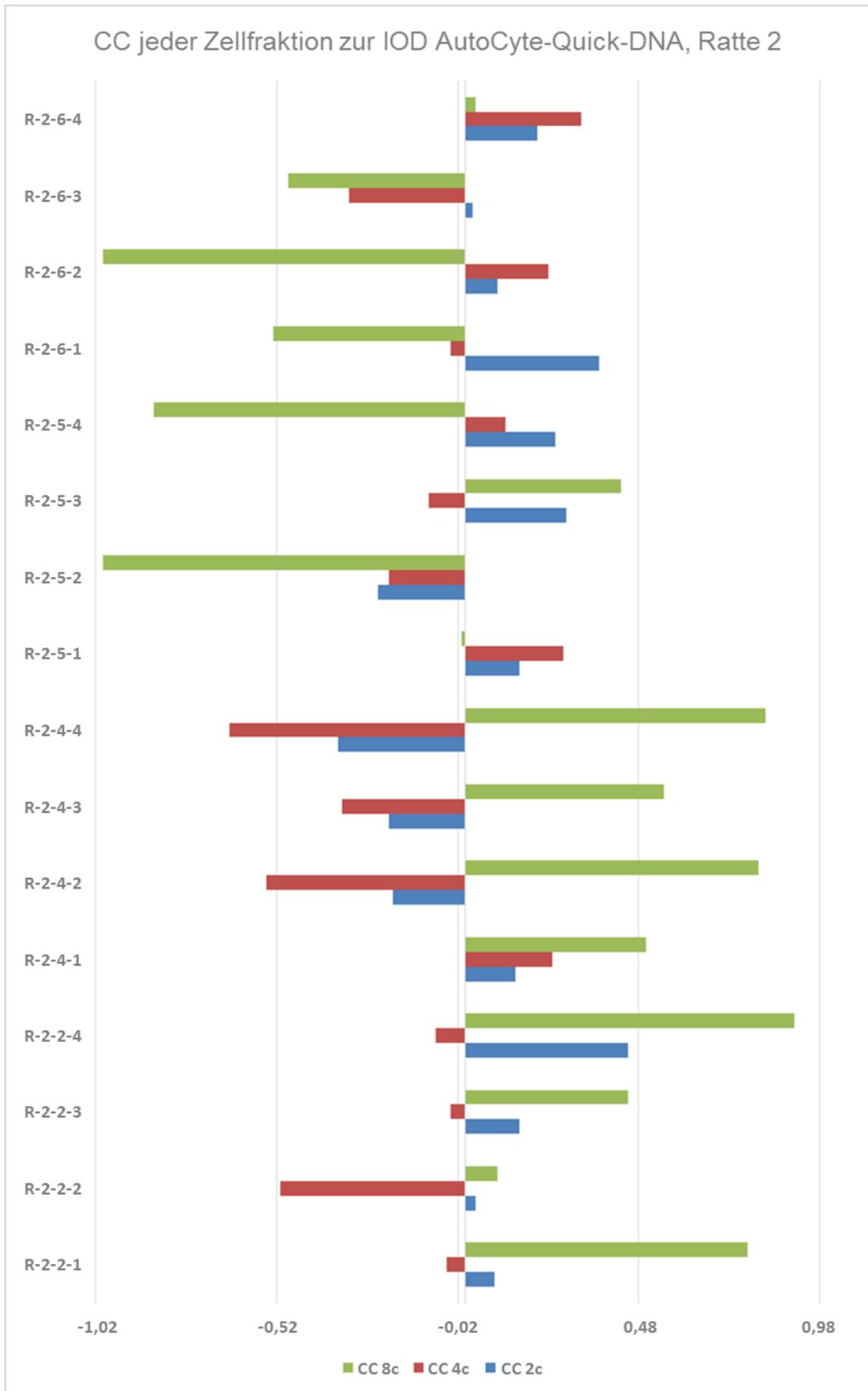


Abbildung 28: Korrelationskoeffizienten Kernfläche vs. IOD der Zellfraktionen, am AutoCyte-Quick-DNA.

## Ergebnisse

Wie Abbildung 28 zeigt, überschreiten insbesondere die CC-Werte der 8c-Zellen den geforderten Wert von 0,4. Insgesamt kann nur bei 19 % der Messwerte dieser Zellfraktion der geforderte Wert eingehalten werden. Bei der Zellkernfraktion der 4c-Zellen sind es mit 81,5 % deutlich mehr. Bei der Zellkernfraktion der 2c-Zellen wurde nur ein Ausreißer gemessen, sodass 94 % der Messwerte unterhalb des geforderten Wertes liegen.

### 3.3.5 CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp (2c-Hepatozyten, 4c-Hepatozyten, 8c-Hepatozyten) innerhalb eines 4x4 Imprints

Der CV-Wert der IOD-Mittelwerte für die Zelltypen 2c-Hepatozyten, 4c-Hepatozyten, 8c-Hepatozyten wurde bestimmt, indem alle erhaltenen Modalwerte jeder Zellfraktion addiert und daraus Standardabweichung und Mittelwert bestimmt wurden. Aus diesen Werten wurde dann der CV berechnet. Von der ESACP wird eine Unterschreitung der Streuung von 3 % gefordert.

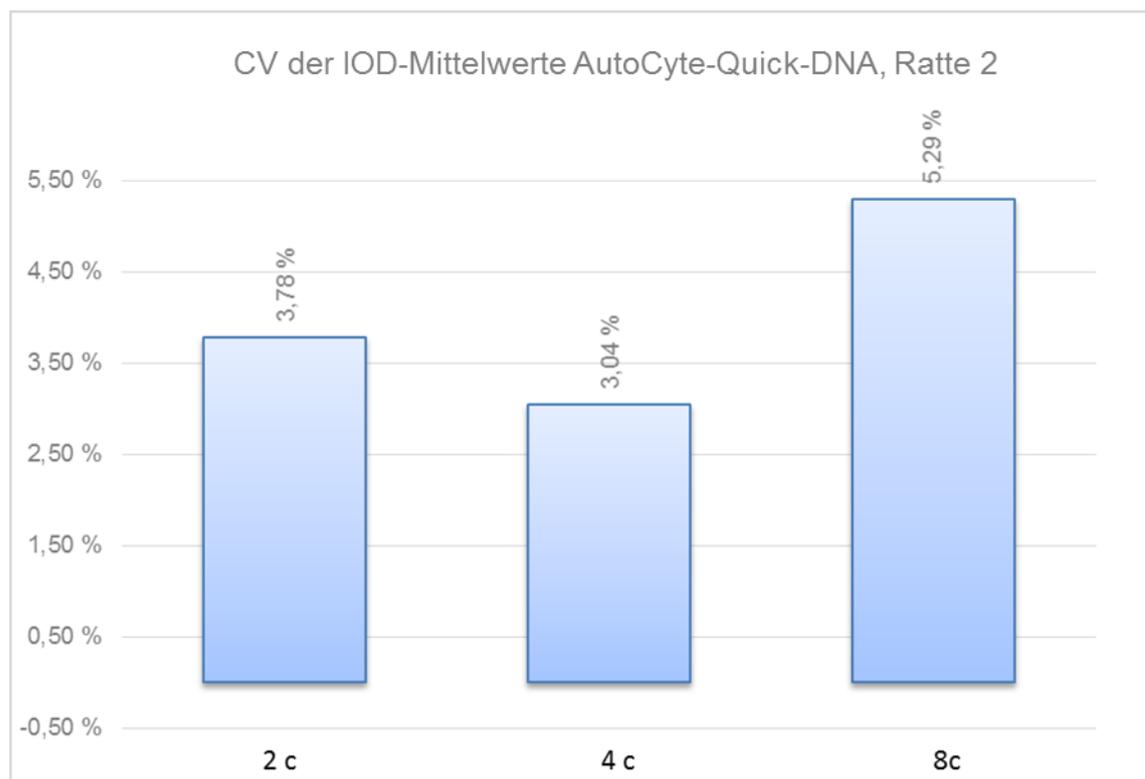


Abbildung 29: CV-Werte der IOD-Mittelwerte für Zelltypen 2c, 4c, 8c, am AutoCyte-Quick-DNA.

Wie in der Abbildung 29 dargestellt, konnte bei den durchgeführten Messungen bei keiner Zellfraktion der Wert von 3 % unterschritten werden. Insbesondere die Zellfraktion der 8c-Zellen überschreitet diesen Wert deutlich.

### 3.3.6 CV der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4 *Imprint*

Der CV-Wert der Verhältnisse der *Peak*-Mittelwerte von Referenz- zu Analysezellen wurde ermittelt, indem zunächst für jede Messung das Verhältnis der Modalwerte der Referenzzellen zu den Analysezellen berechnet wurde. Anschließend wurden diese Werte addiert und der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Hieraus wurde der CV berechnet. Von der ESACP wurde eine Unterschreitung dieser Streuung von 2 % gefordert.

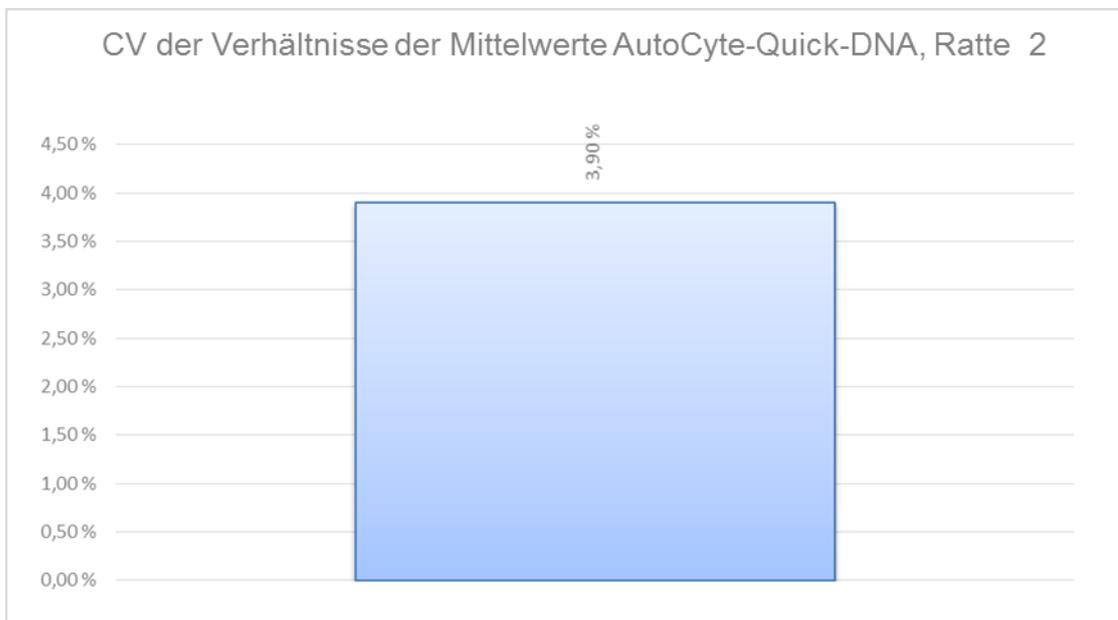
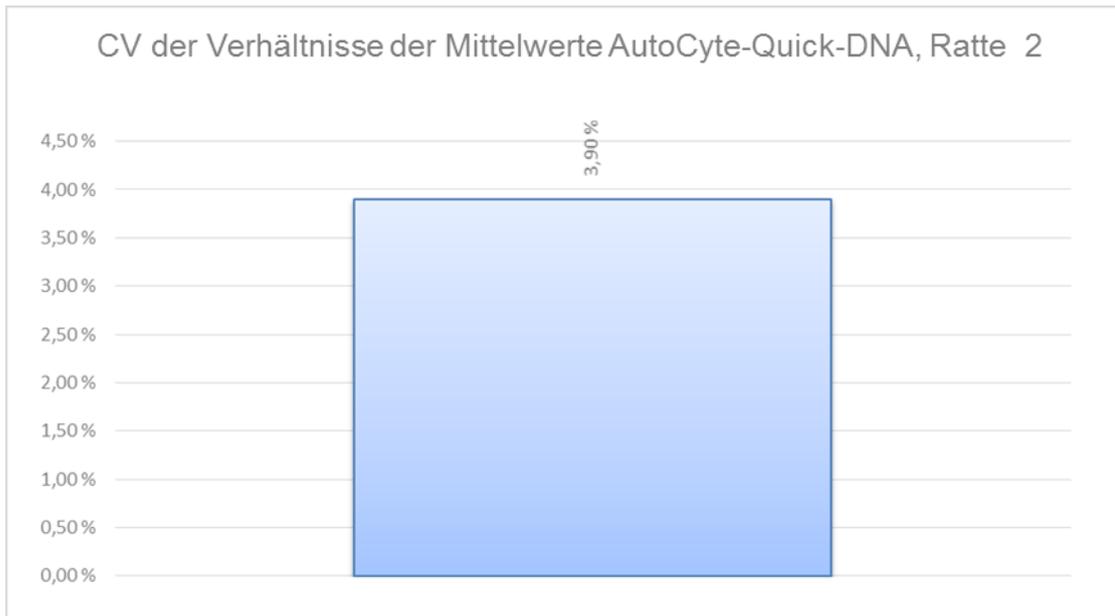


Abbildung 30: CV-Werte der Mittelwerte der *Peaks* von Referenzzellen zu Analysezellen, am AutoCyte-Quick-DNA.

