

Jutta Groos
Dr. sc. hum.

Modellbasierte Untersuchung des Wirkmechanismus von Kanzerogenen bei der Entstehung und Progression von präneoplastischen Läsionen in der Leber

Geboren am 13.05.1975 in Groß-Umstadt

Diplom der Fachrichtung Mathematik im Oktober 2001 an der Universität Mainz

Promotionsfach: Biostatistik (DKFZ)

Doktormutter: Prof. Dr. Annette Kopp-Schneider

In der Leber stellen Herde präneoplastisch veränderter Hepatozyten (FAH=Foci of Altered Hepatocytes) beobachtbare Vorstufen des Leberzellkarzinoms dar. Bei der Auswertung von Hepatokarzinogenese-Versuchen kann man bei geeigneter Auswertungsmethode zwischen verschiedenen FAH-Typen unterscheiden. Diese Herdtypen repräsentieren unterschiedliche Stadien auf dem Weg zum malignen Zustand. Bis heute ist nicht abschließend geklärt, wie FAH entstehen und wie die verschiedenen Typen von FAH auseinander hervorgehen. Die quantitative Beschreibung der FAH-Entstehung, des FAH-Wachstums und des Übergangs zwischen verschiedenen FAH-Typen unter dem Einfluss verschiedener karzinogener Substanzen ist Gegenstand dieser Arbeit.

Das am weitesten verbreitete Karzinogenese-Modell ist das Mehrstufen-Modell mit klonaler Expansion (MSCEM=Multistage Clonal Expansion Model), welches die Entstehung und Progression von FAH auf Zellebene beschreibt. Im Gegensatz zum zellulären Ansatz des MSCEM werden FAH im Color-Shift-Modell (CSM) als Einheiten betrachtet. CSM und MSCEM beruhen auf zwei unterschiedlichen Hypothesen bezüglich des Übergangs verschiedener Herdtypen. MSCEM basiert auf der Annahme, dass einzelne Herdzellen durch Mutation ihren Phänotyp verändern, und diese durch klonale Expansion zu einem Herd eines fortgeschrittenen Stadiums anwachsen (Mutations-Hypothese). Dagegen geht das CSM davon aus, dass alle Zellen eines Herdes mehr oder weniger simultan ihren Phänotyp verändern, und dass Herde sowohl durch Proliferation als auch durch Rekrutierung von Nachbarzellen wachsen (Feldeffekt-Hypothese). Das Color-Shift-Modell mit betaverteilten Wachstumsraten, CSMbeta, stellt eine Weiterentwicklung des Color-Shift-Modells (CSM) dar, basiert also auf der Feldeffekt-Hypothese.

In der vorliegenden Arbeit wurde CSMbeta, parallel zu CSM und MSCEM, mithilfe von Maximum-Likelihood-Methoden an experimentelle Daten eines Hepatokarzinogenese-Experiments angepasst. Die experimentellen Daten stammen aus einem Ringversuch, der gleichzeitig an fünf verschiedenen Laboren durchgeführt wurde. Vier bekannte Karzinogene wurden nach einem Initiations-Promotions-Protokoll mit Diethylnitrosamin (DEN) als Initiator verabreicht. Die gesamte Versuchslaufzeit betrug 12 Wochen. Zur Detektion der FAH in Lebergewebeschnitten wurden zwei verschiedene Färbemethoden angewandt: Auf einen Teil der Gewebeschnitte wurde ein Marker für die erhöhte Enzymaktivität von Glutathion-S-Transferase, placentale Form (GSTP), angewandt. Ein anderer Teil wurde mit Hämalaun und Eosin (H&E) eingefärbt. Die Unterscheidung zwischen verschiedenen FAH-Typen ist nur bei H&E-gefärbten Gewebeschnitten möglich. Daher wurde zur modellbasierten Auswertung im Falle der GSTP-Daten keine Unterteilung nach Herdtypen vorgenommen und im Falle von H&E-Daten zwischen klar/azidophil-zelligen und gemischt-zelligen Herden

unterschieden. Zur Beurteilung der Anpassungsgüte wurden die Verteilungen von FAH-Anzahl und -Größe graphisch mit der jeweiligen Anpassung verglichen und zusätzlich die Cramer-von-Mises-Distanz (CvMD) als Gütekriterium für die FAH-Größenanpassung ermittelt.

Alle drei Modelle enthalten Parameter, die sich direkt bezüglich des Effekts der vier Testsubstanzen auf die Entstehung und das Wachstum von FAH interpretieren lassen. Die Wirkungsmuster der vier Substanzen, welche sich aus der Interpretation der Maximum-Likelihood-Schätzer (MLS) für die Modellparameter bei Anpassung der Modelle an GSTP- und H&E-Daten ergeben, wurden miteinander verglichen. Beim Vergleich der Wirkungsmuster auf Basis von CSMbeta und MSCEM ergeben sich geringe Abweichungen zwischen GSTP- und H&E-Anpassung. Die Wirkungsmuster auf Grundlage der Interpretation der MLS bei CSM-Anpassung an GSTP- und H&E-Daten zeigen dagegen einige Unterschiede.

CSMbeta ist insgesamt in der Lage, die Größe und Anzahl von FAH sowohl im GSTP-markierten als auch im H&E-gefärbten Gewebeschnitt im Vergleich zu MSCEM und CSM gut einzuschätzen. Die Güte der Anpassungen von CSMbeta an die Herdanschneit-Größenverteilungen der GSTP- und H&E-Daten, gemessen durch die CvMD, ist insgesamt besser als die Güte der anderen beiden Modelle.

Die Anpassung der beiden Color-Shift-Modelle an H&E-Daten führt zu einer korrekten Einschätzung des Größenverhältnisses von klar/azidophil-zelligen zu gemischt-zelligen FAH. Im Gegensatz hierzu sind in MSCEM gemischt-zellige Herde im Schnitt grundsätzlich kleiner als klar/azidophil-zellige Herde, was den H&E-Daten widerspricht. Dieses Ergebnis spricht für die Feldeffekt-Hypothese.

Die Aussagen über die Wirkweisen der einzelnen Substanzen zeigen geringe modellbedingte Unterschiede. Allein die Anpassung von CSM an H&E-Daten zeigt größere qualitative Abweichungen. Die Aussagen bezüglich der Wirkweisen der getesteten Substanzen stehen im Einklang mit früheren experimentellen Befunden.

CSMbeta stellt also eine Verbesserung von CSM dar und hat darüber hinaus gegenüber MSCEM den deutlichen Vorteil, dass es die Größenverhältnisse von Herdtypen korrekt vorhersagt. Zur Beurteilung des hepatokarzinogenen Potentials unbekannter Substanzen ist somit die CSMbeta-basierte Auswertung sehr gut geeignet.