In der Abbildung 30 wird deutlich, dass der ermittelte CV-Wert die geforderten 2 % deutlich übersteigt.

### 3.3.7 CV der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von tetraploiden zu diploiden Zellkernen von jedem 4x4 *Imprint*

Der CV-Wert der Verhältnisse der *Peak*-Mittelwerte von tetraploiden zu diploiden Zellkernen wurde gebildet, indem die Quotienten der Modalwerte aller 4c- und 2c-Hepatozyten-Populationen addiert wurden. Daraus wurden der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Hieraus wiederum wurde der CV-Wert berechnet. Von der ESACP wird eine Unterschreitung dieses CV-Wertes von 1 % gefordert.



**Abbildung 31: CV-Werte der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von tetraploiden zu diploiden Zellen, am AutoCyte-Quick-DNA.**

Abbildung 31 zeigt, dass der ermittelte CV-Wert deutlich über 1 % liegt und somit der Forderung der ESACP nicht Stand hält.

#### **3.4 Direkter Vergleich der Messergebnisse gemessen mit dem MotiCyte-DNA und dem AutoCyte-Quick-DNA**

Um die Messgenauigkeit der beiden Messsysteme, des MotiCyte-DNA und des AutoCyte-Quick-DNA miteinander zu vergleichen, wurde die erste Messreihe der Ratte 2 (ein 4x4 *Imprint*) mit beiden Systemen vermessen. Zur besseren Übersicht wurden die Messwerte in den folgenden Tabellen (Tabelle 15, Tabelle 16, Tabelle 17, Tabelle 18, Tabelle 19) gegenübergestellt.

Ergebnisse

|                        |            | MotiCyte-DNA |      |      |             | AutoCyte-Quick-DNA |      |      |             |
|------------------------|------------|--------------|------|------|-------------|--------------------|------|------|-------------|
| Messparameter (ESACP): |            | 2c           | 4c   | 8c   | Lymphozyten | 2c                 | 4c   | 8c   | Lymphozyten |
| 1:                     | Modalwerte | 1,99         | 4,03 | 8,00 | -           | 1,91               | 3,86 | 7,46 | -           |
|                        |            | 1,93         | 3,90 | 7,95 | -           | 1,88               | 3,92 | 7,29 | -           |
|                        |            | 1,97         | 4,01 | 8,00 | -           | 1,91               | 3,69 | 7,07 | -           |
|                        |            | 1,99         | 4,02 | 7,97 | -           | 1,84               | 3,68 | 7,46 | -           |
|                        |            | 2,01         | 4,06 | 7,97 | -           | 1,97               | 4,08 | 8,14 | -           |
|                        |            | 1,88         | 3,91 | 7,75 | -           | 1,90               | 3,76 | 6,94 | -           |
|                        |            | 2,08         | 4,14 | 8,02 | -           | 1,98               | 3,94 | 7,67 | -           |
|                        |            | 2,04         | 3,97 | 7,72 | -           | 1,97               | 3,75 | 7,27 | -           |
|                        |            | 2,00         | 4,05 | 7,90 | -           | 1,97               | 3,91 | 7,72 | -           |
|                        |            | 2,06         | 4,20 | 8,25 | -           | 2,02               | 4,03 | 7,56 | -           |
|                        |            | 1,96         | 3,90 | 7,66 | -           | 1,91               | 3,88 | 6,86 | -           |
|                        |            | 2,00         | 3,97 | 7,94 | -           | 1,96               | 3,91 | 7,84 | -           |
|                        |            | 2,04         | 4,16 | 8,12 | -           | 2,04               | 4,01 | 7,66 | -           |
|                        |            | 2,02         | 4,12 | 8,24 | -           | 1,76               | 3,96 | 8,21 | -           |
|                        |            | 1,98         | 4,11 | 8,55 | -           | 2,03               | 3,98 | 7,76 | -           |
|                        |            | 2,03         | 4,10 | 8,14 | -           | 1,97               | 3,93 | 7,11 | -           |
|                        |            | MW           | 2,00 | 4,04 | 8,01        |                    | 1,94 | 3,89 | 7,50        |
|                        | STABW      | 0,05         | 0,09 | 0,22 |             | 0,07               | 0,12 | 0,40 |             |

Tabelle 15: Messergebnisse im Vergleich MotiCyte-DNA und AutoCyte-Quick-DNA, Messparameter 1

Ergebnisse

| Messparameter:Schwellenwerte (ESACP) |                   | MotiCyte-DNA |      |      |             | AutoCyte-Quick-DNA |      |      |             |
|--------------------------------------|-------------------|--------------|------|------|-------------|--------------------|------|------|-------------|
|                                      |                   | 2c           | 4c   | 8c   | Lymphozyten | 2c                 | 4c   | 8c   | Lymphozyten |
| 2: <5 %                              | CV von jedem Peak | 5,32         | 2,44 | 4,19 | 3,08        | 7,06               | 9,86 | 4,24 | 3,69        |
|                                      |                   | 5,00         | 3,49 | 4,42 | 2,45        | 8,49               | 8,65 | 3,38 | 4,25        |
|                                      |                   | 4,65         | 3,73 | 5,46 | 3,35        | 8,95               | 6,92 | 5,71 | 3,47        |
|                                      |                   | 4,49         | 3,49 | 5,30 | 2,85        | 9,99               | 8,44 | 4,58 | 2,53        |
|                                      |                   | 3,77         | 2,99 | 3,45 | 2,31        | 7,84               | 4,40 | 8,53 | 2,27        |
|                                      |                   | 4,38         | 3,75 | 2,99 | 2,87        | 7,83               | 6,28 | 4,34 | 1,75        |
|                                      |                   | 3,15         | 2,51 | 4,67 | 2,85        | 4,67               | 8,94 | 4,74 | 2,44        |
|                                      |                   | 4,13         | 3,21 | 5,60 | 2,97        | 5,64               | 6,07 | 6,87 | 2,17        |
|                                      |                   | 3,29         | 3,45 | 3,81 | 2,45        | 4,52               | 6,21 | 0,97 | 2,37        |
|                                      |                   | 4,51         | 3,32 | 4,10 | 3,04        | 5,44               | 5,57 | 0,33 | 3,38        |
|                                      |                   | 4,62         | 2,35 | 3,87 | 2,74        | 5,08               | 4,09 | 5,64 | 2,75        |
|                                      |                   | 3,85         | 2,67 | 3,44 | 2,57        | 5,97               | 4,44 | 5,17 | 2,62        |
|                                      |                   | 3,86         | 2,79 | 4,92 | 2,52        | 4,96               | 7,36 | 2,58 | 2,49        |
|                                      |                   | 4,66         | 3,07 | 5,60 | 3,12        | 7,99               | 6,18 | 2,02 | 3,64        |
|                                      |                   | 5,38         | 4,22 | 6,71 | 2,40        | 5,81               | 9,51 | 2,22 | 3,40        |
|                                      |                   | 3,67         | 4,01 | 5,24 | 3,01        | 4,67               | 4,19 | 5,29 | 2,84        |
|                                      |                   | MW           | 4,30 | 3,22 | 4,61        | 2,79               | 6,56 | 6,69 | 4,16        |
|                                      | STABW             | 0,66         | 0,57 | 1,00 | 0,31        | 1,75               | 1,93 | 2,16 | 0,68        |

Tabelle 16: Messergebnisse im Vergleich MotiCyte-DNA und AutoCyte-Quick-DNA, Messparameter 2

Ergebnisse

| Messparameter: Schwellenwerte (ESACP) |   | MotiCyte-DNA |       |       |             | AutoCyte-Quick-DNA |       |       |             |
|---------------------------------------|---|--------------|-------|-------|-------------|--------------------|-------|-------|-------------|
|                                       |   | 2c           | 4c    | 8c    | Lymphozyten | 2c                 | 4c    | 8c    | Lymphozyten |
| 3: <5 %                               | CV der IOD von jedem 2c-, 4c- und 8c-Peak in jedem 4x4 Imprint  | 0,15         | 0,18  | 0,22  | 0,11        | 0,27               | 0,29  | 0,52  | 0,24        |
| 4: <0,4                               | Korrelationskoeffizient (CC) der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern-Peak (2c, 4c und 8c) | -0,05        | -0,13 | -0,22 | -0,06       | 0,08               | -0,05 | 0,78  | -0,08       |
|                                       |   | -0,15        | -0,28 | -0,33 | -0,04       | 0,03               | -0,51 | 0,09  | -0,03       |
|                                       |   | -0,05        | 0,01  | -0,05 | -0,01       | 0,15               | -0,04 | 0,45  | 0,13        |
|                                       |   | -0,04        | -0,06 | -0,03 | 0,03        | 0,45               | -0,08 | 0,91  | 0,20        |
|                                       |   | -0,07        | -0,23 | -0,31 | -0,02       | 0,14               | 0,24  | 0,50  | 0,07        |
|                                       |   | -0,12        | -0,05 | -0,82 | 0,00        | -0,20              | -0,55 | 0,81  | -0,31       |
|                                       |   | -0,14        | 0,00  | -0,26 | -0,01       | -0,21              | -0,34 | 0,55  | 0,21        |
|                                       |   | 0,00         | -0,02 | -0,13 | 0,03        | -0,35              | -0,65 | 0,83  | 0,35        |
|                                       |   | -0,08        | -0,06 | -0,50 | -0,06       | 0,15               | 0,27  | -0,01 | -0,08       |
|                                       |   | -0,09        | -0,12 | -0,39 | 0,02        | -0,24              | -0,21 | -1,00 | 0,18        |
|                                       |   | 0,02         | -0,80 | -0,26 | -0,10       | 0,28               | -0,10 | 0,43  | -0,04       |
|                                       |   | -0,16        | -0,06 | -0,06 | 0,03        | 0,25               | 0,11  | -0,86 | -0,05       |
|                                       |   | -0,05        | -0,03 | -0,02 | -0,02       | 0,37               | -0,04 | -0,53 | 0,28        |
|                                       |   | 0,01         | -0,06 | -0,31 | 0,05        | 0,09               | 0,23  | -1,00 | -0,05       |
|                                       |   | 0,00         | -0,02 | 0,06  | -0,05       | 0,02               | -0,32 | -0,49 | -0,07       |
|                                       | 0,03  | -0,06        | -0,24 | -0,02 | 0,20        | 0,32               | 0,03  | 0,10  |             |
| MW                                    |   | -0,06        | -0,12 | -0,24 | -0,01       | 0,08               | -0,11 | 0,09  | 0,05        |
| STABW                                 |   | 0,06         | 0,19  | 0,21  | 0,04        | 0,22               | 0,29  | 0,65  | 0,16        |

Tabelle 17: Messergebnisse im Vergleich MotiCyte-DNA und AutoCyte-Quick-DNA, Messparameter 3 und 4

Ergebnisse

| Messparameter:Schwellenwerte (ESACP) |  | MotiCyte-DNA |      |      |             | AutoCyte-Quick-DNA |      |      |             |
|--------------------------------------|--|--------------|------|------|-------------|--------------------|------|------|-------------|
|                                      |  | 2c           | 4c   | 8c   | Lymphozyten | 2c                 | 4c   | 8c   | Lymphozyten |
| 5: <3 %                              | CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp (2c-Hepatozyten, 4c-Hepatozyten, 8c-Hepatozyten) zwischen allen 4x4 <i>Imprints</i>     | 2,48         | 2,33 | 2,75 | -           | 3,78               | 3,04 | 5,29 | -           |
| 6: <2 %                              | CV der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4 <i>Imprint</i> | 2,53         | -    | -    | -           | 3,90               | -    | -    | -           |
|                                      | MW   | 1,00         |      |      |             | 1,03               |      |      |             |
|                                      | STABW  | 0,03         |      |      |             | 0,04               |      |      |             |

Tabelle 18: Messergebnisse im Vergleich MotiCyte-DNA und AutoCyte-Quick-DNA, Messparameter 5 und 6

Ergebnisse

|                                      |  | MotiCyte-DNA |      |    |             | AutoCyte-Quick-DNA |      |    |             |
|--------------------------------------|--|--------------|------|----|-------------|--------------------|------|----|-------------|
| Messparameter:Schwellenwerte (ESACP) |  | 2c           | 4c   | 8c | Lymphozyten | 2c                 | 4c   | 8c | Lymphozyten |
| 7: <1 %                              | CV der Verhältnisse der Mittelwerte der <i>Peaks</i> von tetraploiden zu diploiden Zellkernen von jedem 4x4 <i>Imprint</i> | -            | 1,64 | -  | -           | -                  | 3,90 | -  | -           |
|                                      | MW   |              | 2,02 |    |             |                    | 2,01 |    |             |
|                                      | STABW  |              | 0,03 |    |             |                    | 0,08 |    |             |

Tabelle 19: Messergebnisse im Vergleich MotiCyte-DNA und AutoCyte-Quick-DNA, Messparameter 7

## Ergebnisse

In Tabelle 15 werden die Modalwerte beider Messsysteme vergleichend dargestellt. Diese Werte sollten möglichst nah an 2, 4 und 8 liegen. Einen vorgeschriebenen Schwellenwert der ESACP gibt es nicht. Zur besseren Übersicht wurden von der Verfasserin alle Werte farblich markiert, welche mehr als 5 % vom Sollwert abweichen. Hier wird ersichtlich, dass das MotiCyte-DNA präzisere Werte mit Mittelwerten bei 2,00, 4,04 und 8,01 im Vergleich zu 1,94, 3,89 und 7,5 liefert. Auch die Standardabweichungen sind beim MotiCyte-DNA geringer. In den Einzelmessungen kam es beim AutoCyte-Quick-DNA mit 16 Abweichungen bei 48 Modalwerten (33,3 %) zu einer höheren Anzahl von Abweichungen (>5 %) im Vergleich zum MotiCyte-DNA mit 2 Abweichungen bei 48 Modalwerten (4,1 %).

Zur Überprüfung der Einhaltung der Vorgaben der ESACP für jede Zellkernfraktion wurde deren CV betrachtet. Für diesen wurde als Mindeststandard eine Unterschreitung von 5 % gefordert [37],[38]. Diese Werte sind vergleichend für beide Messsysteme in Tabelle 16 dargestellt. Beim AutoCyte-Quick-DNA kam zu 30 Abweichungen von 64 CV-Werten, d.h. ca. 47 % der Messergebnisse lagen außerhalb des geforderten Mindeststandards von 5 %. Beim MotiCyte-DNA hingegen kam es nur zu 8 Abweichungen von 64 CV-Werten. Dies bedeutet, dass 12,5 % der CV-Werte außerhalb des Grenzwertes lagen. Auch die Mittelwerte und die Standardabweichungen der CV-Werte für jeden Peak sind beim MotiCyte-DNA deutlich geringer und überschreiten den Grenzwert von 5 % nicht. Beim AutoCyte-Quick-DNA hingegen überschreitet sowohl der Mittelwert der CV-Werte der 2c-Zellkerne als auch der 4c-Zellkerne die 5 %.

Zum Vergleich der Variationskoeffizienten (CV) der IOD von jedem 2c-, 4c- und 8c-Peak und der Referenzzellen in jedem 4x4 *Imprint* (bezogen auf eine Messreihe) beider Messsysteme, werden diese in Tabelle 17 dargestellt. Alle Werte der ersten Messreihe der Ratte 2 bei beiden Messgeräten unterschritten den geforderten Wert von 5 %, beim AutoCyte-Quick-DNA mussten jedoch deutlich höhere CV-Werte verzeichnet werden, d.h. die mittlere Streuung der gemessenen IOD-Werte war größer. Dies spiegelte sich bereits in den mittleren CV-Werten der einzelnen Zellfraktionen (Messparameter 2) wieder.

Der Korrelationskoeffizient (CC) der Zellkernfläche gegenüber der gemessenen IOD wurde für jede Zellkernfraktion und für die Referenzzellen bestimmt. Die Werte sind in Tabelle 17 dargestellt. Es ergaben sich bei den Werten des MotiCyte-DNA 3 Abweichungen (4,68 %) von 64 Messungen gegenüber 17 Abweichung (26,56 %) von 64 Messungen beim AutoCyte-Quick-DNA. Die Mittelwerte der

## Ergebnisse

Korrelationskoeffizienten liegen bei beiden Geräten unterhalb des geforderten Schwellenwerts von 0,4. Die Standardabweichung der Mittelwerte zeigt beim MotiCyte-DNA geringere Werte. Die besseren Werte des MotiCyte-DNA sind auf die softwareseitig implementierte Korrektur des Streulichtfehlers (*Glare*-Fehlers) zurückzuführen [33].

Bei der Überprüfung der CV-Werte der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp pro 4x4 *Imprint* konnte im direkten Vergleich festgestellt werden, dass sich beim MotiCyte-DNA keine Abweichungen ergaben, wohingegen beim AutoCyte-Quick-DNA alle drei Zellfraktionen oberhalb des Grenzwertes von 3 % lagen (siehe Tabelle 18). Dies spiegelt sich bereits in den Mittelwerten, Standardabweichungen und den Ausreißern der Modalwerte wieder, welche als Berechnungsgrundlage für den CV-Wert dienen.

Der CV-Wert der Verhältnisse der *Peak*-Mittelwerte der Referenzzellen zu den 2c-Zellen sollte unterhalb des Mindeststandards von 2 % sein. Im direkten Vergleich kam es bei beiden Messgeräten zur Überschreitung des geforderten Mindeststandards, jedoch ist der CV des AutoCyte-Quick-DNA mit 3,90 % im Vergleich zu 2,53 % beim MotiCyte-DNA deutlich höher. Die Werte sind in Tabelle 18 dargestellt. Auch der als Berechnungsgrundlage dienende Mittelwert lag beim MotiCyte-DNA näher an dem zu erwartenden Wert von 1. Die Standardabweichung dieses Mittelwertes zeigte ebenfalls beim MotiCyte-DNA kleinere Werte auf.

Der CV-Wert aus dem Verhältnis der Mittelwerte der Modalwerte von 4c-Zellen zu 2c-Zellen sollte unter 1 % liegen. Die berechneten Werte zu diesem Messparameter sind in Tabelle 19 aufgelistet. Im direkten Vergleich zeigte sich bei beiden Messsystemen eine Überschreitung des Grenzwertes, diese war jedoch beim MotiCyte-DNA mit 1,64 % zu 3,90 % beim AutoCyte-Quick-DNA deutlich niedriger. Hier zeigte der als Berechnungsgrundlage dienende Mittelwert beim AutoCyte-Quick-DNA Werte näher an dem zu erwartenden Wert von 2 an. Die Standardabweichung dieses Mittelwertes zeigte allerdings beim MotiCyte-DNA kleinere Werte auf. Der geringere CV-Wert sowie die geringere Standardabweichung des Mittelwertes dieses Messparameters gemessen am MotiCyte-DNA ist auf die softwareseitig implementierte Korrektur des Beugungsfehlers zurückzuführen.[33]

### 3.5 DNA-Histogramme der Messungen am MotiCyte-DNA und AutoCyte-Quick-DNA im Vergleich

Die in diesem Kapitel dargestellten DNA-Histogramme zeigen die *Peak*-Lagen der Zellfraktionen (2c, 4c, 8c) und der Referenzzellen eines Abklatschpräparates.

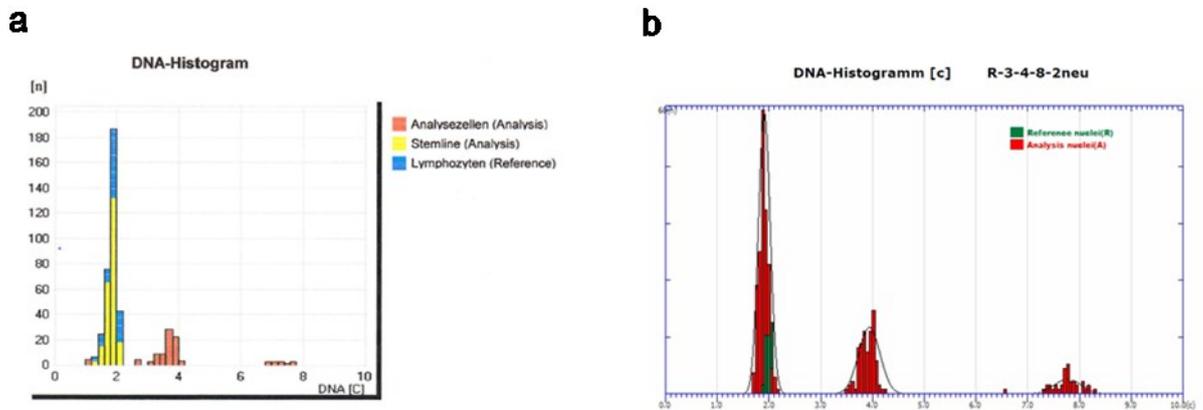


Abbildung 32 a: Histogramm des AutoCyte-Quick-DNA. b: Histogramm des MotiCyte-DNA.

Zu a) Blau dargestellt sind die Referenzzellen, gelb erscheinen die 2c-Zellen und rot die 4c- und 8c-Zellen.

Zu b) Grün sind die Referenzzellen und rot die Analysezellen (2c, 4c, 8c) dargestellt.

Aus den Histogrammen ist zu erkennen, dass die *Peaks* bzw. die Modalwerte der Messungen bei den beiden Workstations leicht verschoben, d.h. die gemessenen Modalwerte nicht identisch sind.

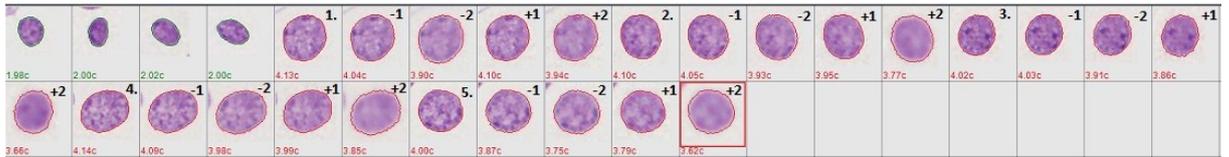
### 3.6 Überprüfung der Fokusabhängigkeit am MotiCyte

Zur Überprüfung der Fokusabhängigkeit wurden jeweils fünf 2c-, 4c- und 8c-Zellen bei optimaler und bei abweichender Fokuseinstellung (1  $\mu\text{m}$  bzw. 2  $\mu\text{m}$ ) gemessen. Dies wird in den folgenden Abbildungen (Abbildung 33, Abbildung 34 und Abbildung 35) dargestellt. Hier ist schon mit dem Auge zu erkennen, dass die defokussierten Zellkerne weniger Struktur aufweisen, heller und unscharf abgegrenzt erscheinen im Vergleich zu den fokussierten Zellkernen.

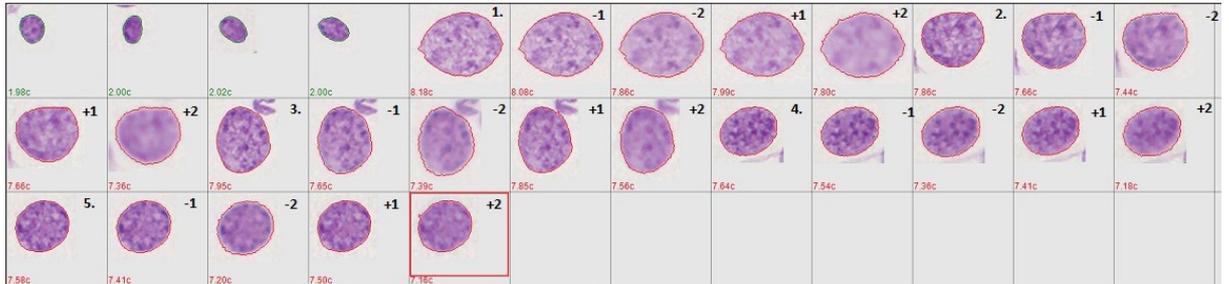


Abbildung 33: Gemessene IODs der 2c-Zellen bei optimaler Fokuseinstellung (1., 2., 3., 4., 5.) und bei Defokussierung (-1, +1, -2, +2.)

## Ergebnisse

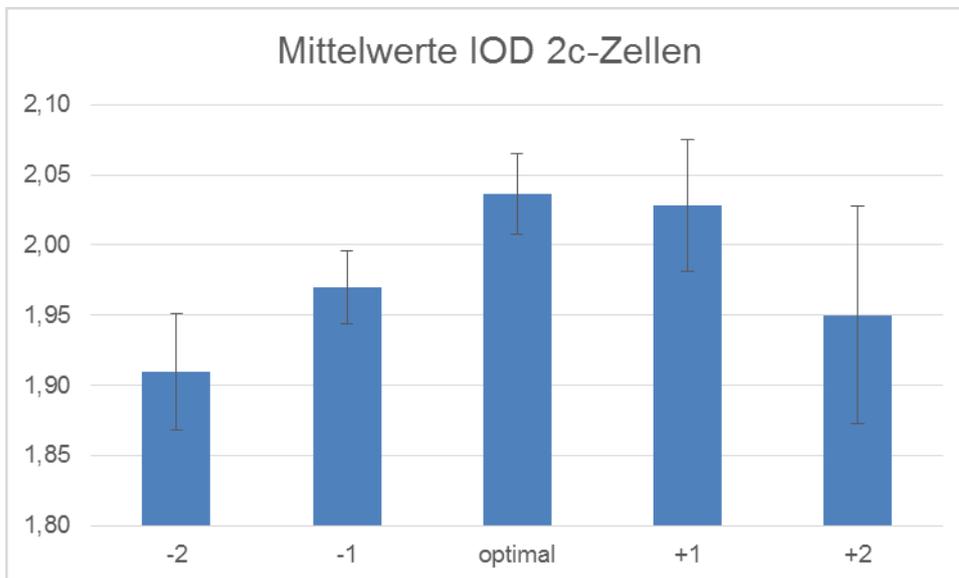


**Abbildung 34: Gemessene IODs der 4c-Zellen bei optimaler Fokuseinstellung (1., 2., 3., 4., 5.) und bei Defokussierung (-1, +1, -2, +2).**

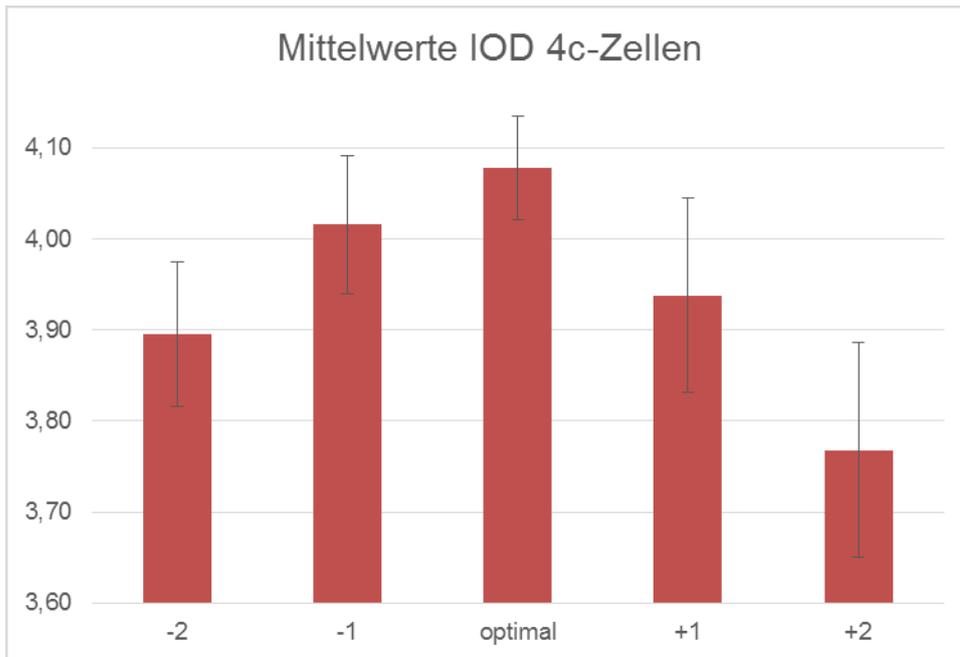


**Abbildung 35: Gemessene IODs der 8c-Zellen bei optimaler Fokuseinstellung (1., 2., 3., 4., 5.) und bei Defokussierung (-1, +1, -2, +2).**

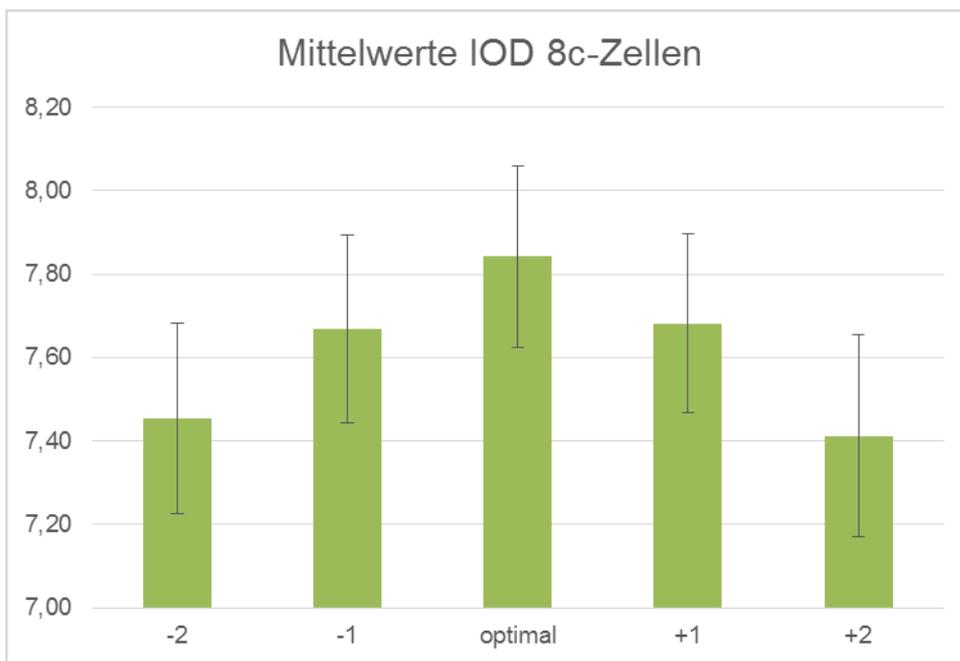
In den unten stehenden Abbildungen (Abbildung 36, Abbildung 37, Abbildung 38) werden die jeweils gemessenen IOD-Werte der 2c-, 4c- und 8c-Zellen bei unterschiedlicher (-1, -2, +1, +2) Fokuseinstellung dargestellt.



**Abbildung 36: Mittelwerte und Standardabweichungen der IODs aller 2c-Zellen bei optimaler Fokuseinstellung und bei -1, -2, +1 und +2, gemessen am MotiCyte-DNA.**



**Abbildung 37: Mittelwerte und Standardabweichungen der IODs aller 4c-Zellen bei optimaler Fokuseinstellung und bei -1, -2, +1 und +2, gemessen am MotiCyte-DNA.**



**Abbildung 38: Mittelwerte und Standardabweichungen der IODs aller 8c-Zellen bei optimaler Fokuseinstellung und bei -1, -2, +1 und +2, gemessen am MotiCyte-DNA.**

Aus den Abbildungen (Abbildung 36, Abbildung 37, Abbildung 38) ist zu erkennen, dass sich bei optimaler Fokuseinstellung der größte Mittelwert aller IOD-Werte ergibt und je größer die Abweichung von der optimalen Fokuseinstellung ist, desto geringer wird der gemessene IOD-Wert. Dies passt wiederum zu der Beobachtung, dass die defokussierten Zellkerne heller erscheinen. Auch die Standardabweichung wird

## Ergebnisse

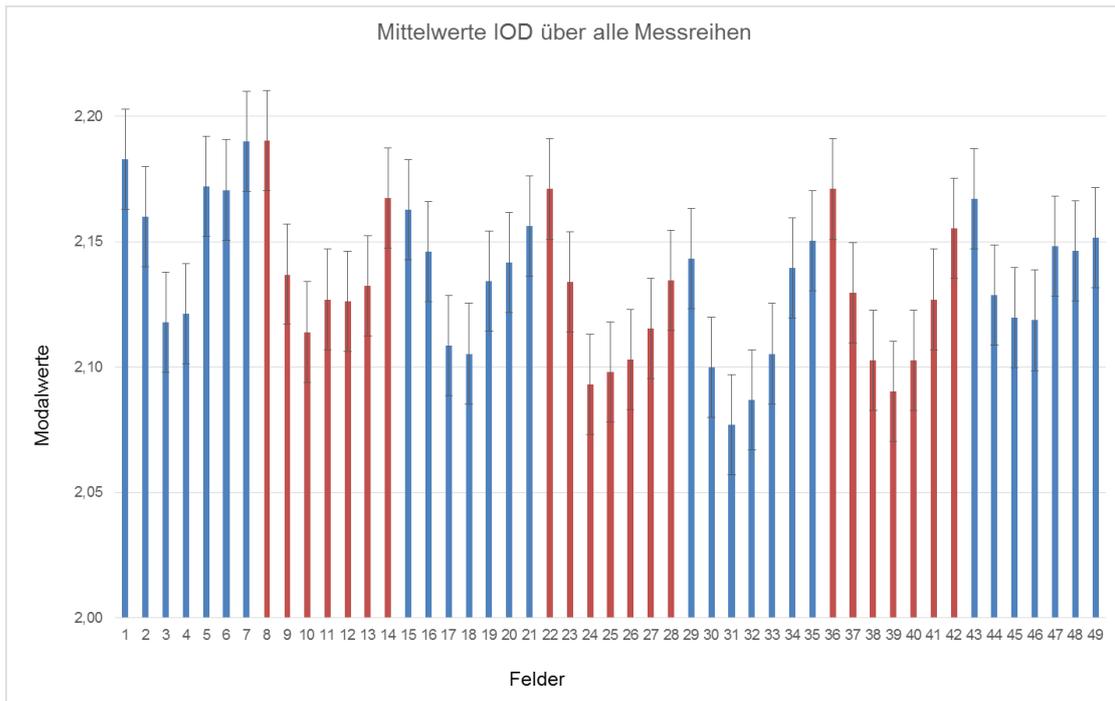
tendenziell größer, je größer die Abweichung von der optimalen Fokuseinstellung ist. Die Werte der Mittelwerte und der Standardabweichung sind der Tabelle 20 zu entnehmen. Prozentual weichen insgesamt die mittleren IOD-Werte der 8c-Zellen am deutlichsten vom Wert bei optimaler Fokuseinstellung ab, dies zeigt sich ebenfalls für die Standardabweichung.

| 2c-Zellen | -2   | -1   | optimal | +1   | +2   |
|-----------|------|------|---------|------|------|
| 1         | 1,88 | 1,95 | 2,03    | 2,02 | 1,93 |
| 2         | 1,93 | 1,99 | 2,04    | 2,02 | 1,92 |
| 3         | 1,85 | 1,94 | 1,99    | 1,95 | 1,83 |
| 4         | 1,92 | 1,96 | 2,04    | 2,09 | 2,04 |
| 5         | 1,97 | 2,01 | 2,08    | 2,06 | 2,03 |
| MW        | 1,91 | 1,97 | 2,04    | 2,03 | 1,95 |
| STABWN    | 0,04 | 0,03 | 0,03    | 0,05 | 0,08 |
| 4c-Zellen |      |      |         |      |      |
| 1         | 3,90 | 4,04 | 4,13    | 4,10 | 3,94 |
| 2         | 3,93 | 4,05 | 4,10    | 3,95 | 3,77 |
| 3         | 3,91 | 4,03 | 4,02    | 3,86 | 3,66 |
| 4         | 3,99 | 4,09 | 4,14    | 3,99 | 3,85 |
| 5         | 3,75 | 3,87 | 4,00    | 3,79 | 3,62 |
| MW        | 3,90 | 4,02 | 4,08    | 3,94 | 3,77 |
| STABWN    | 0,08 | 0,08 | 0,06    | 0,11 | 0,12 |
| 8c-Zellen |      |      |         |      |      |
| 1         | 7,88 | 8,08 | 8,18    | 7,99 | 7,80 |
| 2         | 7,44 | 7,66 | 7,86    | 7,66 | 7,36 |
| 3         | 7,39 | 7,65 | 7,95    | 7,85 | 7,56 |
| 4         | 7,36 | 7,54 | 7,64    | 7,41 | 7,18 |
| 5         | 7,20 | 7,41 | 7,58    | 7,50 | 7,16 |
| MW        | 7,45 | 7,67 | 7,84    | 7,68 | 7,41 |
| STABWN    | 0,23 | 0,22 | 0,22    | 0,21 | 0,24 |

**Tabelle 20: DNA-Werte aller gemessenen Zellen bei verschiedenen Fokuseinstellungen, gemessen am MotiCyte-DNA**

### 3.7 Überprüfung der Sichtfeldabhängigkeit am MotiCyte

Analog zur Fokusabhängigkeit wurde die Sichtfeldabhängigkeit der gemessenen IOD-Werte der Zellkerne am MotiCyte überprüft.



**Abbildung 39: Sichtfeldabhängigkeit der gemessenen mittleren IOD-Werte und der Standardabweichungen.**

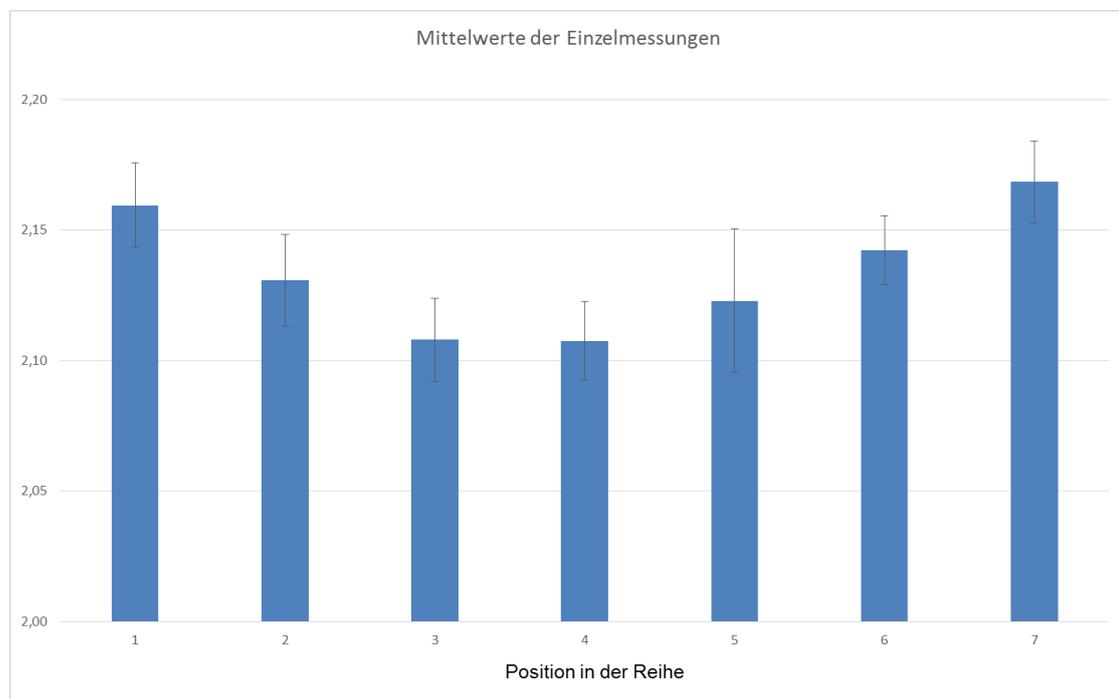
**Durch die farbliche Markierung (rot, blau) werden jeweils die zusammengehörenden sieben Felder einer Zeile des Rasters auf dem PC-Bildschirm herausgestellt.**

In der Abbildung 39 wird die Sichtfeldabhängigkeit der mittleren IOD-Werte von jeweils sechs 2c-Zellen aus fünf Abklatschpräparaten gemessen an 49 Stellen des Sichtfeldes dargestellt. Zur besseren Orientierung werden jeweils die sieben zusammengehörenden Felder einer Rasterzeile farblich markiert (rot, blau). Wie sich aus der Abbildung gut erkennen lässt, sind im Zentrum des Sichtfeldes kleinere IOD-Werte zu sehen und ein Anstieg dieser Werte zur Peripherie hin. In der Tabelle 21 werden die Mittelwerte pro Rasterspalte (Position) des Sichtfeldes, ermittelt aus den Mittelwerten der Einzelmessungen pro Sichtfeld, dargestellt. Dies wird grafisch in Abbildung 40 veranschaulicht. Im Mittel steigen die mittleren IOD-Werte bei einer Rasterspalte Abweichung vom Zentrum (Position 4) nach rechts um 0,5 %, bei zwei Rasterspalten um 1,42 % und bei drei Rasterspalten um 2,84 %. Nach links zeigte sich im Mittel ein Anstieg bei einer Rasterspalte um 0 %, bei zwei Rasterspalten um 0,95 % und bei drei Rasterspalten um 2,37 %.

## Ergebnisse

| Reihe/Position | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1              | 2,18 | 2,16 | 2,12 | 2,12 | 2,17 | 2,17 | 2,19 |
| 2              | 2,17 | 2,13 | 2,13 | 2,13 | 2,11 | 2,14 | 2,19 |
| 3              | 2,16 | 2,15 | 2,11 | 2,11 | 2,13 | 2,14 | 2,16 |
| 4              | 2,13 | 2,12 | 2,10 | 2,10 | 2,09 | 2,13 | 2,17 |
| 5              | 2,14 | 2,10 | 2,08 | 2,09 | 2,11 | 2,14 | 2,15 |
| 6              | 2,16 | 2,13 | 2,10 | 2,09 | 2,10 | 2,13 | 2,17 |
| 7              | 2,17 | 2,13 | 2,12 | 2,12 | 2,15 | 2,15 | 2,15 |
| MW             | 2,16 | 2,13 | 2,11 | 2,11 | 2,12 | 2,14 | 2,17 |
| STABWN         | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,01 | 0,02 |

**Tabelle 21: Zellkern-DNA-Werte pro Sichtfeldposition**



**Abbildung 40: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellkern-DNA-Einzelmessungen pro Rasterspalte.**

Um eine mögliche Verbesserung der Sichtfeldabhängigkeit zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit die prozentualen Abweichungen der peripheren Rasterspalten einer Rasterreihe zum Zentrum der Rasterreihe berechnet und gemittelt. Diese Werte wurden in der Abbildung 41b aufgetragen.

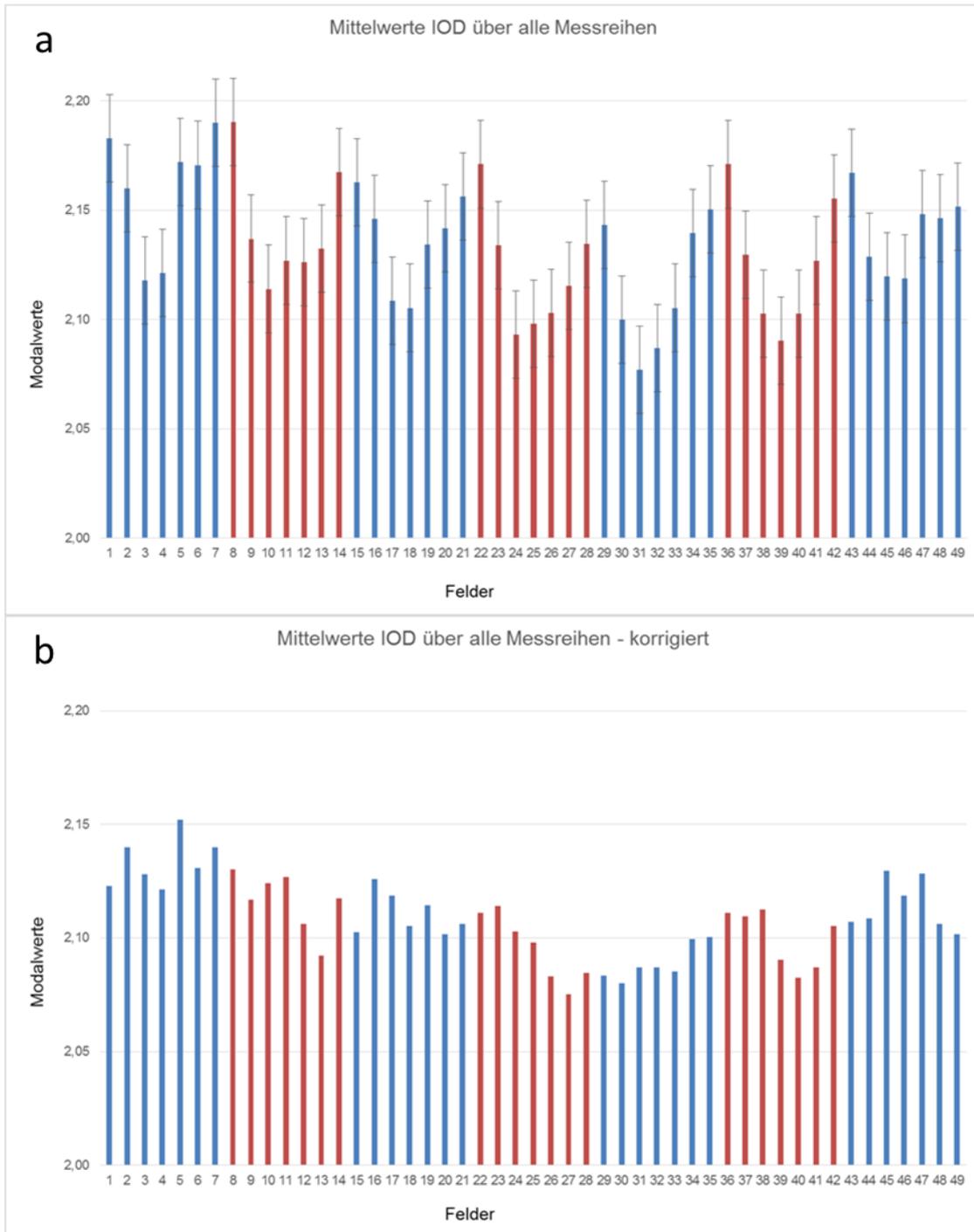


Abbildung 41: Sichtfeldabhängigkeit a) der mittleren IOD-Werte, b) korrigiert um die mittlere prozentuale Abweichungen von der mittleren Messung auf dem Sichtfeldraster.

Es zeigt sich, dass durch die Korrektur um den jeweiligen Faktor ein deutlich geringeres Rauschen zu verzeichnen ist.

### **3.8 Überprüfung des Streulichtfehlers und einer möglichen Überkorrektur**

Um eine Überkorrektur des Streulichtfehlers (*Glare*-Fehlers) auszuschließen, wurden die Messungen dahin gehend überprüft, ob es eine Korrelation der besonders hohen CVs mit einem besonders hohen Anteil an kleinen Zellen gab. Hierzu wurde überprüft, ob es zu einem verbesserten Wert des CVs diploider Analysezellen führt, wenn die Messung unter Ausschluss von kleinen, diploiden Zellkernen  $< 20 \mu\text{m}^2$  durchgeführt wird (siehe Tabelle 22 und Tabelle 23). Im DNA-Histogramm wurden alle diploiden Analysezellen, die diesem Kriterium entsprachen, manuell eingekreist und entfernt. Hierdurch konnten die CVs verbessert werden. Die besonders hohen CV-Werte wurden in Abhängigkeit zu den dazugehörigen CCs der diploiden Analysezellen gesetzt. Hierbei konnte jedoch kein Zusammenhang zu besonders hohen CCs (nahe an  $\pm 1$ ) festgestellt werden. Somit konnte eine Überkorrektur des *Glare*-Fehlers ausgeschlossen werden.

Ergebnisse

| Fall Nr. | N diploider AZ gesamt | N diploider AZ <20um | % diploider AZ < 20 um | CV diploider mit AZ < 20 um | CV diploider AZ ohne <20 um | Morphologie Scatter plot | CC diploide AZ gesamt |
|----------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| R-1-1-4  | 136                   | 32                   | 23,52                  | 4,14                        | 4,41                        | Säule mittel             | - 0,24                |
| R-1-1-3  | 221                   | 46                   | 23,33                  | 4,90                        | 5,28                        | Säule breit              | - 0,15                |
| R-1-1-2  | 151                   | 39                   | 25,82                  | 6,24                        | 6,65                        | Säule breit              | - 0,18                |
| R-1-1-1  | 226                   | 52                   | 23,00                  | 2,95                        | 2,82                        | Säule schmal             | - 0,17                |
| R-1-2-4  | 336                   | 44                   | 13,09                  | 3,66                        | 3,53                        | Unten links              | -0,04                 |
| R-1-2-3  | 255                   | 57                   | 22,36                  | 4,27                        | 4,09                        | Säule mittel             | - 0,6                 |
| R-1-2-2  | 253                   | 4                    | 1,58                   | 3,58                        | 3,27                        | Säule mittel             | - 0,09                |
| R-1-2-1  | 282                   | 4                    | 1,41                   | 4,22                        | 4,20                        | Unten links              | + 0,02                |
| R-1-3-4  | 568                   | 82                   | 14,43                  | 4,07                        | 4,09                        | Säule mittel             | - 0,06                |
| R-1-3-3  | 361                   | 17                   | 4,70                   | 5,07                        | 4,55                        | Säule breit              | - 0,14                |
| R-1-3-2  | 352                   | 92                   | 26,13                  | 3,37                        | 3,47                        | Säule schmal             | - 0,08                |
| R-1-3-1  | 337                   | 58                   | 17,21                  | 4,25                        | 4,26                        | Säule breit              | - 0,10                |
| R-1-4-4  | 217                   | 178                  | 82,02                  | 6,24                        | 6,46                        | Säule breit              | + 0,03                |
| R-1-4-3  | 369                   | 266                  | 72,08                  | 5,82                        | 4,29                        | Säule breit              | 0,00                  |
| R-1-4-2  | 212                   | 162                  | 76,42                  | 5,37                        | 3,77                        | Säule breit              | - 0,03                |
| R-1-4-1  | 244                   | 203                  | 83,19                  | 9,13                        | 5,31                        | Unten rechts             | - 0,17                |
| R-1-5-4  | 301                   | 45                   | 14,95                  | 4,30                        | 4,09                        | Säule breit              | - 0,05                |
| R-1-5-3  | 247                   | 124                  | 50,2                   | 5,18                        | 4,28                        | Säule breit              | - 0,08                |
| R-1-5-2  | 255                   | 22                   | 8,62                   | 4,55                        | 5,00                        | Säule breit              | - 0,16                |
| R-1-5-1  | 343                   | 57                   | 16,61                  | 4,81                        | 4,67                        | Säule breit              | - 0,09                |
| R-1-6-4  | 253                   | 80                   | 31,62                  | 4,66                        | 4,13                        | Säule breit              | 0,00                  |
| R-1-6-3  | 373                   | 124                  | 33,24                  | 4,59                        | 4,30                        | Säule breit              | - 0,03                |
| R-1-6-2  | 243                   | 86                   | 35,39                  | 3,69                        | 3,47                        | Säule breit              | - 0,01                |
| R-1-6-1  | 287                   | 229                  | 79,79                  | 4,05                        | 2,56                        | Säule mittel             | + 0,08                |
| R-1-8-4  | 220                   | 66                   | 30,00                  | 3,98                        | 3,28                        | Säule breit              | + 0,04                |
| R-1-8-3  | 225                   | 83                   | 32,54                  | 4,89                        | 4,34                        | Unten rechts             | - 0,40                |
| R-1-8-2  | 191                   | 190                  | 99,5                   | 3,99                        | -                           | Säule mittel             | - 0,06                |
| R-1-8-1  | 451                   | 207                  | 45,89                  | 5,21                        | 4,09                        | Säule mittel             | - 0,13                |
| R-1-9-4  | 171                   | 42                   | 24,56                  | 4,55                        | 4,25                        | Säule mittel             | + 0,06                |
| R-1-9-3  | 266                   | 74                   | 27,81                  | 3,75                        | 3,66                        | Säule breit              | + 0,05                |
| R-1-9-2  | 251                   | 57                   | 22,70                  | 5,00                        | 4,92                        | Säule breit              | - 0,15                |
| R-1-9-1  | 237                   | 80                   | 33,75                  | 4,37                        | 4,58                        | Säule mittel             | - 0,06                |
| R-1-10-4 | 228                   | 0                    | 0                      | 2,83                        | 2,83                        | Säule schmal             | - 0,08                |
| R-1-10-3 | 233                   | 0                    | 0                      | 2,42                        | 2,42                        | Säule schmal             | - 0,15                |
| R-1-10-2 | 199                   | 27                   | 13,56                  | 2,70                        | 2,71                        | Säule schmal             | + 0,11                |
| R-1-10-1 | 185                   | 17                   | 9,18                   | 6,53                        | 6,56                        | Säule breit              | - 0,20                |
| R-1-11-4 | 260                   | 0                    | 0                      | 2,32                        | 2,32                        | Säule schmal             | - 0,12                |
| R-1-11-3 | 230                   | 0                    | 0                      | 3,70                        | 3,70                        | Säule mittel             | - 0,15                |
| R-1-11-2 | 251                   | 0                    | 0                      | 3,69                        | 3,69                        | Säule schmal             | - 0,37                |
| R-1-11-1 | 222                   | 0                    | 0                      | 5,02                        | 5,02                        | Säule mittel             | + 0,12                |
| R-1-12-4 | 172                   | 103                  | 59,9                   | 1,84                        | 1,84                        | Säule schmal             | - 0,01                |
| R-1-12-3 | 205                   | 12                   | 5,85                   | 1,84                        | 1,85                        | Säule schmal             | - 0,03                |
| R-1-12-2 | 236                   | 0                    | 0                      | 2,34                        | 2,23                        | Säule schmal             | + 0,03                |
| R-1-12-1 | 306                   | 0                    | 0                      | 5,09                        | 5,09                        | Säule mittel             | - 0,23                |
| R-1-13-4 | 241                   | 1                    | 0,41                   | 2,52                        | 2,52                        | Säule schmal             | 0,00                  |
| R-1-13-3 | 218                   | 127                  | 58,3                   | 2,69                        | 2,64                        | Säule schmal             | - 0,01                |
| R-1-13-2 | 306                   | 2                    | 0,65                   | 2,43                        | 2,42                        | Säule schmal             | - 0,18                |
| R-1-13-1 | 204                   | 1                    | 0,49                   | 2,57                        | 2,57                        | Säule schmal             | - 0,07                |

Tabelle 22: CVs diploider Analysezellen unter Ausschluss von Zellkernen < 20 µm<sup>2</sup> der Ratte 1, gemessen am MotiCyte-DNA

Ergebnisse

| Fall Nr. | N diploider AZ gesamt | N diploider AZ < 20µm | % diploider AZ < 20 µm | CV diploider mit AZ < 20 µm | CV diploider AZ ohne <20 µm | Morpho-logie Scatter Plot | CC diploide AZ gesamt |
|----------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| R-2-1-4  | 236                   | 84                    | 35,59                  | 6,33                        | 5,39                        | Unten beidseits           | - 0,04                |
| R-2-1-3  | 165                   | 68                    | 41,21                  | 6,84                        | 4,98                        | Unten rechts              | -                     |
| R-2-1-2  | 183                   | 63                    | 34,42                  | 4,49                        | 4,40                        | Säule schmal              | - 0,07                |
| R-2-1-1  | 300                   | 167                   | 55,66                  | 8,16                        | 4,81                        | Unten links               | + 0,10                |
| R-2-2-4  | 194                   | 44                    | 22,68                  | 4,49                        | 4,51                        | Säule breit               | 0,00                  |
| R-2-2-3  | 255                   | 18                    | 7,05                   | 4,66                        | 4,64                        | Säule breit               | - 0,07                |
| R-2-2-2  | 192                   | 24                    | 12,5                   | 5,00                        | 4,97                        | Säule schmal              | - 0,03                |
| R-2-2-1  | 307                   | 92                    | 29,96                  | 5,32                        | 4,08                        | Unten beidseits           | - 0,24                |
| R-2-3-4  | 135                   | 39                    | 28,88                  | 5,18                        | 4,36                        | Säule breit               | - 0,13                |
| R-2-3-3  | 104                   | 92                    | 88,5                   | 8,55                        | 6,91                        | Unten rechts              | - 0,17                |
| R-2-3-2  | 309                   | 104                   | 33,65                  | 6,95                        | 5,73                        | Unten rechts              | - 0,13                |
| R-2-3-1  | 211                   | 49                    | 23,22                  | 3,86                        | 3,75                        | Säule schmal              | + 0,02                |
| R-2-4-4  | 154                   | 33                    | 21,42                  | 4,13                        | 4,27                        | Säule schmal              | - 0,14                |
| R-2-4-3  | 245                   | 26                    | 10,61                  | 3,15                        | 3,09                        | Säule schmal              | - 0,18                |
| R-2-4-2  | 219                   | 15                    | 6,84                   | 4,38                        | 4,37                        | Säule schmal              | + 0,05                |
| R-2-4-1  | 201                   | 12                    | 5,97                   | 3,74                        | 3,80                        | Säule schmal              | + 0,14                |
| R-2-5-4  | 263                   | 51                    | 19,39                  | 3,85                        | 3,87                        | Säule schmal              | - 0,12                |
| R-2-5-3  | 210                   | 28                    | 13,33                  | 4,60                        | 4,79                        | Säule schmal              | - 0,11                |
| R-2-5-2  | 345                   | 32                    | 9,27                   | 5,99                        | 5,38                        | Unten links               | - 0,07                |
| R-2-5-1  | 289                   | 154                   | 53,28                  | 7,07                        | 3,71                        | Säule schmal              | - 0,04                |
| R-2-6-4  | 174                   | 23                    | 13,21                  | 3,67                        | 3,70                        | Säule schmal              | + 0,03                |
| R-2-6-3  | 221                   | 18                    | 8,144                  | 5,38                        | 5,27                        | Säule mittel              | - 0,03                |
| R-2-6-2  | 303                   | 4                     | 1,32                   | 4,66                        | 4,69                        | Säule schmal              | + 0,05                |
| R-2-6-1  | 290                   | 5                     | 1,72                   | 3,86                        | 3,86                        | Säule schmal              | - 0,08                |
| R-2-7-4  | 212                   | 30                    | 1,41                   | 3,86                        | 3,84                        | Säule schmal              | - 0,24                |
| R-2-7-3  | 300                   | 28                    | 9,33                   | 3,61                        | 3,58                        | Säule schmal              | - 0,06                |
| R-2-7-2  | 272                   | 7                     | 2,57                   | 4,11                        | 4,11                        | Säule schmal              | - 0,06                |
| R-2-7-1  | 286                   | 7                     | 2,44                   | 3,69                        | 3,73                        | Säule breit               | 0,00                  |
| R-2-8-4  | 273                   | 29                    | 8,42                   | 3,93                        | 3,78                        | Säule breit               | - 0,24                |
| R-2-8-3  | 255                   | 17                    | 6,66                   | 4,27                        | 4,29                        | Säule schmal              | + 0,02                |
| R-2-8-2  | 271                   | 0                     | 0                      | 4,18                        | 4,18                        | Säule schmal              | - 0,04                |
| R-2-8-1  | 309                   | 0                     | 0                      | 4,73                        | 4,73                        | Säule schmal              | + 0,04                |
| R-2-9-4  | 123                   | 0                     | 0                      | 4,23                        | 4,23                        | Säule breit               | - 0,04                |
| R-2-9-3  | 285                   | 13                    | 4,56                   | 4,85                        | 4,84                        | Säule breit               | - 0,19                |
| R-2-9-2  | 202                   | 12                    | 5,94                   | 3,93                        | 3,93                        | Säule schmal              | + 0,03                |
| R-2-9-1  | 273                   | 0                     | 0                      | 3,38                        | 3,38                        | Säule schmal              | + 0,02                |
| R-2-10-4 | 200                   | 0                     | 0                      | 3,54                        | 3,54                        | Säule mittel              | + 0,13                |
| R-2-10-3 | 206                   | 0                     | 0                      | 2,34                        | 2,34                        | Säule schmal              | + 0,09                |
| R-2-10-2 | 181                   | 0                     | 0                      | 3,11                        | 3,11                        | Säule breit               | + 0,03                |
| R-2-10-1 | 213                   | 0                     | 0                      | 4,74                        | 4,74                        | Säule breit               | + 0,11                |
| R-2-11-4 | 69                    | 4                     | 5,79                   | 4,25                        | 4,36                        | Säule mittel              | - 0,14                |
| R-2-11-3 | 233                   | 0                     | 0                      | 3,94                        | 3,94                        | Säule mittel              | - 0,09                |
| R-2-11-2 | 298                   | 0                     | 0                      | 4,67                        | 4,67                        | Säule mittel              | - 0,05                |
| R-2-11-1 | 179                   | 0                     | 0                      | 4,72                        | 4,72                        | Säule mittel              | + 0,04                |
| R-2-12-4 | 218                   | 0                     | 0                      | 3,57                        | 3,57                        | Säule schmal              | + 0,03                |
| R-2-12-3 | 294                   | 9                     | 3,06                   | 4,94                        | 4,94                        | Säule mittel              | - 0,05                |
| R-2-12-2 | 209                   | 0                     | 0                      | 3,53                        | 3,53                        | Säule mittel              | + 0,06                |
| R-2-12-1 | 325                   | 0                     | 0                      | 6,11                        | 6,11                        | Säule breit               | - 0,09                |

Tabelle 23: CVs diploider Analysezellen unter Ausschluss von Zellkernen < 20 µm<sup>2</sup> der Ratte 2, gemessen am MotiCyte-DNA

## 4 Diskussion

### 4.1 Einhaltung der ESACP-Vorgaben: Homogenität der Färbung innerhalb eines Präparates und eines Färbebades sowie Messpräzision der DNA-Bildzytometrie

Zur Überprüfung der Messpräzision der DNA-Bildzytometrie wurden von 2 Ratten (Ratte 1 und 2) jeweils drei Messreihen mit jeweils vier Objektträgern und wiederum vier Leber-Abklatschpräparaten (4x4 *Imprint*) an der MotiCyte-DNA-Workstation gemessen. An der AutoCyte-Quick-DNA-Workstation wurde von der Ratte 2 die erste Messreihe zum Vergleich gemessen. Dabei galt es, die von der ESACP vorgegebenen Mindeststandards einzuhalten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MotiCyte-DNA-Workstation im Vergleich zur AutoCyte-Quick-DNA-Workstation präzisere Messergebnisse liefert, bedingt durch die softwareseitig implementierte Korrektur von Messfehlern (Beugung und Streulicht). Dies wird in Kapitel 4.2 genauer diskutiert. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass mit beiden Messsystemen nicht durchgehend die Vorgaben der Mindeststandards der ESACP eingehalten werden konnten. Als Ursache für die nichteingehaltenen Grenzwerte der ESACP könnten verschiedene Faktoren verantwortlich sein. Eine naheliegende Erklärung ist, dass es biologisch bedingt – z.B. durch eine erhöhte Mitoserate, Polyploidisierung oder die kurze mittlere Lebenszeit von Leberzellen – zu unerwartet hohen Zellteilungsraten kommt und gehäuft Zellen in der S-Phase oder G2/M-Phase gemessen werden. Somit werden IOD-Werte ermittelt, die eine breite Streuung (CV-Wert) aufweisen und damit Modalwerte liefern, die nicht denen der 2c-, 4c- und 8c-Referenzzellen entsprechen, sondern die verschobene *Peak*-Lagen widerspiegeln. Dies kann ausgeschlossen werden, da die Abtupfpräparate pro Objektträger stets von der gleichen Stelle der Rattenleber entnommen wurden. Die Ausreißer sind jedoch nicht bestimmten Objektträgern zuzuordnen und auch nicht auf eine bestimmte Ratte begrenzt.

Zum Ausschluss der Hypothese, dass eine fehlende oder überzogene Korrektur des Glare-Fehlers für die Ausreißer verantwortlich sein könnte, die sich in einem CC größer + 0,4 oder kleiner - 0,4 ausdrücken müsste [38], wurden Berechnungen der CVs der Analysezellen mit und ohne Kernen  $< 20 \mu\text{m}^2$  durchgeführt (siehe Tabelle 22 und Tabelle 23). Dabei stellte sich zum einen heraus, dass bei den Fällen mit hohen CVs die zugehörigen CCs nie über + 0,2 oder unter - 0,2 betragen. Daraus lässt sich folgern,

## Diskussion

dass in Fällen mit hohem CV weder der Glare-Fehler noch dessen Überkorrektur hierfür verantwortlich sein kann. Vielmehr könnten die Schwankungen durch eine defekte Färbeküvette zu erklären sein, welche eine unzureichend gleichmäßige Färbung der Präparate zur Folge hatte. Die Färbung der Präparate erfolgte im November 2010 sowie im September 2011. Im April 2012 wurde die verwendete Messküvette vom Institut für Cytopathologie Düsseldorf ausgetauscht. Zuvor gab es jedoch schon über einen langen Zeitraum (mehrere Monate) Beobachtungen mit dem bloßen Auge von Fehlfärbungen am Institut, die jedoch nicht mit der Messküvette in Zusammenhang gebracht wurden. Die Färbungen erschienen blass. Es wurden Risse in der inneren Spezialbeschichtung der Küvette festgestellt. Hierdurch kam es wahrscheinlich zu einer chemischen Reaktion während der Feulgenfärbung zwischen der Salzsäure und dem unterliegenden Metall. Hierbei könnten Metallionen freigesetzt worden sein. Es ist davon auszugehen, dass es auch schon zuvor zu Minderfärbungen in der unmittelbaren Umgebung der später beobachtbaren Risse gekommen ist. Eine Abhängigkeit der Messergebnisse von der Färbeposition der Objektträger in der Messküvette (vgl. Kapitel 3.1.1) konnte in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden. Da die Küvette während der Färbungen agitiert worden ist, ist eine feste Beziehung zwischen den Orten der Korrosion und deren erhöhten CV-Werten der IODs nicht feststellbar. Dass das Absorptionsspektrum des Schiffschens Reagenz durch Metallionen verändert werden kann, wurde bereits von Dutt (1976) beschrieben [61]. Nach dem ESACP *Consensus Report Part II* sind der CV der IOD von jeder Zellfraktion und der Referenzzellen (2. Messparameter) und CC der Zellkernfläche gegenüber der IOD für jeden Zellkern-*Peak* (4. Messparameter) Richtlinien für die Stabilität der Färbung.[38] Durch die Messwerte der vorliegenden Arbeit bestätigt sich die Annahme einer fehlerhaften Färbung durch eine durchgehende Erhöhung dieser Werte über alle Messreihen und über beide Messsysteme. Die Werte des dritten Messparameters, des CVs der IOD von jedem 2c-, 4c- und 8c-*Peak* und der Referenzzellen in jedem 4x4 *Imprint*, d.h. der CV bezogen auf eine Messreihe, erfüllen den geforderten Standard. Es ist anzunehmen, dass bei optimaler Färbung der Präparate die geforderten Standards der ESACP mit dem MotiCyte-DNA auch für Parameter zwei und vier einzuhalten sind.

Der fünfte Messparameter, der CV der IOD-Mittelwerte für denselben Zelltyp zwischen allen 4x4 *Imprints* konnte fast durchgehend mit der MotiCyte-DNA-*Workstation* eingehalten werden. Für die Grenzwerte des sechsten und des siebten Messparameters sind in der Literatur Widersprüche zu finden. Für die Grenzwerte der

CVs der Verhältnisse der Mittelwerte der *Peaks* von Referenzzellen zu Analysezellen (2c-Zellkerne) von jedem 4x4 *Imprint* (6. Messparameter) forderten Giroud et al. [38] im ESACP *Consensus Report Part II* eine Unterschreitung von 2 %. Haroske et al. [37] hingegen forderten zuvor im ESACP *Consensus Report Part I* eine Unterschreitung von 5 %. Der Grenzwert von 5 % würde die Ergebnisse der vorliegenden Studie deutlich besser widerspiegeln. Für die CVs der Verhältnisse der Mittelwertes der *Peaks* von tetraploiden zu diploiden Zellkerne von jedem 4x4 *Imprint* (7. Messparameter) forderten Giroud et al. [38] eine Unterschreitung von 1 %. Haroske et al. forderten zuvor eine Unterschreitung von 2,5 %.[37] Auch dies würde die Messergebnisse der vorliegenden Arbeit deutlich besser widerspiegeln. Die strengen Vorgaben des *Consensus Report Part II* von Giroud et al. sollten mit weiteren Messungen überprüft werden.

#### **4.2 Verbesserung der Präzision der DNA-Bildzytometrie durch neue Algorithmen zur bildanalytischen Korrektur des Streulicht- und Beugungsfehlers**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MotiCyte-DNA-Workstation im Vergleich zur AutoCyte-Quick-DNA-Workstation präzisere Messergebnisse liefert, bedingt durch die softwareseitig implementierte Korrektur von Messfehlern (Beugung und Streulicht). Die Verbesserung des Streulichtfehlers (Glare-Fehler) zeigt sich anhand des Korrelationskoeffizienten zwischen der Zellkernfläche und der gemessenen IOD jeder Zellfraktion (4. Messparameter). Dieser zeigt insgesamt gute Ergebnisse in Form von vergleichsweise wenigen und geringeren Abweichungen vom geforderten Wert beim MotiCyte-DNA. Hier kam es nur bei 4,68 % der Messungen zu Abweichungen im Vergleich zu 26,56 % beim AutoCyte-Quick-DNA. Die Algorithmen zur Korrektur des Beugungsfehlers von Würflinger resultieren in deutlich präziseren Werten des siebten Messparameters, d.h. des Verhältnisses der Modalwerte der tetraploiden zu den diploiden Zellkernen an der MotiCyte-DNA-Workstation. [33] Die MotiCyte-DNA-Workstation lieferte einen CV von 1,64 % im Vergleich zu 3,90 % bei der AutoCyte-Quick-DNA-Workstation.

Auch alle weiteren Messparameter zeigten beim MotiCyte-DNA deutlich präzisere Ergebnisse (siehe 3.4). Jedoch war es noch nicht möglich, durchgehend die festgelegten Mindeststandards der ESACP einzuhalten, dies könnte jedoch ebenfalls der in Kapitel 4.1 beschriebenen fehlerhaften Herstellung der Präparate durch eine defekte

Färbeküvette geschuldet sein. Auch wurde schon während der Messungen deutlich, dass der Algorithmus zur Streulichtkorrektur nicht ausreicht, um pyknotische Zellkerne korrekt zu messen. Aus diesem Grund erfolgte eine manuelle Klassifikation der Zellkerne und Eliminierung der Artefakte bzw. pyknotischen Zellkerne. Dies führte zu einem erheblichen Mehraufwand bei der Durchführung der Messungen.

#### **4.2.1 Abhängigkeit des DNA-Gehaltes von der Fokussierung des Zellkerns**

Aus Abbildung 36, Abbildung 37 und Abbildung 38 ist zu erkennen, dass die Fokuseinstellung einen deutlichen Effekt auf den gemessenen IOD-Wert des Zellkerns hat. Je weiter die Fokuseinstellung von der optimalen Einstellung abweicht, umso kleiner wird der gemessene IOD-Wert. Dies zeigt die Wichtigkeit der optimalen Fokuseinstellung der Zellen vor der Messung der IOD und die Abhängigkeit der Messgenauigkeit von der messenden Person.

In einer aktuellen Arbeit des Instituts für Bildverarbeitung der RWTH Aachen und des Instituts für Pathologie des Dürener Krankenhauses wird ein Algorithmus vorgestellt, der in der Lage ist, vollautomatisiert defokussierte Zellen in einem Sichtfeld zu erkennen und zu eliminieren. Dieser wurde validiert für computerassistierte DNA-Bildzytometrie mit einer Sensitivität von 96,08 % und einer Spezifität von 99,63 %, was eine deutlich präzisere Messung und einen geringeren Zeitaufwand für eine Messung gewährleistet [62]. Aktuell steht eine auf diesem Algorithmus basierende Weiterentwicklung des MotiCyte-DNA auf dem Markt zur Verfügung, das MotiC EasyScan, das innerhalb von wenigen Minuten vollautomatisiert mehr als 1000 Zellkerne misst.

#### **4.2.2 Abhängigkeit des DNA-Gehaltes von der Positionierung des Zellkerns im Sichtfeld**

Wie in Abbildung 39 gezeigt und unter Kapitel 3.7 beschrieben, gibt es deutliche Abweichungen der mittleren IOD zur Peripherie des Sichtfeldes. Dieses Phänomen kann verschiedene Ursachen haben. Es ist möglich, dass der Rand einer nicht optimal eingestellten Leuchtfeldblende vom Kondensator diffus in der Fokusebene abgebildet wurde. Auch könnte die kreisförmige Abbildung des Mikroskop-Objektivs mit einer Digitalkamera mit rechteckigem Bildformat eine mögliche Fehlerquelle darstellen. Hier könnte eine eckige Einstellstufe der Leuchtfeldblende und nur die Verwendung eines

## *Diskussion*

Bildausschnittes aus der Bildmitte Abhilfe schaffen. Dies würde jedoch zu einem erheblich größeren Zeitaufwand für die Messungen führen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die prozentualen Abweichungen der peripheren Rasterspalten einer Rasterreihe zum Zentrum der Rasterreihe berechnet und gemittelt. Diese Werte wurden in der Abbildung 41b aufgetragen.

Es zeigt sich, dass durch die Korrektur um den jeweiligen Faktor ein deutlich geringeres Rauschen zu verzeichnen ist. Die prozentuale Abweichung könnte als Faktor dienen, um welchen die ermittelten IOD-Werte korrigiert werden müssen. Für diese Ergebnisse lagen Messungen von 30 Zellkernen an 49 Rasterpunkten zugrunde. Um einen allgemeingültigen Faktor zu finden, sollten Untersuchungen mit größeren Strichproben und evtl. auch einem engmaschigeren Raster durchgeführt werden, um so möglichst präzise Ergebnisse zu erhalten. Die vorliegende Studie legt nahe, dass ein weiteres Forschen bzgl. der Abhängigkeit des gemessenen DNA-Gehaltes eines Zellkerns zur Positionierung im Sichtfeld der Kamera zu noch genaueren Ergebnissen der DNA-Bildzytometrie führen kann.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Böcking, A., *Identifizierung progredienter Dysplasien des Plattenepithels mittels DNA-Bildzytometrie*. MTA Dialog 6 2002. **3**: p. 490-493.
2. Schiebler, T., W. Schmidt, and K. Zilles, *Anatomie: Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*, ed. G. Arnold, et al. Vol. 8. 1999: Springer-Verlag.
3. Hees, H. and F. Sinowatz, *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Vol. 3. 2000: Deutscher Ärzte-Verlag.
4. Böcking, A., *DNA-Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik*. Onkol. Karger, Basel, 1990. **38**: p. 298-347.
5. Böcking, A. *Diagnostic DNA-Image-Cytometry, Institut für Zytopathologie,, Heinrich-Heine-Universität,, Düsseldorf, 04.10.2016*. Available from: [http://www.cytopathologie-dna-icm.uni-duesseldorf.de/background/cell\\_cycle\\_1.html](http://www.cytopathologie-dna-icm.uni-duesseldorf.de/background/cell_cycle_1.html).
6. Böcking, A., *DNA measurements. When and why? In: Compendium on quality assurance, proficiency testing, and workload limitations: In: Wied GL, Keebler CM, Rosenthal DL, Schenk U, Somrak TM, Vooijs GP (eds.)*. *Tutorials of Cytology*, 1995: p. 170-188.
7. Duesberg, P., A. Fabarius, and R. Hehlmann, *Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells*. *IUBMB Life*, 2004. **56**(2): p. 65-81.
8. Sandberg, A., *The chromosomes in human cancer and leukaemia*. Vol. 2. Edition. 1990, New York, Amsterdam, Oxford: Elsevier.
9. Haroske, G., et al., *Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry*. *Anal Cell Pathol*, 2001. **23**(2): p. 89-95.
10. Böcking, A., *Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie*. *Dtsch Arztebl*, 1998. **95**(12): p. A-658-662.
11. Böcking, A. and H. Motherby, *Abklärung zervikaler Dysplasien mittels DNA-Bild-Zytometrie*. *Pathologe* 1999. **20**(1): p. 25-33.
12. Motherby, H., et al., *Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology: I. DNA aneuploidy for identification and differentiation of primary and secondary tumors of the serous membranes*. *Anal Quant Cytol Histol*, 1998. **20**(3): p. 153-61.
13. Motherby, H., et al., *Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology: II. DNA aneuploidy for identification of neoplastic cells in equivocal effusions*. *Anal Quant Cytol Histol*, 1998. **20**(3): p. 162-8.
14. Nadjari, B., et al., *Cytologic and DNA cytometric diagnosis and therapy monitoring of squamous cell carcinoma in situ and malignant melanoma of the cornea and conjunctiva*. *Anal Quant Cytol Histol*, 1999. **21**(5): p. 387-96.
15. Nadjari, B., et al., *DNA aneuploidy as a specific marker of neoplastic cells in FNAB of the thyroid*. *Anal Quant Cytol Histol*, 1999. **21**(6): p. 481-8.
16. Böcking, A., et al., *Labormethoden der Cytopathologie, Aufbaukurs: Adjuvante Verfahren, DNA-Bildzytometrie, Immuncytochemie, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung*, U.D. Institut der Cytopathologie, Institut für Pathologie, Bonn-Duisdorf, Institut für Pathologie, Klinikum Dresden Friedrichstadt, Editor. 2008. p. 151.

17. Böcking, A. and V.Q. Nguyen, *Diagnostic and prognostic use of DNA image cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma*. Cancer, 2004. **102**(1): p. 41-54.
18. Ahlgren, G., et al., *A DNA cytometric proliferation index improves the value of the DNA ploidy pattern as a prognosticating tool in patients with carcinoma of the prostate*. Urology, 1997. **50**(3): p. 379-84.
19. Tribukait, B., *Klinische Bedeutung der DNA-Durchflusszytometrie beim Prostatakarzinom*,. Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse, Gmünder Ersatzkasse, Schwäbisch-Gmünd, 2005. **41**: p. 115-133.
20. Duesberg, P., R. Li, and D. Rasnick, *Aneuploidy approaching a perfect score in predicting and preventing cancer: highlights from a conference held in Oakland, CA in January, 2004*. Cell Cycle, 2004. **3**(6): p. 823-8.
21. Duesberg, P., et al., *Is carcinogenesis a form of speciation?* Cell Cycle, 2011. **10**(13): p. 2100-14.
22. Duesberg, P., et al., *Origin of metastases: subspecies of cancers generated by intrinsic karyotypic variations*. Cell Cycle, 2012. **11**(6): p. 1151-66.
23. Duesberg, P., et al., *The chromosomal basis of cancer*. Cell Oncol, 2005. **27**(5-6): p. 293-318.
24. Duesberg, P., *Das Chaos in den Chromosomen*. Spektrum der Wissenschaft, 2007. **10**: p. 54-64.
25. Atkin, N.B. and B.M. Richards, *Deoxyribonucleic acid in human tumours as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain: a comparison of tumours arising at different sites*. Br J Cancer, 1956. **10**(4): p. 769-86.
26. Bohm, N. and W. Sandritter, *DNA in human tumors: a cytophotometric study*. Curr Top Pathol, 1975. **60**: p. 151-219.
27. Brugal, G., et al., *A double scanning microphotometer for image analysis: hardware, software and biomedical applications*. J Histochem Cytochem, 1979. **27**(1): p. 144-52.
28. Auffermann, W., R. Reppes, and A. Bocking, *Rapid diagnostic DNA cytometry with an automatic microscope and a TV image-analysis system*. Anal Quant Cytol, 1984. **6**(3): p. 179-88.
29. Bacus, J.W. and L.J. Grace, *Optical microscope system for standardized cell measurements and analyses*. Appl Opt, 1987. **26**(16): p. 3280-93.
30. Böcking, A., C. Börgermann, and J. Dietz *Prostatakrebs - Überwachung oder Therapie nach Bestimmung der Bösartigkeit mit DNA-Zytometrie*. 2012. **1**.
31. Sanchez, L., et al., *Performance of a TV image analysis system as a microdensitometer*. Anal Quant Cytol Histol, 1990. **12**(4): p. 279-84.
32. Kindermann, D. and C. Hilgers, *Glare-Correction in DNA image cytometry*. Anal Cell Pathol, 1994. **6**: p. 165-180.
33. Würflinger, T., *Diagnostic DNA-Image-Cytometry, Issues & Realisation*. Lehrstuhl für Bildverarbeitung: Aachen. p. 1-65.
34. Haroske G , M.W., Theissig F , Kunze KD *Increase of precision and accuracy of DNA cytometry by correcting diffraction and glare errors*. Analytical Cellular Pathology 1995. **9**: p. 1-12.
35. Würflinger, T., et al., *DNA Image Cytometry: A Key Component for Cancer Diagnoses by Multimodal Cell Analysis*. Biomedical Engineering (BMT), 2005.
36. Böcking, A., F. Giroud, and A. Reith, *Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry*. European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol, 1995. **8**(1): p. 67-74.

37. Haroske, G., et al., *1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol*, 1998. **17**(4): p. 189-200.
38. Giroud, F., et al., *1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: Specific recommendations for quality assurance. European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol*, 1998. **17**(4): p. 201-8.
39. Giroud, F., *1997 Prototype Reference Standard Slides for quantitative cytometry of nuclear DNA content. Synthesis report, 1996. CEE/BCR-DGXII MAT1-CT 930010.*
40. Remmerbach, T.W., et al., *Toward a multimodal cell analysis of brush biopsies for the early detection of oral cancer. Cancer*, 2009. **117**(3): p. 228-35.
41. Hollerbach, S., A. Böcking, and A. Wellmann, *Sichere Tumordiagnosen sind auch ohne Staging-Operation möglich. Deutsches Ärzteblatt*, 2010. **107**(48): p. A1-2.
42. Schramm, M., et al., *Equivocal cytology in lung cancer diagnosis: improvement of diagnostic accuracy using adjuvant multicolor FISH, DNA-image cytometry, and quantitative promoter hypermethylation analysis. Cancer Cytopathol*, 2011. **119**(3): p. 177-92.
43. Maraki, D., J. Becker, and A. Boecking, *Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. J Oral Pathol Med*, 2004. **33**(7): p. 398-404.
44. Böcking, A., et al., *Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA cytophotometry. Cancer*, 1985. **56**(7): p. 1600-4.
45. Auffermann, W. and A. Bocking, *Early detection of precancerous lesions in dysplasias of the lung by rapid DNA image cytometry. Anal Quant Cytol Histol*, 1985. **7**(3): p. 218-26.
46. Remmerbach, T.W., et al., *Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases. Anal Cell Pathol*, 2003. **25**(4): p. 159-66.
47. Sudbo, J., et al., *Abnormal DNA content predicts the occurrence of carcinomas in non-dysplastic oral white patches. Oral Oncol*, 2001. **37**(7): p. 558-65.
48. Sudbo, J., et al., *Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia. J Pathol*, 2001. **194**(3): p. 303-10.
49. Handschel, J., et al., *Additional use of DNA-image cytometry improves the assessment of resection margins. J Oral Pathol Med*, 2007. **36**(8): p. 472-5.
50. Böcking, A., et al., *DNA-grading of prostatic carcinoma: prognostic validity and reproducibility. Anticancer Res*, 1988. **8**(1): p. 129-35.
51. Böcking, A., et al., *Representativity and reproducibility of DNA malignancy grading in different carcinomas. Anal Quant Cytol Histol*, 1989. **11**(2): p. 81-6.
52. Tils, M. *Verteilung von DNA-Ploidie-Mustern in Stanzbiopsien von Prostatakarzinomen, Dissertation der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 2016.*
53. Engelhardt, M. *Kinetiken des Prostata Spezifischen Antigens als Indikationsstellung zur Prostatastanzbiopsie, Dissertation der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 2014.*
54. Böcking, A. *Systematische Literaturrecherche zur prognostischen Relevanz der DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom, . 2011.*

## Literatur

55. Pretorius, M.E., et al., *Large scale genomic instability as an additive prognostic marker in early prostate cancer*. Cell Oncol, 2009. **31**(4): p. 251-9.
56. Böcking, A., et al., *Computer-unterstützte Erkennung von Krebszellen mittels DNA-Karyometrie*. Trillium Krebsmedizin, Zeitschrift für interdisziplinäre Onkologie & Hämatologie, 2015. **24**(5 (Sonderdruck)): p. 312-315.
57. Feulgen R, R.H., *Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten*. Hoppe-Seylers Z Physiol Chem, 1924. **135**: p. 203-248.
58. Chatelain, R., et al., *Automated Feulgen staining with a temperature-controlled staining machine*. Anal Quant Cytol Histol, 1989. **11**(3): p. 211-7.
59. Thermo Fisher Scientific Inc, *Färbeautomat Shandon Varistain 24-4*, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA, 15.07.2016. 2015: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/74200001>.
60. Piazzolo, M., *Statistik für Wirtschaftswissenschaftler: Daten sinnvoll aufbereiten, analysieren und interpretieren*. Zweibrücker Reihe, ed. G. Kürble and H. Reichling. Vol. 2. 2011, Karlsruhe: Verlag Versicherungswirtschaft GmbH Karlsruhe.
61. Dutt, M.K., *UV Feulgen staining of DNA with Schiff reagents containing different transitional metal cations and iodine crystal*. Acta histochem., 1976. **55**: p. 159-162.
62. Friedrich, D., et al., *Removing defocused objects from single focal plane scans of cytological slides*. J Pathol Inform, 2016. **7**: p. 21.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Alfred Böcking für die stetige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Auch bei den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie (Funktionsbereich Zytopathologie), insbesondere bei Herrn Dr. Leonid Berynskyy und Frau Dr. Natalia Pomjanski möchte ich mich bedanken, da sie mir bei all meinen Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Familie, meinem kleinen Bruder, meinem Ehemann, meinen Schwiegereltern, meiner Großmutter und meinem zwischenzeitlich verstorbenen Großvater für die Motivation und kreativen Gesprächen bedanken.

Vielen Dank!